



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Bachelorarbeit

Modulation der intrazellulären cGMP Signale mittels des Pufferproteins

SponGee

B. Sc. Biotechnologie

vorgelegt von

Fabian Gutknecht

Hamburg

am 14. März 2022

Durchgeführt am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)

Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Friederike Cuello (UKE Hamburg)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Protein Kinase G.....	2
1.2. Pufferprotein SponGee	4
1.3. Förster Resonanz Energietransfer Biosensoren	5
1.3.1. <i>Biosensor cGi500</i>	5
1.3.2. <i>A Kinase Activity Reporter 3</i>	6
1.4. Aktivierung der Protein Kinase G 1 durch Oxidation	7
1.4.1. <i>Natriumnitroprussiat</i>	8
1.4.2. <i>1-Nitrosocyclohexyl Acetat</i>	9
1.4.3. <i>CXL-1020</i>	10
1.5. 3-Isobutyl-1-methylxanthin	11
1.6. Ziel der Arbeit.....	12
2. Materialien	13
2.1. Verbrauchsmaterialien	13
2.2. Geräte	14
2.3. Medien und Reagenzien	15
2.4. Chemikalien	16
3. Methoden	17
3.1. Zellkultur-Techniken.....	17
3.1.1. <i>HEK293 Zellen – Wildtypen und Mutanten</i>	17
3.1.2. <i>Auftauen von HEK293 Zellen</i>	17
3.1.3. <i>Zellkultur</i>	18
3.1.4. <i>Vorbereitung einer 96-Well Mikrotiterplatte zur späteren Vermessung mit der FlexStation 3</i>	19
3.2. Messung an der FlexStation 3	22
3.2.1. <i>Vorbereitung der NO- und HNO-Donoren Verdünnungsreihen</i>	22
3.2.2. <i>FRET Messungen mit HEK293 Zellen</i>	26
3.3. Isolation und Transduktion vaskulärer glatter Gefäßmuskelzellen	27
3.3.1. <i>Vorbereitung</i>	27
3.3.2. <i>Isolation</i>	27

3.3.3.	<i>Transduktion der VSMC</i>	28
3.4.	FRET Messungen mit VSMC	29
3.5.	Auswertung der Daten mit Origin	29
3.6.	Auswertung der Daten mit Excel.....	30
4.	Ergebnisse	30
4.1.	Selektion der HEK293 Klone mit dem Biosensor cGi500 und SponGee für die FRET Messungen	30
4.2.	<i>In vitro</i> Messungen der Wildtyp, C117S, C195S und C177/195S cGi500 Mutanten ohne und mit SponGee	32
4.2.1.	<i>Wildtyp cGi500 mit SponGee</i>	33
4.2.2.	<i>C117S cGi500 mit SponGee</i>	35
4.2.3.	<i>C195S cGi500 mit SponGee</i>	37
4.2.4.	<i>C177/195S cGi500 mit SponGee</i>	39
4.2.5.	<i>Vergleich der EC50 Werten von SNP, NCA und CXL</i>	41
4.3.	<i>In vitro</i> Messungen der Wildtyp und C177/195S cGi500 Mutanten ohne und mit SponGee.....	44
4.3.1.	<i>Wildtyp cGi500 mit SponGee</i>	45
4.3.2.	<i>C177/195S cGi500 mit SponGee</i>	47
4.3.3.	<i>Vergleich der EC50 Werte von SNP, NCA und CXL</i>	49
5.	Diskussion	54
5.1.	<i>In vitro</i> Messungen von HEK293-Zellen mit dem Biosensor cGi500 und dem Pufferprotein SponGee	54
5.2.	Transduktion von VSMC und Messungen der endogenen PKG Aktivität.....	57
6.	Zusammenfassung	58
7.	Bibliografie	59

Abkürzungsverzeichnis

A

AKAR3 *A Kinase Activity Reporter 3*

ATP Adenosintriphosphat

C

C117S Serin ersetzt Cystein an Position 117

C195S Serin ersetzt Cystein an Position 195

C117/195S Serin ersetzte Cysteine an Position 117 und Position 195

cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat

CFP *cyan fluorescent protein*

cGMP zyklisches Guanosinmonophosphat

CXL CXL-1020

D

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

E

eNOS endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase

F

FRET Förster Resonanz Energietransfer

G

GTP Guanosintriphosphat

H

HNO Nitroxyl

I

IRAG IP3 Rezeptor assoziiertes Protein Kinase G Substrat

IBMX 3-Isobutyl-1-methylxanthin

M

MLC Myosin-leichte-Kette

MLCK Myosin-leichte-Kette Kinase

MLCP Myosin-leichte-Kette Phosphatase

mRFP monomeres *Red Fluorescent Protein*

N

NCA 1-Nitrosocyclohexyl Acetat

NO	Stickstoffmonoxid
P	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterasen
PDE5	Phosphodiesterase V
PKA	Protein Kinase A
PKG	Protein Kinase G
S	
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNP	Natriumnitroprussiat
V	
VSMC	Vaskuläre Glatte Gefäßmuskelzellen
Y	
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	13
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	14
Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Medien und Reagenzien.....	15
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.....	16
Tabelle 5: Verteilung der einzelnen chemischen Verbindungen mit dessen Konzentrationen auf den Zellen.....	26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Struktur eines PKG Monomers.	3
Abbildung 2: Schematische Struktur des Pufferproteins SponGee.	4
Abbildung 3: Schematische Funktion von FRET an einem cGi500 Molekül.	6
Abbildung 4: Schematische Funktion von FRET an einem AKAR3 Molekül.	7
Abbildung 5: Chemische Struktur von SNP	8
Abbildung 6: Chemische Struktur von 1-Nitrosocyclohexyl Acetat	9
Abbildung 7: Chemische Struktur von CXL-1020	10
Abbildung 8: Chemische Struktur von 3-isobutyl-1-methylxanthine.....	11
Abbildung 9: Ausplattierschema der SponGee exprimierenden Zellen	21
Abbildung 10: Ausplattierschema der Zellen der Zellen, welche nur cGi500, und cGi500 und SponGee exprimieren	21
Abbildung 11: Verdünnungsschema von SNP zum Pipettieren auf die 96-Well Mikrotiterplatte.....	23
Abbildung 12: Verdünnungsschema von NCA zum Pipettieren auf die 96-Well Mikrotiterplatte.....	24
Abbildung 13: Verdünnungsschema von CXL zum Pipettieren auf die 96-Well Mikrotiterplatte.....	25
Abbildung 14: HEK293 Zellen mit cGi500 Fluoreszenz (grün) und SponGee Expression (rot).	31
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort von HEK293 Zellen mit dem Wildtyp cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.	33
Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C117S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.	35
Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C195S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.	37
Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C117/195S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.	39

Abbildung 19: EC50 Werte bei Zugabe von SNP der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.	41
Abbildung 20: EC50 Werte bei Zugabe von NCA der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.	42
Abbildung 21: EC50 Werte bei Zugabe von CXL der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.	43
Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem Wildtyp cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.	45
Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C117/195S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.	47
Abbildung 24: EC50 Werte bei Zugabe von SNP der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.	49
Abbildung 25: EC50 Werte bei Zugabe von NCA der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.	50
Abbildung 26: EC50 Werte bei Zugabe von CXL der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.	51
Abbildung 27: Eine isolierte, von Fett befreite Aorta einer Maus.	52
Abbildung 28: Fluoreszenz einer AKAR3-transduzierten VSMC.	52
Abbildung 29: Mittlere absolute Änderung der FRET Antwort in den Zellen nach Zugabe von NCA und IBMX.	53

1. Einleitung

Chronischer Bluthochdruck, auch Hypertension genannt, betrifft weltweit 1,28 Milliarden Menschen im Alter von 30 bis 79 Jahren und stellt eine der Hauptursachen für kardiovaskuläre Endorganschädigung, sowie vorzeitigen Tod dar (Mills et al., 2020). Bluthochdruck beschreibt den erhöhten Druck des Blutes auf die Wände der Arterien und wird mittels Blutdruck Messungen an zwei verschiedenen Tagen diagnostiziert. Überschreitet der systolische Blutdruck 140 mmHg oder der diastolische Blutdruck 90 mmHg liegt laut Weltgesundheitsorganisation ein Bluthochdruck vor (WHO, 2022). Bluthochdruck kann durch modifizierbare Lebensstilfaktoren wie erhöhten Salzkonsum, den Konsum von Tabak und Alkohol, sowie eine ungesunde Ernährung reich an gesättigten Fettsäuren und Transfetten, verursacht werden. Nicht modifizierbare Faktoren für Bluthochdruck stellen eine genetische Prädisposition oder ein erhöhtes Lebensalter von über 65 Jahre dar (WHO, 2022).

Der Blutdruck des Menschen wird durch verschiedene zelluläre Abläufe geregelt. Ein Weg der Blutdruckregulation erfolgt über die Protein Kinase G (PKG). Aufgrund des direkten Einflusses auf die Regelung der Kontraktion vaskulärer Gefäßmuskelzellen ist die Aktivierung der PKG bereits seit längerem eine der Wirkstellen schnellwirkender Medikamente gegen Bluthochdruck. Die PKG wird aktiviert mittels dem *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Medikamente, welche vor allem zwischen 1970 und 1980 entwickelt wurden, zielen darauf ab cGMP-Spiegel innerhalb der Zellen steigen zu lassen und so die PKG zu aktivieren. Heutzutage finden neue Wirkmechanismen Anwendung, welche in der Lage sind die PKG direkt mittels Oxidation zu aktivieren (Sabbah et al., 2013). Um die Aktivierung durch Oxidation unabhängig des endogenen Aktivationsweges zu erschließen, muss dieser inhibiert werden. Dabei ist das Pufferprotein SponGee ein neues genetisches Tool, um cGMP Moleküle zu binden und so eine Pufferung der cGMP-Spiegel in den Zellen zu erreichen.

1.1. Protein Kinase G

Die Protein Kinase G phosphoryliert Serine und Threonine in intrazellulären Zielproteinen. In Säugetieren sind die zwei Gene *PRKG1* und *PRKG2* in Säugetieren vorhanden, welche jeweils für Protein Kinase G 1 (PKG1) und Protein Kinase G 2 (PKG2) kodieren. Beide Proteine sind Homodimere zweier identischer Untereinheiten mit einer Größe der PKG1 von etwa 75 kDa und der PKG2 85 kDa (Lincoln et al., 1988).

PKG1 liegt im Zytosol der Zellen und durch alternativ genutzte Exonen am N-terminalen Ende der PKG in zwei Isoformen PKG1 α und PKG1 β vor, während die PKG2 für gewöhnlich in der Zellmembran eingebaut ist. In kardiovaskulären Zellen liegt prädominant die PKG1 α Isoform vor (Geiselhöringer et al., 2004).

Der PKG Monomer, dargestellt in Abbildung 1, besteht aus drei funktionellen Untereinheiten, der N-terminalen Leucin-Zipper Domäne mit inhibitorischer Sequenz, einer regulatorischen, sowie einer katalytischen Domäne. Die Leucin-Zipper Domäne ist für die Dimerisierung der PKG verantwortlich und kann nach Exposition mit Oxidantien eine Interdisulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen 42 benachbarter Monomere eingehen (Kalyanaraman et al., 2017). Die regulatorische Domäne beinhaltet eine hoch-, sowie eine niedrigaffine cGMP-Bindungsstelle. Die Bindung von cGMP Molekülen an die regulatorische Domäne führt zur Konformationsänderung und Aktivierung der Kinase. Die katalytische Domäne beinhaltet Bindungsstellen für die PKG Substrate, sowie für Adenosintriphosphat (ATP), welches den Donor der Phosphatgruppe darstellt.

Innerhalb der regulatorischen Domäne befinden sich die Cysteine 117 und 195. Diese werden durch Nitroxyl(HNO)-Donoren oxidiert und sind in der Lage Intradisulfidbrücken zu bilden (Donzelli et al., 2017). Die Ausbildung einer Intradisulfidbrücke in der cGMP-Bindungsstelle bewirkt eine Konformationsänderung, die mit der Bindung von cGMP an PKG vergleichbar ist.



Abbildung 1: Schematische Struktur eines PKG Monomers.

Die N-terminale Dimerisierung vermittelnde Leucin-Zipper Domäne (LZ) beinhaltet das Interdisulfidbrücke vermittelnde Cystein 42 (C42). Es folgt eine inhibitorische Sequenz (IS) und die hochaffine Bindungsdomäne der PKG für cGMP, welche die beiden Cysteine 177 (C117) und 195 (C195) enthält. Anschließend folgt die niedrigaffine cGMP-Bindungsstelle, gefolgt von einer Bindungsdomäne für ATP und Substrate (Erstellt mit BioRender.com).

Im Endothel wird L-Arginin von der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert. Dieses diffundiert als Signalmolekül in die Gefäßmuskelzellen und aktiviert dort im Zytosol die lösliche Guanylatzyklase (sGC), welche Guanosin triphosphat (GTP) in den sekundären Botenstoff cGMP umwandelt. Bei einer Bindung von cGMP an die PKG, kommt es zu einer Konformationsänderung sowie einer Aktivierung der Kinase.

Die aktivierte PKG ist an der Regulation des vaskulären Tonus der Muskelzellen beteiligt. Durch PKG-vermittelte Phosphorylierung der Myosin-leichte-Kette Phosphatase (MLCP) und einer damit einhergehenden Dephosphorylierung der Myosin-leichte-Kette (MLC) wird die Aktin-Myosin Interaktion reduziert. In Folge kommt es zur Relaxation der glatten Muskelzellen.

Die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen wird bestimmt von der phosphorylierungsbedingten Aktivität der MLC. Die Phosphorylierung wird durch die MLC Kinase (MLCK) induziert, was eine verstärkte Myosin Adenosin triphosphatasen Aktivität und Kontraktion der Gefäßmuskelzellen zur Folge hat.

Die Aktivität der MLCK und MLCP darüber hinaus abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Die aktivierte PKG1 α hemmt den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch Phosphorylierung des *Large Conductance Calcium-Activated Potassium* Kanals, wodurch es zu einer Ausströmung von K^+ und Hemmung von Ca^{2+} Kanälen kommt. Des Weiteren bewirkt eine Aktivierung von PKG1 α die Hemmung der

Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mittels Phosphorylierung des IP3 Rezeptor assoziierten PKG Substrates (IRAG), welches dadurch als Inhibitor der IP3-Rezeptor Aktivität wirkt. Die geringere Ca^{2+} Konzentration vermindert die Ca^{2+} vermittelte MLCK Aktivierung, wodurch die MLCK und MLC weniger aktiv sind und daraufhin eine Vasorelaxation mit Blutdrucksenkung begünstigen (Francis et al., 2010).

1.2. Pufferprotein SponGee

Das Pufferprotein SponGee wurde von Ros et al. 2019 entwickelt und fungiert als cGMP Scavenger. SponGee ist ein Chimär, der Teile der bovinen PKG1 α und PKG1 β enthält und cGMP bindet (siehe Abbildung 2 ; Ros et al., 2019). Da es nur die Bindungsstellen für cGMP und dessen Affinitätsdomäne beinhaltet, wird die PKG Signalkaskade nicht aktiviert. In der SponGee Sequenz ist zusätzlich zu den Bindungsstellen und die Affinitätsdomäne die Leucin-Zipper Domäne der PKG enthalten. Diese Domäne führt wie in der PKG zu einer Dimerisierung. Des Weiteren enthält SponGee ein monomeres *Red Fluorescent Protein* (mRFP). Dies ermöglicht die Visualisierung von Zellen, welche SponGee exprimieren, mittels Fluoreszenzmikroskopie.

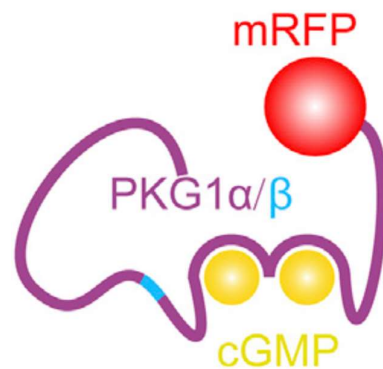


Abbildung 2: Schematische Struktur des Pufferproteins SponGee. Chimäre Struktur von PKG1 α und PKG1 β , sowie dessen Bindungstaschen für cGMP und das angehängte mRFP Fluorophor (Ros et al., 2019).

1.3. Förster Resonanz Energietransfer Biosensoren

Förster Resonanz Energietransfer (FRET) basiert auf einem nicht-radioaktiven, abstandsabhängigen Energietransfer zwischen einem Donor-Fluorophor und einem Akzeptor-Fluorophor, welche sich jeweils an einem Ende eines molekularen Biosensors befinden. Dieses Verfahren findet Anwendung in lebenden Zellen, um Echtzeitanalysen komplexer molekularer Abläufe zu erhalten (Zaccolo, 2004). Die Fluorophore an beiden Enden des Biosensor sollten dabei etwa 2-6 nm voneinander entfernt sein und das Emissionsspektrum des Donor sollte dabei mindestens 30% dem Anregungsspektrum des Akzeptors entsprechen (Zaccolo, 2004).

Donor-Fluorophore in Biosensor exprimierenden Zellen können mittels dessen Anregungsspektrum angeregt werden. Bei der Emission gibt der Donor den angeregten Zustand an den Akzeptor weiter, welcher daraufhin sein Emissionsspektrum abgibt. Dieses Emissionsspektrum des Akzeptors wird gemessen. Entsteht durch Binden eines Moleküls an den Biosensor eine Konformationsänderung in dem Biosensor, verändert sich auch die Distanz zwischen beiden Fluorophoren und damit das Emissionsspektrum, da Förster Resonanz Energietransfer vermindert oder verstärkt stattfindet. Die Konzentrationsänderung des gebundenen Moleküls in der Zelle wird so proportional in der Änderung des Emissionsspektrums des Biosensors wiedergegeben.

1.3.1. Biosensor cGi500

Der Biosensor cGi500 ist spezifisch für den *second messenger* cGMP. Der Sensor wurde 2007 von Russwurm et al., 2007 nach einer systematischen Analyse mehrerer potenzieller cGMP Biosensoren veröffentlicht. Der Biosensor cGi500 besteht aus der cGMP-bindenden Domäne von PKG von Glutamin 79 bis Tyrosin 345 zwischen zwei Fluorophoren, dem *cyan fluorescent protein* (CFP) und dem *yellow fluorescent protein* (YFP) (Russwurm et al., 2007). Die halbmaximale Reaktion der FRET Antwort liegt bei einer Konzentration von 500 nM cGMP und eine nur minimale FRET Antwort bei einer Konzentration von 1 mM des ähnlichen *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP).

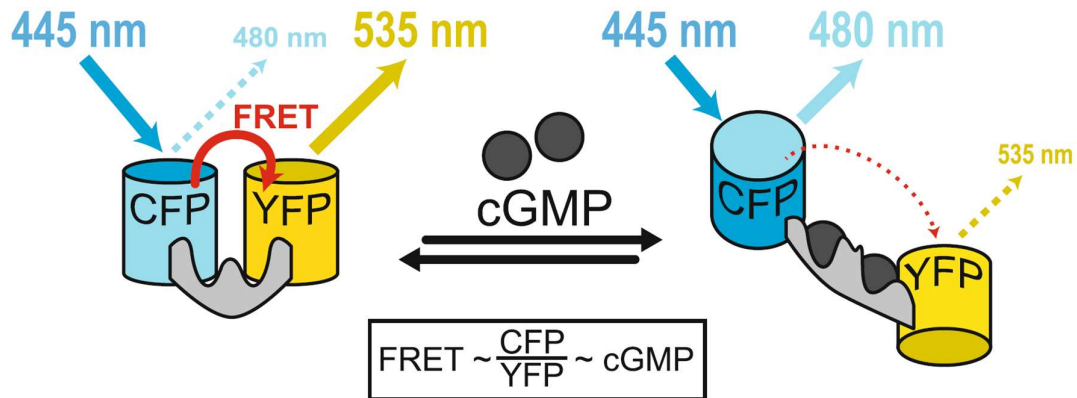


Abbildung 3: Schematische Funktion von FRET an einem cGi500 Molekül. Das CFP des cGi500 Biosensors wird mit einer Wellenlänge von 445 nm angeregt und überträgt dessen angeregten Zustand mittels FRET auf das YFP. Im Normalzustand wird so hauptsächlich eine Wellenlänge von 535 nm abgegeben. Bindet cGMP an den Biosensor, erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch sich die Distanz zwischen CFP und YFP vergrößert und FRET deutlich verringert. Dadurch wird nun hauptsächlich eine Wellenlänge von 480 nm abgegeben (Thunemann et al., 2013).

1.3.2. A Kinase Activity Reporter 3

Der Biosensor *A Kinase Activity Reporter 3* (AKAR3) ist ein Aktivitätssensor der PKG, sowie der Protein Kinase A (PKA) (Gambaryan et al., 2012). Der Sensor wurde 2004 von Allen et al. nach einer systematischen Analyse und Verbesserung mehrerer bereits bestehender cAMP Biosensoren veröffentlicht. Der AKAR3 Biosensor besteht aus einem CFP, der FHA1 Phospho-Aminosäuren-Bindungsdomäne, einem Substrat der PKA und einem YFP (Allen & Zhang, 2006). Im Gegensatz zu dem Biosensor cGi500 erfolgt bei dem AKAR3 Sensor die Konformationsänderung durch Phosphorylierung des PKA Substrates in dem Sensor. FRET findet hierbei nur im phosphorylierten Zustand des Biosensors statt.

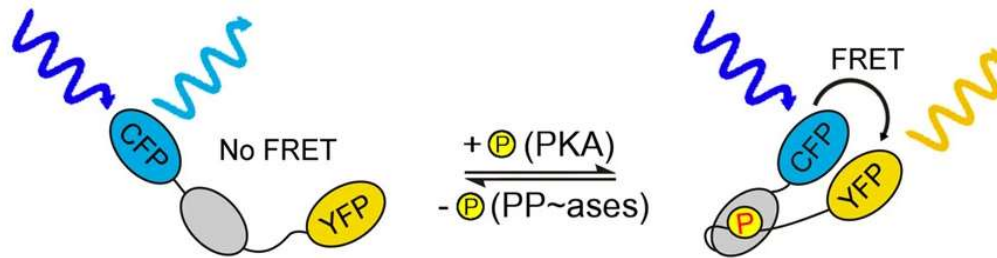


Abbildung 4: Schematische Funktion von FRET an einem AKAR3 Molekül. Das CFP des AKAR3 Biosensors wird angeregt ohne dass zu FRET kommt. Im Normalzustand wird so hauptsächlich das Emissionsspektrum des CFP abgegeben. Wird das PKA Substrat phosphoryliert, erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch sich die Distanz zwischen CFP und YFP verkleinert und FRET stattfindet. Somit wird hauptsächlich das Emissionsspektrum von YFP abgegeben (Koschinski & Zaccolo, 2017).

1.4. Aktivierung der Protein Kinase G 1 durch Oxidation

NO-Donoren werden eingesetzt, um die sGC zu aktivieren und so den intrazellulären cGMP-Spiegel zu steigern und die PKG1 α zu aktivieren. Natriumnitroprussiat (SNP) ist ein NO-Donor, welcher seit mehreren Jahrzehnten bei akutem Herzversagen eingesetzt wird (Hottinger et al., 2014). Vermehrt wird zusätzlich nach Alternativen geforscht, da Patienten bei NO-Donoren schnell Toleranzen entwickeln und die Medikamente nicht längerfristig eingesetzt werden können (Ukena et al., 2010). Aufgrund der Ähnlichkeit von HNO gegenüber NO als das um ein Elektron reduzierte Produkt von NO, ist es in vergangenen Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Als Oxidationsmittel erweckt die Charakterisierung der Wirkung von HNO zunehmend Interesse. Ferner entwickeln HNO-Donoren keine Toleranzen und sind resistenter gegenüber dem Abbau durch reaktive Sauerstoff Spezies (Donzelli et al., 2017; Pryszyzhna & Eaton, 2015).

Innerhalb der PKG1 α befinden sich zwölf Cysteine, von denen drei bekannt sind einen durch Oxidantien induzierten Effekt in der PKG1 α zu bewirken (Donzelli et al., 2017). Das erste Cystein 42 befindet sich innerhalb der Leucin-Zipper Domäne. Dieses ist unter endogenen Umständen für die Ausbildung einer Interdisulfidbrücke zwischen zwei Monomeren der PKG1 α verantwortlich. Diese Interdisulfidbrücke induziert die Dimerisierung und Substratlokalisierung und kann auch durch Oxidation geschaffen werden. Weiterhin konnten Donzelli et al. 2017 erstmalig

zeigen, dass die Konformationsänderung der PKG1 α durch cGMP auch durch die Oxidation der beiden Cysteine 117 und 195 möglich ist, welche daraufhin eine Intradisulfidbrücke bilden. Die Intradisulfidbrücke trägt maßgeblich zu der Aktivierung der PKG1 α durch Oxidation bei.

1.4.1. Natriumnitroprussiat

Natriumnitroprussiat (SNP) vorliegend in einer Dihydrat Form ist ein rubinroter wasserlöslicher Feststoff mit einer molaren Masse von 297,96 g/Mol und einer Dichte von 1,720 g/cm³ bei 20°C (Sigma-Aldrich, 2022). Es besteht aus einem zweiwertigen Eisenatom, welches mit Stickstoffmonoxid (NO) und fünf Cyanid Ionen komplexiert ist.

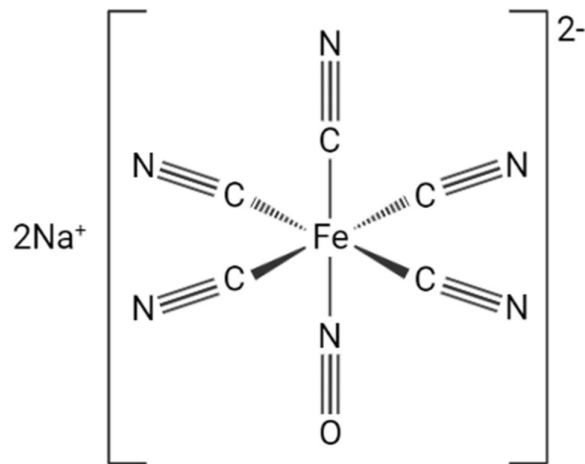


Abbildung 5: Chemische Struktur von SNP (Erstellt mit BioRender.com).

SNP wurde 1974 erstmals als Vasodilator von der FDA für die Behandlung schwerer Hypertension freigegeben, obwohl es bereits 1849 von *Playfair* entdeckt wurde (Hottinger et al., 2014). Seitdem wurde es klinisch bei kardiologischer Chirurgie, hypertensiven Krisen, Herzversagen, vaskulärer Chirurgie, Kinderchirurgie und anderen akuten Fällen eingesetzt. Im weiteren Verlauf wurden vermehrt Bedenken bezüglich der zusätzlichen Freisetzung von Cyanid geäußert, weshalb der Einsatz verringert wurde. Bis heute wird SNP jedoch bei akuten Fällen in denen ein

schnellwirkender, potenter Vasodilator benötigt wird, eingesetzt (Holme & Sharman, 2021).

In Lebewesen reagiert es mit den Sulfhydrylgruppen von Erythrozyten, Albumin und anderen Proteinen wobei es neben Cyanid NO freisetzt.

1.4.2. 1-Nitrosocyclohexyl Acetat

1-Nitrosocyclohexyl Acetat (NCA) ist eine lichtempfindliche bläuliche Lösung mit einer molaren Masse von 171,19 g/Mol (Axon Medchem, 2022).

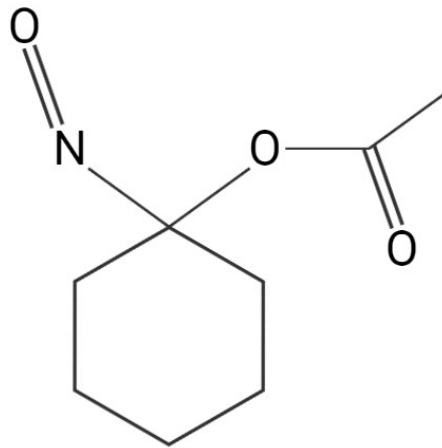


Abbildung 6: Chemische Struktur von 1-Nitrosocyclohexyl Acetat (Erstellt mit BioRender.com).

NCA ist ein HNO-Donor, welcher HNO, Essigsäure und Cyclohexanon, mit den Nebenprodukten NO, Nitrit und Nitrat, abgibt (Shoman et al, 2011). Die Abgabe erfolgt bei neutralem pH-Wert über mehrere Stunden mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 800-890$ Minuten mit <1% NO- und 3-4% Nitrit/Nitrat-Abgabe (Donzelli et al., 2013). Die konstante Abgabe von HNO über einen langen Zeitraum macht NCA zu einem wichtigen Mitglied der HNO-Donoren, da eine sofortige Abgabe von HNO eine zunächst hohe Konzentration und anschließende Dimerisierung zur Folge hat (Donzelli et al., 2013). Gleichzeitig bedeutet die unreine Abgabe von HNO, dass der vasodilatatorische Effekt von NCA nicht rein auf Abgabe von HNO und damit verbundener Oxidation der PKG basiert. Er wird zusätzlich verstärkt durch

Nebenprodukte, dessen Stimulation der GC und anschließende Aktivierung der PKG durch erhöhten cGMP-Spiegel den Effekt beeinflussen (Shoman et al, 2011).

1.4.3. CXL-1020

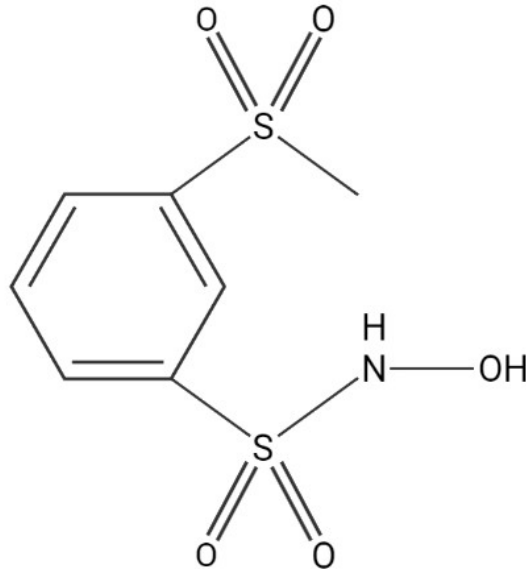


Abbildung 7: Chemische Struktur von CXL-1020 (Erstellt mit BioRender.com). CXL-1020 (CXL) ist ein weißer Feststoff mit einer molaren Masse von 251,28 g/Mol (Axon Medchem, 2022).

CXL ist ein HNO-Donor, welcher in HNO und ein organisches Nebenprodukt CXL-1051 zerfällt. Das Nebenprodukt ist hierbei biologisch inert und wird in Lebewesen unverändert über den Urin ausgeschieden (Zhu et al., 2015). Bei einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 2$ Minuten und seiner Eigenschaft als purer HNO-Donor, eignet sich CXL exzellent um vasodilatatorische Effekte, vermittelt durch HNO, zu untersuchen (Sabbah et al., 2013).

Bei adulten ventrikulären Maus Myozyten bewirkt CXL eine Verkürzung der Relaxationszeit eines Sarkomers und Verlängerung der Kontraktionszeit in Abhängigkeit von der Konzentration sowie eine Steigerung des Calciumionen Umsatzes um etwa 30%. In Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz zeigt CXL darüber hinaus Erfolge bei der Reduzierung systematischen, vaskulären Widerstandes und Fülldruckes beider Herzhälften. In Zuge dessen sank der

arterielle Druck leicht (Sabbah et al., 2013). Auf Basis dieses Wirkmechanismus induziert es Vasorelaxation durch einen vasodilatatorischen Effekt, akute positive Inotropie und Lusitropie (Roof et al., 2017).

1.5. 3-Isobutyl-1-methylxanthin

Die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegel mittels Aktivierung von Guanylatzyklase durch NO-Donoren ist eine gängige Art Vasodilatation in Patienten zu bewirken. Ein erhöhter cGMP-Spiegel kann darüber hinaus durch Inhibition von Phosphodiesterasen (PDE) erreicht werden.

PDE hydrolysieren die *second messenger* cGMP und cAMP. Innerhalb vaskulärer glatter Gefäßmuskelzellen befinden sich, neben Weiteren, die Phosphodiesterase V (PDE5) (Rybalkin et al., 2002). PDE5 wird intrazellulär von der PKG1 aktiviert. Daraufhin zersetzt PDE5 spezifisch cGMP und bewirkt rückwirkend einen sinkenden Spiegel der cGMP-Konzentration und so eine verminderte Aktivität der PKG1. Aufgrund dessen werden PDE5, beziehungsweise PDE Inhibitoren neben NO-Donoren genutzt, um einen ähnlichen vasodilatatorischen Effekt und Steuerung der Kontraktion zu erreichen.

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) ist ein nicht spezifischer PDE Inhibitor und inhibiert somit auch PDE5 (Sigma-Aldrich, 2022).

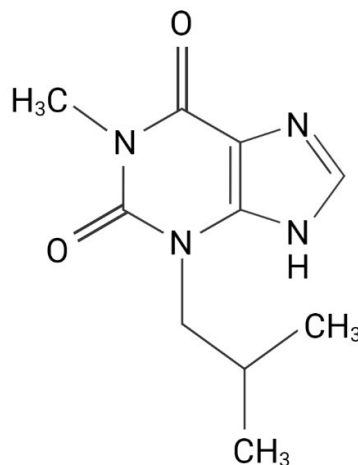


Abbildung 8: Chemische Struktur von 3-isobutyl-1-methylxanthine (Erstellt mit BioRender.com).

1.6. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer Modulation intrazellulärer cGMP-Spiegel zu untersuchen und mit Hilfe des Biosensors cGi500 die alternative Oxidantien-vermittelte Aktivierung der PKG durch HNO-Donoren zu charakterisieren. Weiterhin sollte in dieser Arbeit die Aktivität der endogenen PKG1 α nach Exposition mit SNP, NCA und IBMX in murinen vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen nach Transduktion mit dem AKAR3 Adenovirus untersucht werden.

2. Materialien

2.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Corning™ Costar™ Mikrotiterplatte (96-Well)	Thermo-Fisher Scientific
Kosmetiktücher	Tapira
Mundschutz	Farstar Medical
Parafilm	Thermo-Fisher Scientific
Nunc™ MicroWell™ Mikrotiterplatte (96-Well)	Thermo-Fisher Scientific
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt
Serologische Pipetten (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt
Untersuchungshandschuhe aus Nitril	Ansell
Zellkulturröhrchen, steril (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio One
Zellkulturplatten (6-Well)	Greiner Bio One
Zellkulturschale (10 cm)	Sarstedt

2.2. Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-jet Pro	BRAND
CO ₂ Inkubator Heracell 240™	Thermo-Fisher Scientific
Feinwaage	Sartorius
FlexStation 3 Multi-Mode Mikroplatten Reader	Molecular Devices
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
FRET-Mikroskop	Leica DMI3000 B
Mikroskop	Zeiss
Neubauer Zählkammer	Hecht Assistent
Pipetten (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Eppendorf
Vortex Wasserbad	GFL Gesellschaft Fuer Labortec
Waage	Ohaus
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich

2.3. Medien und Reagenzien

Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Medien und Reagenzien

Medien und Reagenzien	Zusammensetzung
Basislösung für die Enzymlösungen zur Isolierung von VSMC	Ca ²⁺ freies Medium Natriumglutamat (85 mM) NaCl (60 mM) HEPES (10 mM) KCl (5,6 mM) MgCl ₂ + 6 H ₂ O (1 mM) pH 7,4
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Low Glucose</i> 10% FCS 1% L-Glutamin (200 mM) 1% Pen Strep (10.000 Units/mL Penicillin, + 10.000 µg/mL Streptomycin)
Enzymlösung 1 zur Isolierung von VSMC	Basisenzymlösung Papain (0,7 mg/mL) BSA (1 mg/mL) DTT (1 mg/mL)
Enzymlösung 2 zur Isolierung von VSMC	Basisenzymlösung mit Hyaluronidase (0,7 mg/mL), Collagenase (1 mg/mL), BSA (1mg/mL)
FRET Puffer	NaCl (144 mmol/L) KCl (5,4 mmol/L) MgCl ₂ (1 mmol/L) CaCl ₂ (1 mmol/L) HEPES (10 mmol/L) ddH ₂ O pH 7,3

2.4. Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich
CXL-1020	Axon Medchem
Collagenase	Sigma Aldrich
DMSO	Sigma Aldrich
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Low Glucose</i>	Sigma Aldrich
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	Gibco
DTT	Thermo-Fisher Scientific
FCS	Gibco
HEPES	Sigma Aldrich
Hyaluronidase	AppliChem
Hygromycin B	Invitrogen
IBMX	AppliChem
KCl	Sigma Aldrich
L-Glutamine	Gibco
MgCl ₂ + 6 H ₂ O	AppliChem
Mononatriumglutamat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	J.T. Baker
NCA	Axon Medchem
Papain	Sigma Aldrich
Pen Strep	Gibco
SNP	Sigma Aldrich
Trypanblau	Gibco
Trypsin-EDTA	Gibco

3. Methoden

3.1. Zellkultur-Techniken

3.1.1. HEK293 Zellen – Wildtypen und Mutanten

Bei den für die FRET Messungen verwendeten Zellen handelt es sich um HEK293 Zellen, welche in vorhergegangenen Experimenten mit dem cGi500 Biosensor von Russwurm et al. 2019 stabil transfiziert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden vier Varianten transfiziert, eine Variante mit dem Wildtyp des cGi500 Biosensors (Wildtype cGi500) und drei Mutanten, dessen PKG1 Sequenz durch CRISPR Technologie verändert wurde. Die erste Mutante beinhaltet statt einem Cystein an Position 117 ein nicht oxidierbares Serin (C117S cGi500), die zweite Mutante die gleiche Änderung an Position 195 und die letzte Mutante beide Änderungen (C117/195S cGi500).

Zusätzlich wurden in der Vergangenheit einige Zellen aller Mutanten mit einem Adenovirus, welcher die SponGee Sequenz beinhaltet, transfiziert und gestellt (Wildtype SponGee, C117S SponGee, C195S SponGee, C117/195S SponGee).

3.1.2. Auftauen von HEK293 Zellen

Dem Auftauen der HEK293 Zellen vorlaufend, findet die Erwärmung eines Wasserbades und eines Kulturmediums, bestehend aus DMEM mit Zusätzen, auf 37°C statt. Anschließend erfolgt die Entnahme der in Flüssigstickstoff gefrorenen Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstofftank und eine dreiminütige Erwärmung der Röhrchen im Wasserbad. Im Anschluss an das Auftauen der Zellen im Kryomedium, findet die Pipettierung unter einer S2 Sicherheitswerkbank in ein 15 mL Falconröhrchen mit 10 mL vorgelegtem Kulturmedium statt. Das Falconröhrchen wird anschließend für 5 Minuten bei 850 rpm zentrifugiert, sowie im Anschluss der Überstand unter einer S2 Sicherheitswerkbank abgesaugt. Erneut werden 10 mL Kulturmedium in das Falconröhrchen gegeben und die Zellen resuspendiert. Die Zellen werden mit einer 10 mL Pipette auf eine 10 cm Zellkulturschale hinzugegeben und bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert.

3.1.3. Zellkultur

Erreichen die Zellen eine Konfluenz von 80-100% erfolgt die Ablösung, sowie Suspendierung und neues Ausplattieren. Vor Beginn erfolgt zunächst die Vorwärmung des Kulturmedium, Phosphatgepufferter Saline (PBS) und mit PBS 1:5 verdünnte Trypsin/EDTA- Lösung auf 37 °C. Die Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale werden dem CO₂ Inkubator entnommen, unter einer S2 Sicherheitswerkbank wird das alte Kulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 5 mL vorgewärmtem PBS mit einer 10 mL Pipette pro Schale gewaschen. Das PBS wird mit einer neuen Glaspipette abgesaugt und anschließend wird 1 mL verdünnte Trypsin/EDTA Lösung, welche verschiedene Proteasen zur Dissoziation der Zellen enthält, mit einer 5 mL Pipette hinzugegeben. Die Zellen werden mit Trypsin/EDTA 5-10 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 37 °C im Inkubator inkubiert.

Zeitgleich erfolgt die Beschriftung neuer 10 cm Zellkulturschalen mit Initialen, Datum, Passagennummer und Zelllinie. In den neuen Zellkulturschalen werden 10 mL vorgewärmtes Kulturmedium vorgelegt.

Nach der Inkubation folgt die Zugabe von 4 mL vorgewärmtes Kulturmedium zu den Zellen mit einer 10 mL Pipette. Restliche, ungelöste Zellen werden durch Auf- und Abpipettieren gelöst und suspendiert. Von dem Zellsuspendat werden Volumina entsprechend der Verdünnung, welche abhängig von der Dichte des Zellrasens auf der Zellkulturplatte ist, dem vorgelegten Kulturmedium auf der neuen Zellkulturplatte zugegeben.

Falls erforderlich erfolgt zusätzlich die Zugabe von Antibiotika. Dabei handelt es sich um G418 bei HEK293-Zellen, welche mit dem Biosensor cGi500 stabil transfiziert wurden, beziehungsweise G418 und Hygromycin B bei HEK-Zellen, welche mit dem Biosensor cGi500 und dem Pufferprotein SponGee stabil transfiziert wurden. Es werden jeweils 40 µL G418 und 10 µL Hygromycin mit einer 100 µL Pipette pro 10 cm Zellkulturplatte hinzugegeben. Anschließend erfolgt erneut eine Durchmischung der Zellkulturplatte, sowie die Inkubation der Zellen bei 37°C und 7% CO₂.

3.1.4. Vorbereitung einer 96-Well Mikrotiterplatte zur späteren Vermessung mit der FlexStation 3

Bei einer Konfluenz von 90-100% erfolgt die Waschung der HEK293-Zellen, welche anschließend abgelöst, suspendiert und auf einer 96-Well Mikrotiterplatte zur Vermessung mit der FlexStation 3 (Molecular Devices, San José) am nächsten oder übernächsten Tag ausgesät werden.

Zunächst werden Kulturmedium, PBS und in PBS 1:5 verdünnte Trypsin/EDTA Lösung auf 37 °C vorgewärmt. Das alte Kulturmedium der 10 cm Zellkulturplatten wird unter einer S2 Sicherheitswerkbank mit einer Glaspipette abgesaugt. Anschließend folgt die Zugabe von 5 mL PBS mit einer 10 mL Pipette, welches mit einer neuen Glaspipette hinterher wieder abgesaugt wird. Des Weiteren erfolgt die Zugabe 1 mL vorgewärmter, verdünnter Trypsin/EDTA Lösung und Inkubierung auf der Zellkulturplatte. Währenddessen erfolgt die Vorlegung von 5 mL vorgewärmten Kulturmedium in 15 mL Falconröhrchen mithilfe einer 10 mL Pipette.

Lassen sich die Zellen lösen, werden 4 mL vorgewärmtes Kulturmedium mit einer 10 mL Pipette auf die Zellkulturplatte gegeben und restliche, ungelöste Zellen durch Auf- und Abpipettieren gelöst und suspendiert. Die 5 mL Zellsuspendat werden in das, mit Kulturmedium vorgelegte, 15 mL Falcontube gegeben und durch Vortexen gemischt. Anschließend erfolgt die Entnahme von 40 µL Zellsuspendat und die Zugabe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß. Das Falconröhrchen wird anschließend vor der weiteren Verwendung in den Inkubator bei 37 °C und 7% CO₂ gestellt.

Zu den 40 µL Zellsuspendat werden 40 µL Kulturmedium und 20 µL Trypan Blau Lösung gegeben. Diese Mischung wird erneut gevortext und anschließend auf eine saubere Neubauerkammer zur Ermittlung der Zelldichte im Falconröhrchen gegeben. Die Zelldichte wird unter einem Mikroskop bestimmt und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor von 2,5 multipliziert, um die Zelldichte im Falconröhrchen zu erhalten.

Für die Messung an der FlexStation 3 werden auf einer 96-Well Mikrotiterplatte mit schwarzen Wänden entweder 22.000 Zellen für eine Messung am nächsten Tag oder 17.000 Zellen für eine Messung am übernächsten Tag benötigt. In einem Well

werden jeweils insgesamt 100 µL Kulturmedium hinzugeben. Die Berechnung des benötigten Zellsuspendat aus dem 15 mL Falconröhrchen pro Well für die geforderte Zellzahl, sowie zusätzliches Kulturmedium, findet nach folgender Formel statt.

$$\frac{x}{y} \cdot 100 \mu\text{L} = \text{Zellsuspendat pro Well}$$

[x = gewünschte Zellzahl pro Well und 100 µL; y = Zelldichte im Falconröhrchen]

$$\text{hinzuzufügendes Kulturmedium} = 100 \mu\text{l} - \text{Zellsuspendat}$$

Das errechnete Kulturmedium wird mit einer 50 µL Multikanalpipette auf der 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt, anschließend erfolgt die Zugabe des errechneten Volumens des Zellsuspendat. Die Platte wird Initialen, Datum, Zelllinie und Zellzahl pro Well versehen und anschließend bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert.

Das restliche Zellsuspendat wird entweder verworfen oder entsprechend der Zellkulturmethode weiter in Kultur gehalten.

Für die verschiedenen Messungen werden jeweils vier Zelltypen in jeweils zwei Reihen der 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Für die Messung zum Vergleich der einzelnen Mutanten, welche alle das Pufferprotein SponGee enthalten, werden entsprechend Abbildung 9 die Wildtyp, C117S, C195S und C117/195S Zellen genutzt, bei der Messung zum Vergleich von Zellen mit und ohne SponGee werden entsprechend Abbildung 10 Wildtyp und C117/195S Zellen beider Varianten genutzt.

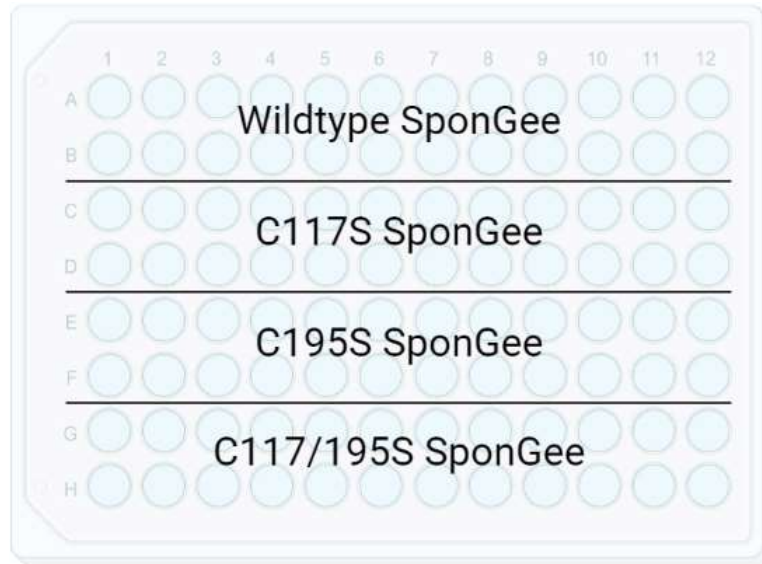


Abbildung 9: Ausplattierschema der SponGee exprimierenden Zellen (Erstellt mit BioRender.com).

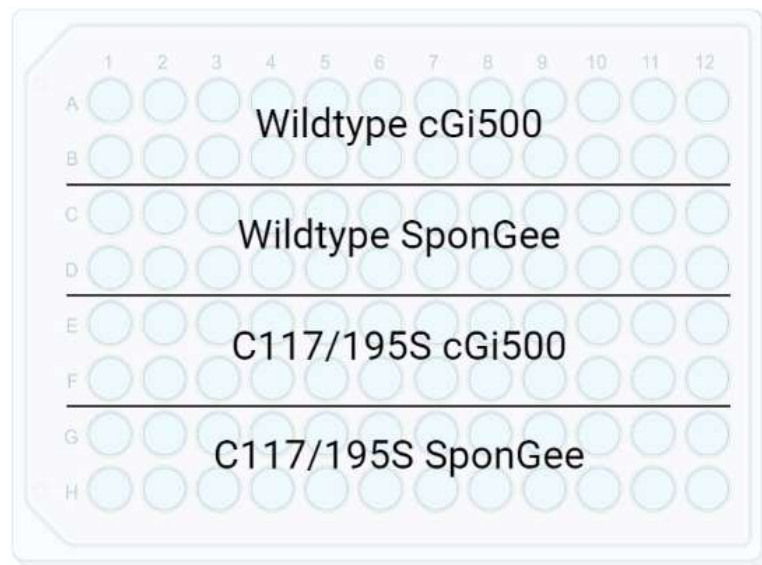


Abbildung 10: Ausplattierschema der Zellen der Zellen, welche nur cGi500, und cGi500 und SponGee exprimieren (Erstellt mit BioRender.com).

3.2. Messung an der FlexStation 3

3.2.1. Vorbereitung der NO- und HNO-Donoren Verdünnungsreihen

Der Messung vorausgehend werden zunächst die Verdünnungsreihen der jeweiligen Zugaben vorbereitet. Dabei wird unterschieden zwischen Messungen mit NCA, SNP und CXL. Alle Vorbereitungen und Schritte mit den Zugaben finden in einem abgedunkelten Raum statt. Bei der Messung mit NCA und SNP wird jeweils die gesamte Mikrotiterplatte vorbereitet, bei CXL Zugaben wird das CXL, aufgrund der geringen Stabilität in FRET Puffer, vor der Messung einer Spalte jeweils frisch angesetzt. Alle Konzentrationen sind das 6,66-fach konzentriert gegenüber der zu messenden Endkonzentration, da bei der Zugabe eine Verdünnung erfolgt.

3.2.1.1. Vorbereitung der SNP Zugaben

Von dem in kristalliner, rötlicher Form vorliegenden SNP werden 15 mg in ein lichtabschirmendes Reaktionsgefäß abgewogen. Unter Zugabe von 1 mL FRET Puffer wird eine Konzentration von 50 mM in dem Reaktionsgefäß erreicht. Im weiteren Verlauf wird nach dem Pipettierschema in Abbildung 11 verdünnt und die einzelnen Konzentrationen zum Messen vorbereitet:

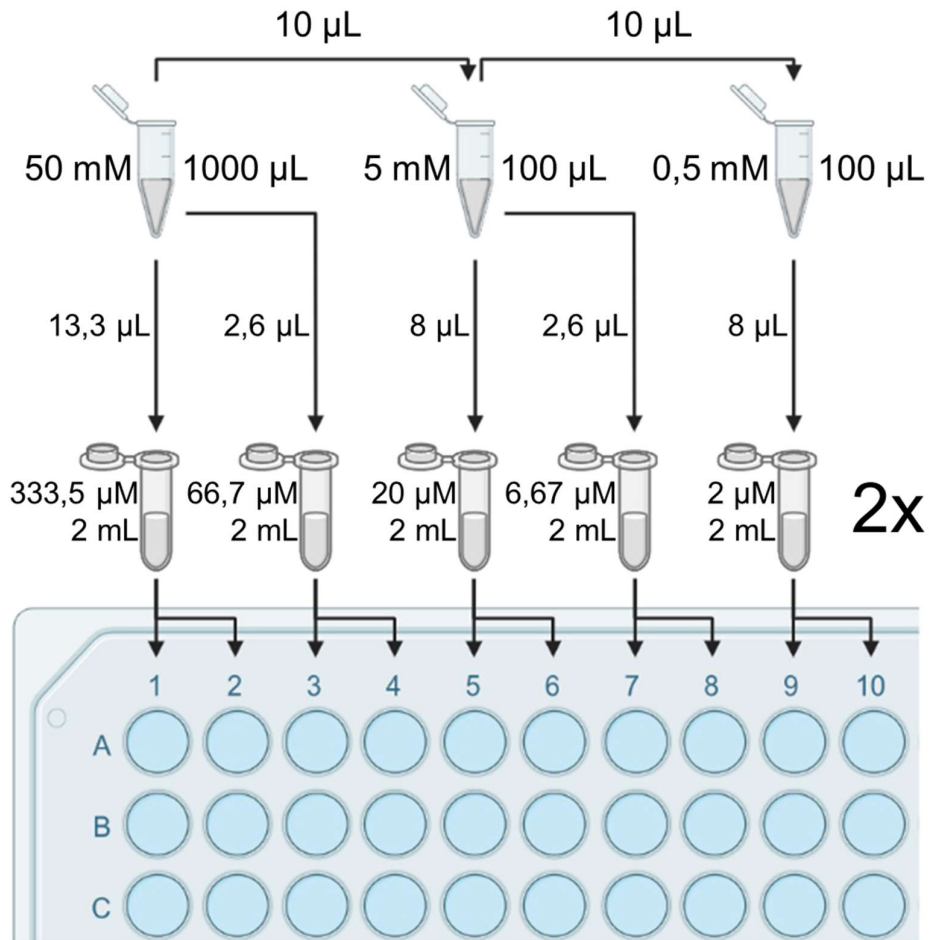


Abbildung 11: Verdünnungsschema von SNP zum Pipettieren auf die 96-Well Mikrotiterplatte.

Die 1,5 mL Reaktionsgefäße sind lichtabschirmend und in dem zweiten und dritten Reaktionsgefäßen werden jeweils 36 µL DMSO vorgelegt. In den 2 mL Reaktionsgefäßen werden jeweils 1980 µL bzw. 1993 µL FRET Puffer vorgelegt. Vor jeder weiteren Verdünnung und Auftragung am Ende werden die Reaktionsgefäße durch vortexen gemischt. Pro Well werden 200 µL SNP-Lösung pipettiert (Erstellt mit BioRender.com).

3.2.1.2. Vorbereitung der NCA Zugaben

NCA liegt in 5 mg Aliquots in lichtabschirmenden 1,5 mL Reaktionsgefäßen bei -20 °C eingefroren vor. Ein 5 mg Aliquot wird aufgetaut und mit 100 µL DMSO mithilfe einer 100 µL Pipette vermischt. In dem Reaktionsgefäß ergibt sich eine Konzentration von 200 mM. Im weiteren Verlauf wird nach dem Pipettierschema in Abbildung 12 verdünnt und die einzelnen Konzentrationen zum Messen vorbereitet:

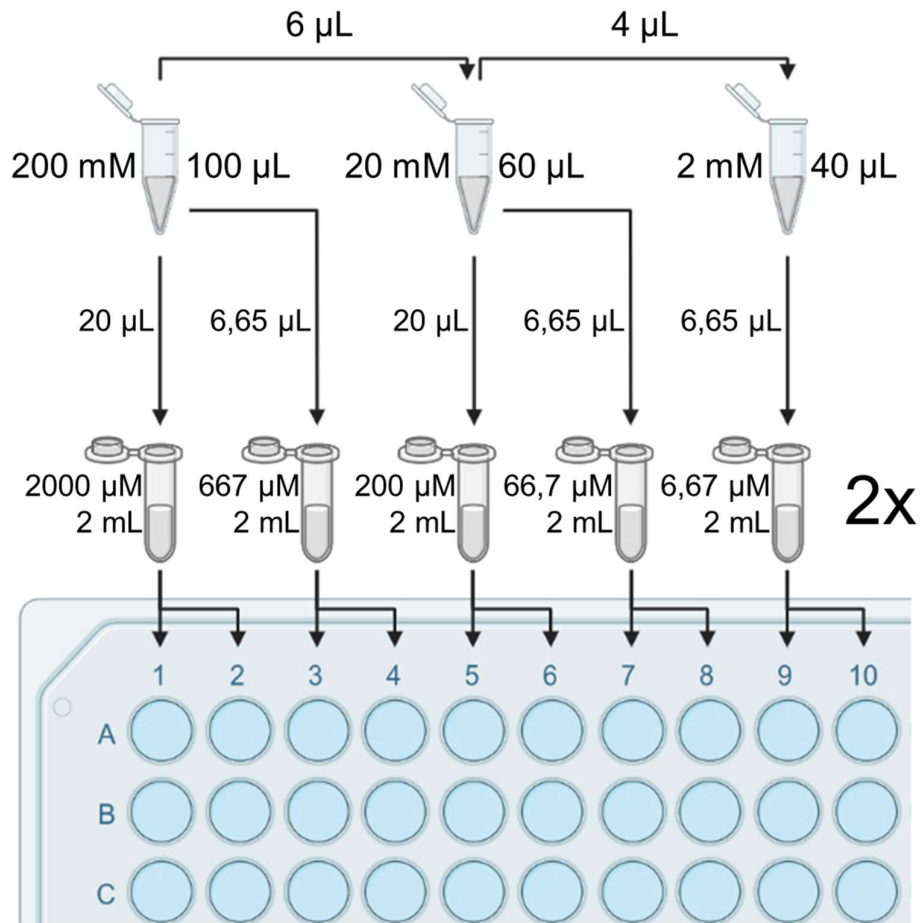


Abbildung 12: Verdünnungsschema von NCA zum Pipettieren auf die 96-Well Mikrotiterplatte.

Die 1,5 mL Reaktionsgefäße sind lichtabschirmend und in dem zweiten und dritten Reaktionsgefäß werden jeweils 36 µL DMSO vorgelegt. In den 2 mL Reaktionsgefäßen werden jeweils 1980 µL bzw. 1993 µL FRET Puffer vorgelegt. Vor jeder weiteren Verdünnung und Auftragung am Ende werden die Reaktionsgefäße durch vortexen gemischt. Pro Well werden 200 µL NCA-Lösung pipettiert (Erstellt mit BioRender.com).

3.2.1.3. Vorbereitung der CXL Zugaben

CXL liegt bei -20°C gefroren in Pulverform in 1 mg oder 2 mg vor. Dem CXL werden zur Lösung jeweils $20\ \mu\text{L}$ bzw. $40\ \mu\text{L}$ DMSO zugeben. Die Lösung mit einer Konzentration von $200\ \text{mM}$ wird in ein lichtabschirmendes Reaktionsgefäß überführt. Im weiteren Verlauf wird nach dem Pipettierschema in Abbildung 13 verdünnt und die einzelnen Konzentrationen zum Messen vorbereitet.

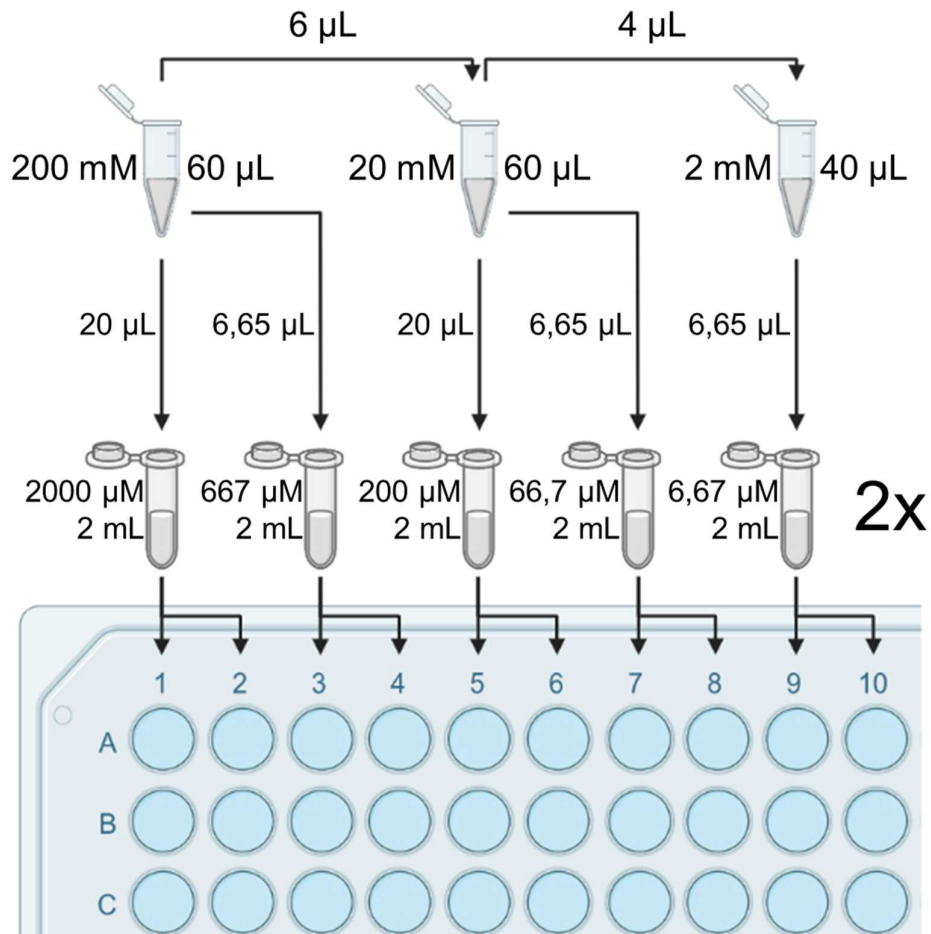


Abbildung 13: Verdünnungsschema von CXL zum Pipettieren auf die 96-Well Mikrotiterplatte.

Die $1,5\ \text{mL}$ Reaktionsgefäße sind lichtabschirmend und in dem zweiten und dritten Reaktionsgefäß werden jeweils $36\ \mu\text{L}$ DMSO vorgelegt. In den $2\ \text{mL}$ Reaktionsgefäßen werden jeweils $1980\ \mu\text{L}$ bzw. $1993\ \mu\text{L}$ FRET Puffer vorgelegt. Vor jeder weiteren Verdünnung und Auftragung am Ende werden die Reaktionsgefäße durch vortexen gemischt. Pro Well werden $200\ \mu\text{L}$ CXL-Lösung pipettiert (Erstellt mit BioRender.com).

3.2.2. FRET Messungen mit HEK293 Zellen

Für die FRET Messungen der HEK293 Zellen wird der FlexStation 3 Multimodus-Mikroplatten-Reader von *Molecular Devices* genutzt.

Die 96-Well Mikrotiterplatte mit den Zellen wird auf Tüchern entleert, um altes Kulturmedium zu entfernen. Mittels 300 μL Multikanalpipette wird vorsichtig, ohne die Zellen abzulösen, pro Well 170 μL frischer FRET Puffer bei Raumtemperatur pipettiert. Die 96-Well Mikrotiterplatte wird anschließend in das untere Fach der FlexStation 3 gestellt. Nachfolgend erfolgt das Stellen der Compound-Mikrotiterplatte in das mittlere Fach, sowie das Stellen der Pipettenspitzen in das obere Fach der FlexStation 3.

Mittels SoftMax Pro Software (Molecular Devices, San José) wird das Gerät gesteuert und eingestellt. Das Gerät misst hierbei die Fluoreszenz in Relative Fluoreszenz Einheiten (RFU) bei den eingestellten Wells. Die Messung einer Spalte auf der 96-Well Mikrotiterplatte erfolgt über 20 Minuten, mit Messungen aller Wells alle 10 Sekunden. Nach 10 Messungen bzw. 100 Sekunden erfolgt die Zugabe von 30 μL Compound von der eingestellten Spalte der Compound-Mikrotiterplatte zu den 170 μL FRET Puffer auf den Zellen, wodurch sich folgende Konzentrationen in den Wells ergeben:

Tabelle 5: Verteilung der einzelnen chemischen Verbindungen mit dessen Konzentrationen auf den Zellen.

Verbindungen	Konzentration auf den Zellen [μM]				
SNP	50	10	3	1	0,1
NCA	300	100	30	10	1
CXL	300	100	30	10	1

Bei Messungen mit NCA und SNP können alle Parameter auf die gesamte 96-Well Mikrotiterplatte übernommen werden und die Messungen aneinandergereiht werden. Aufgrund seiner geringen Halbwertszeit muss CXL vor jeder Messung frisch angesetzt werden.

Nach Abschluss der Messungen wird die Mikrotiterplatte mit den Zellen und den Compounds fachgerecht entsorgt und die Pipettenspitzen der FlexStation 3 mit ddH₂O gereinigt.

3.3. Isolation und Transduktion vaskulärer glatter Gefäßmuskelzellen

3.3.1. Vorbereitung

Vor Beginn der Isolation der vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) werden Pinzetten und Scheren im Autoklav sterilisiert. Ferner wird für zwei Enzymlösungen eine Basisenzymlösung angesetzt. Diese besteht aus Ca²⁺-freiem Kulturmedium, 85 mM Natriumglutamat, 60 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5,6 mM KCl und 1 mM MgCl₂ + 6 H₂O. Der pH-Wert der Lösung wird mit HCl und NaOH auf 7,4 eingestellt. Dieser Basislösung werden für die erste Enzymlösung 0,7 mg/mL Papain, 1 mg/mL BSA und 1 mg/mL DTT hinzugefügt. Der zweiten Enzymlösung werden 0,7 mg/mL Hyaluronidase, 1 mg/mL Collagenase und 1 mg/mL BSA zugegeben. Die Enzymlösungen werden in lichtabschirmenden 1,5 mL Reaktionsgefäßen in 500 µL Aliquots aufgeteilt und bis zum Einsatz bei -20 °C eingefroren.

3.3.2. Isolation

Der Isolation vorhergehend werden sterile Pinzetten und Scheren, mit Plastik überzogene Korkuntersetzer, Pins zum Fixieren der Mäuse, PBS Puffer, Petri-Schalen, eine Stoppuhr, ein Schwimmer für das auf 37°C erhitzte Wasserbad, eine 6-Well Platte und 10 mL steriles und erwärmtes Kulturmedium bereitgelegt. Die Enzymlösungen eins und zwei werden auf Eis aufgetaut.

Die Isolation beginnt mit der Euthanasie der Versuchsmäuse mit vorheriger Betäubung mit CO₂ unter einer Plastikglocke durch einen Befugten. Anschließend wird die Maus auf der Korkunterlage mit Pins auf dem Rücken fixiert und der Bauch mit 70% Ethanol gereinigt. Der Bauch der Maus wird in der Mitte aufgeschnitten und der Brustkorb durch Entlangschneiden an den Rippen geöffnet. Der Brustkorb wird von unten aufgeklappt und die Aorta unter den Organen freigelegt. Die Unterseite der Aorta wird durchtrennt und posterior der Aorta entlang der Wirbelsäule kranial in Richtung Herzen geschnitten. Dort wird die Oberseite der Aorta durchtrennt und

sie daraufhin in Petrischalen mit PBS gelegt. In dem PBS wird die Aorta von Fettgewebe befreit und gereinigt.

Bis zu drei Aorten werden in ein Aliquot mit der Enzymlösung 1 überführt und für 45 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgt die Überführung in ein Aliquot der Enzymlösung 2 und die Inkubation für weitere 20 Minuten im Wasserbad. Das Reaktionsgefäß wird nach 5 Minuten durch Schwenken durchmischt. Nach 5 weiteren Minuten wird die Lösung alle 5 Minuten bis zum Ende durch Auf- und Abpipettieren durchmischt.

Die Zellsuspension wird anschließend unter einer S2 Sicherheitswerkbank in die vorgewärmten 10 mL Kulturmedium überführt. Zur Sedimentation von Zelldebris wird die Suspension für 3 Minuten ruhen gelassen. Im Anschluss werden 9 mL des Überstandes in ein leeres 15 mL Falconröhrchen überführt und 5 Minuten bei 850 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in 12,5 mL frischem vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Das Resuspendat wird zu jeweils 250 µL pro Well in 49 Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte ausplattiert. Die Platte wird mit Initialen, Datum und Zelllinie beschriftet und bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert.

3.3.3. Transduktion der VSMC

Die Transduktion wurde übernommen von Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev. Bei der Transduktion wird von 20.000 Zellen pro Well bei 48 Wells ausgegangen und ein MOI 100 angewendet. Entsprechend werden 96 Millionen Viruspartikel insgesamt beziehungsweise 2 Millionen Viruspartikel pro Well hinzugegeben. Der vorhandene AKAR3 Virus besitzt einen Titer von $5,4 \times 10^7$ Partikel/µL, weshalb 1,77 µL Virus für die Transduktion der 48 Wells unter einer S2 Sicherheitswerkbank genutzt werden. Anschließend wird die 96-Well Mikrotiterplatte bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert.

Nach einer Woche werden die Zellen mit 1:5 Trypsin/EDTA Lösung unter einer S2 Sicherheitswerkbank gelöst und mit 250 µL frischem, auf 37 °C vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Der Inhalt aus acht Wells wurden jeweils in ein Well einer 6-Well Zellkulturplatte, mit Deckgläsern, gegeben. Die Zellkulturplatte wird erneut bis zur Messung etwa eine Woche bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert.

3.4. FRET Messungen mit VSMC

Für die Messungen einzelner VSMC wird das Leica DMI 3000 B, ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop, für die FRET Messungen einzelner Zellen verwendet. Hierbei werden ein mit 1.40 Öl bedecktes Plan Apo λ 60x Objektiv, sowie ein Photometrics Dual-View DV2 Strahlteiler mit DV2-cube 05-EM Filterwürfel genutzt. Die Bildübertragung erfolgt mit dem Programm optiMOS CMOS Kamera (QIMAGING, Surrey) und wird mittels den Open Source Programmen μ Manager 1.4.5 (GitHub, San Francisco) und Image J (National Institutes of Health, Bethesda) zeitgleich ausgewertet.

Die Deckgläser mit den adhärenen VSMC werden zunächst in der Zellkammer des Mikroskops platziert und zur Beseitigung von toten und nicht adhärenen Zellen mit 400 μ L FRET Puffer gewaschen. Nach erneutem Zugeben von 400 μ L FRET Puffer erfolgt die Platzierung im Mikroskop und Anvisierung einer leuchtenden und somit erfolgreich transduzierten Zelle. Ist die Zelle scharf gestellt und gut sichtbar beginnt das Messen im Intervall von einer Sekunde. Nach etwa 10-12 Bildern wird zu einer Konzentration von 50 μ M SNP, 100 μ M NCA oder 300 μ M IBMX auf die Zellen zugegeben und nach Einstellung eines Plateaus bei den Messwerten erneut eine der anderen beiden chemischen Verbindungen zugegeben.

3.5. Auswertung der Daten mit Origin

Die Daten der Messung mit der FlexStation 3 werden zunächst aus der Software SoftMax Pro der FlexStation 3 in Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton) importiert. Hierbei werden ausschließlich die Endwerte der Messungen genutzt. Diese werden zunächst durch die Maximalwerte auf 0 bis 1 normiert. Die normierten Daten werden anschließend ausgewertet und mithilfe deskriptiver Statistik untersucht. Hierbei findet eine Betrachtung der Mittelwerte und Standardabweichung der Mittelwerte jeder Konzentrationsstufe der zugegebenen chemischen Verbindungen statt.

Diese werden graphisch dargestellt mit den Konzentrationen auf der Abszisse in logarithmischer Skalierung und den zugehörigen relativen Maximal FRET Antworten in Prozent. Zusätzlich wird ein sigmoidaler Fit angewendet, um die

halbmaximale Antwort (EC50) und eine Dosis-Wirkungskurve der Messungen zu erhalten.

3.6. Auswertung der Daten mit Excel

Die Daten der FRET Messungen der VSMC werden von Mikromanager in Excel 2019 (Microsoft Coporation, Redmond) importiert. Es wird der Kehrwert ermittelt, mit einem Korrekturwert der Mikroskop Einstellungen verrechnet und auf den Messwert bei der ersten Zugabe eines Stoffes normiert. Die mittlere relative Änderung der FRET Antwort bei Zugabe der jeweiligen Stoffe wird errechnet und graphisch als Balkendiagramm dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Selektion der HEK293 Klone mit dem Biosensor cGi500 und SponGee für die FRET Messungen

Den einzelnen FRET Messungen vorhergehend wurden Klone verschiedener Mutanten aufgetaut und in Kultur gebracht. Bei einer Konfluenz von 60%, wurden sie zu zwei Teilen gesplittet, von denen eine Zellkulturplatte weiter in Kultur gehalten wurde und eine andere unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert wurde. Die Fluoreszenz verschiedener Klone ist in Abbildung 14 dargestellt.

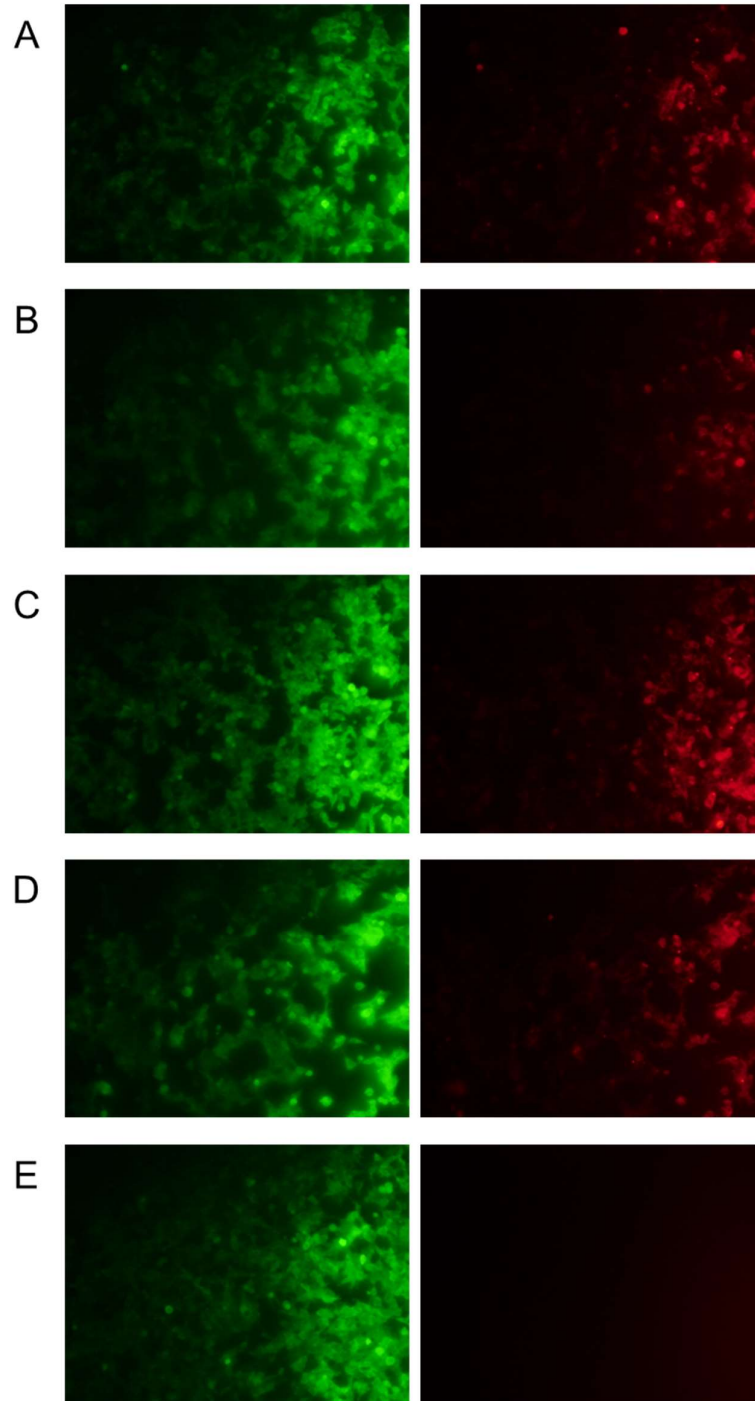


Abbildung 14: HEK293 Zellen mit cGi500 Fluoreszenz (grün) und SponGee Expression (rot).

In der Abbildung sind in im linken Bild und in Grün HEK293 Zellen abgebildet, welche aufgrund Variationen des Biosensor cGi500 fluoreszierten. Rechts sind in Rot HEK293 Zellen dargestellt, die das Pufferprotein SponGee exprimieren. A stellt Wildtyp SponGee Zellen, B C117S SponGee Zellen, C C195S SponGee Zellen, D C117/195S SponGee Zellen und E Wildtyp cGi500 Zellen dar.

Es wurden Unterschiede in der Stärke der Fluoreszenz zwischen den einzelnen Mutanten beobachtet. Die C117/195S SponGee Zellen zeigten die geringste Fluoreszenz des cGi500 Biosensors, die Wildtyp SponGee, C117S SponGee, C195S SponGee und Wildtyp cGi500 Zellen wiesen eine vergleichbare Fluoreszenz des cGi500 Biosensors auf. Die SponGee Fluoreszenz war bei den WT cGi500 Zellen nicht detektierbar und am geringsten bei den C117S SponGee und den C117/195S Zellen.

4.2. *In vitro* Messungen der Wildtyp, C117S, C195S und C177/195S cGi500 Mutanten ohne und mit SponGee

Bei ausreichender Konfluenz der Klone wurden sie entsprechend Kapitel 3.1.4 auf der 96-Well Mikrotiterplatten ausplattiert und am nächsten beziehungsweise übernächsten Tag an der FlexStation 3 vermessen. Für die Messungen wurde ein Programm verwendet, bei dem nach der zehnten Messung nach 100 Sekunden jeweils 30 µL SNP, NCA oder CXL zugegeben wurde und anschließend für weitere 1100 Sekunden gemessen wurde. Die Messung wurde automatisch beendet und je nach Einstellung begann direkt die folgende Messung oder es wurden neue Zugaben vorbereitet.

Für die Auswertung wurden die Endwerte der FRET Antwort der FlexStation 3 im Vergleich zu den Startwerten der jeweiligen Konzentration von SNP, NCA und CXL zugewiesen, gemittelt und ausgewertet. Die Kurven der FRET Antworten der Zellen der verschiedenen cGi500 Mutanten wurden bereitgestellt durch Julia Pflaumenbaum. Im Zuge dieser Bachelorarbeit wurden die Kurven von Zellen gleicher cGi500 Mutanten, welche zusätzlich SponGee exprimierten erhoben und mit den bereitgestellten Daten verglichen.

4.2.1. Wildtyp cGi500 mit SponGee

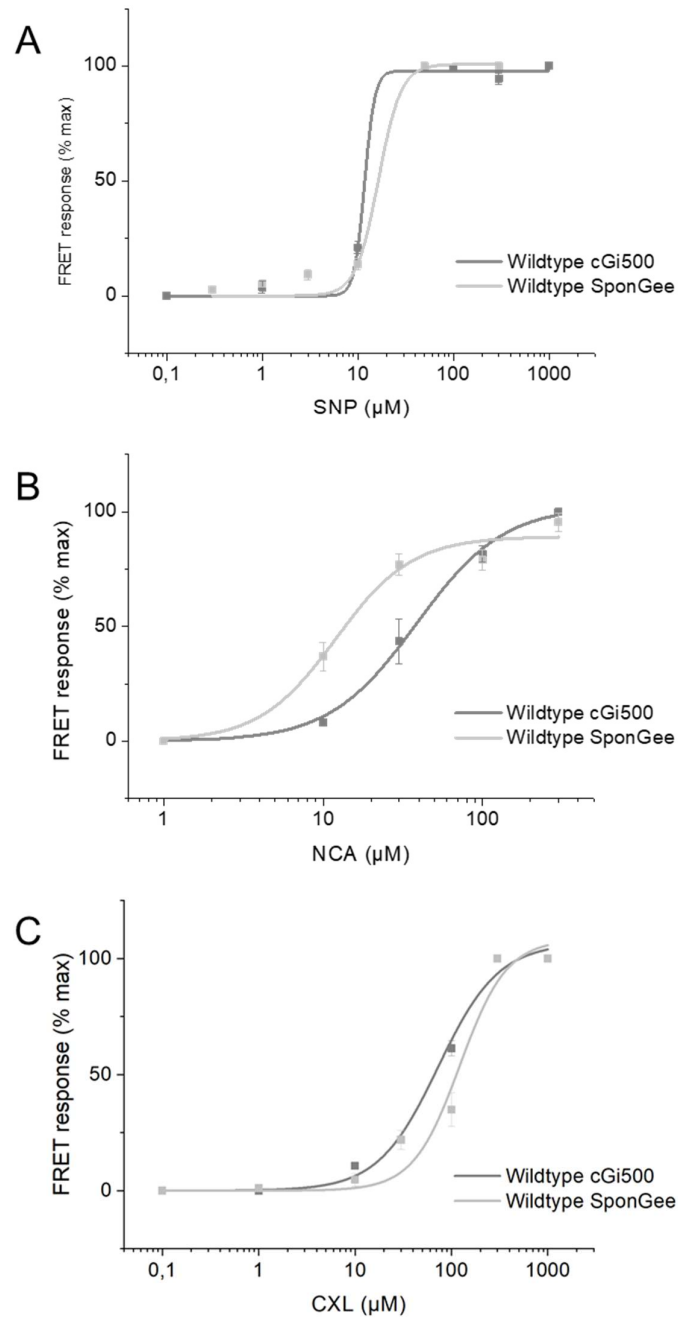


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort von HEK293 Zellen mit dem Wildtyp cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.

Hierbei ist die Antwort in Prozent normalisiert auf das Maximum angegeben und gegen die SNP (A), NCA (B) oder CXL (C) Konzentration in μM aufgetragen. Zu sehen ist der sigmoidale Hill-Fit zur Analyse.

Sowohl die Zellen, welche cGi500 exprimierten als auch die Zellen, die zusätzlich SponGee exprimierten zeigten bei SNP Zugabe einen vergleichbaren Kurvenverlauf insbesondere bei geringen und hohen SNP Konzentrationen. Das Plateau der SNP-vermittelten FRET Antwort wurde sowohl mit Wildtyp cGi500 als auch mit Wildtyp SponGee bei vergleichbaren SNP-Konzentrationen erreicht. Im Gegensatz dazu führten bereits Konzentrationen von 10 μM NCA bei den Wildtyp SponGee Zellen zu einem Anstieg der FRET Antwort, dargestellt als eine Linksverschiebung der Kurve im Vergleich zu Wildtyp cGi500. Das Plateau der Kurve wurde früher von den SponGee Zellen erreicht, die Kurve der Wildtyp cGi500 Zellen besaß einen flacheren Anstieg und bildete ein Plateau bei höherer Konzentration. Hierbei lässt sich erkennen, dass eine Depletion von cGMP durch Expression von SponGee die Zellen für die Oxidation sensitiviert. Niedrigere CXL Konzentrationen bewirkten erneut bereits einen Anstieg der Kurve der Wildtyp SponGee Zellen im Vergleich zu den Wildtyp cGi500 Zellen. Im weiteren Verlauf waren beide Kurven sehr ähnlich in Steigung und Plateau, der Anstieg der Kurve begann bei den SponGee Zellen bei etwa 0,5 μM und der Anstieg der Kurve der cGi500 Zellen bei etwa 10 μM .

4.2.2. C117S cGi500 mit SponGee

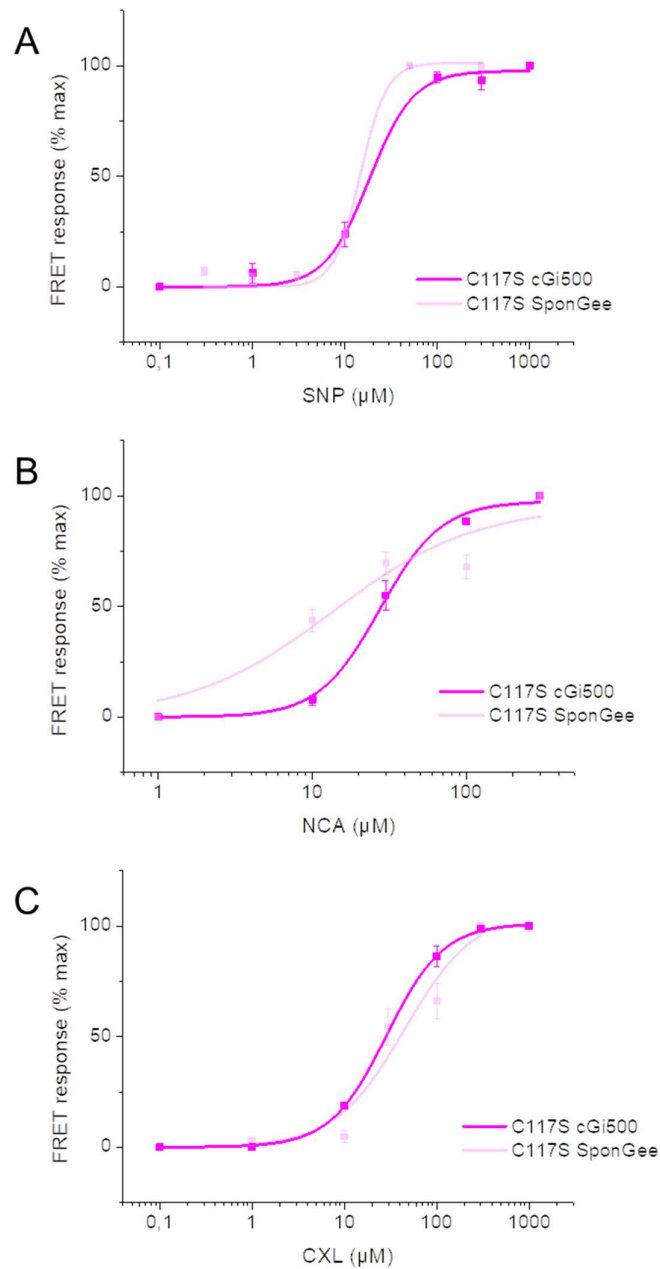


Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C117S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.

Hierbei ist die Antwort in Prozent normalisiert auf das Maximum angegeben und gegen die SNP (A), NCA (B) oder CXL (C) Konzentration in μM aufgetragen. Zu sehen ist der sigmoidale Hill-Fit zur Analyse.

Die C117S cGi500 Zellen zeigten einen flacheren Anstieg der Kurve bereits bei niedrigerer SNP Konzentration, dieser Anstieg führte zu einem späteren Plateau. Im Gegensatz dazu stieg die Kurve der C117S SponGee Zellen später mit einer stärkeren Steigung und erreichte das Plateau früher bei niedrigeren SNP Konzentrationen. Unter Gabe von NCA wiesen beide Kurven der C117S Zellen einen signifikanten Unterschied auf. Die cGi500 Zellen zeigten eine erste Reaktion bei 10 μ M NCA auf, im Gegensatz dazu reagierten die SponGee exprimierenden Zellen bereits sehr stark bei entsprechender Konzentration. Trotz unterschiedlicher FRET Antwort bei geringer NCA Konzentration, erreichte die Kurve der SponGee Zellen erst bei höherer NCA Konzentration ihr Plateau. Bei einer Zugabe von CXL verhielten sich die Kurven beider Zelltypen ähnlich. Die Kurve der C117S SponGee Zellen wiesen eine etwas flachere Steigung mit Plateau bei höherer Konzentration auf. Das lässt darauf schließen, dass die Abwesenheit von C117 die HNO-vermittelte Intradisulfidbrückenbildung verhindert und somit keine Änderung der Sensorkonformation erreicht wird.

4.2.3. C195S cGi500 mit SponGee

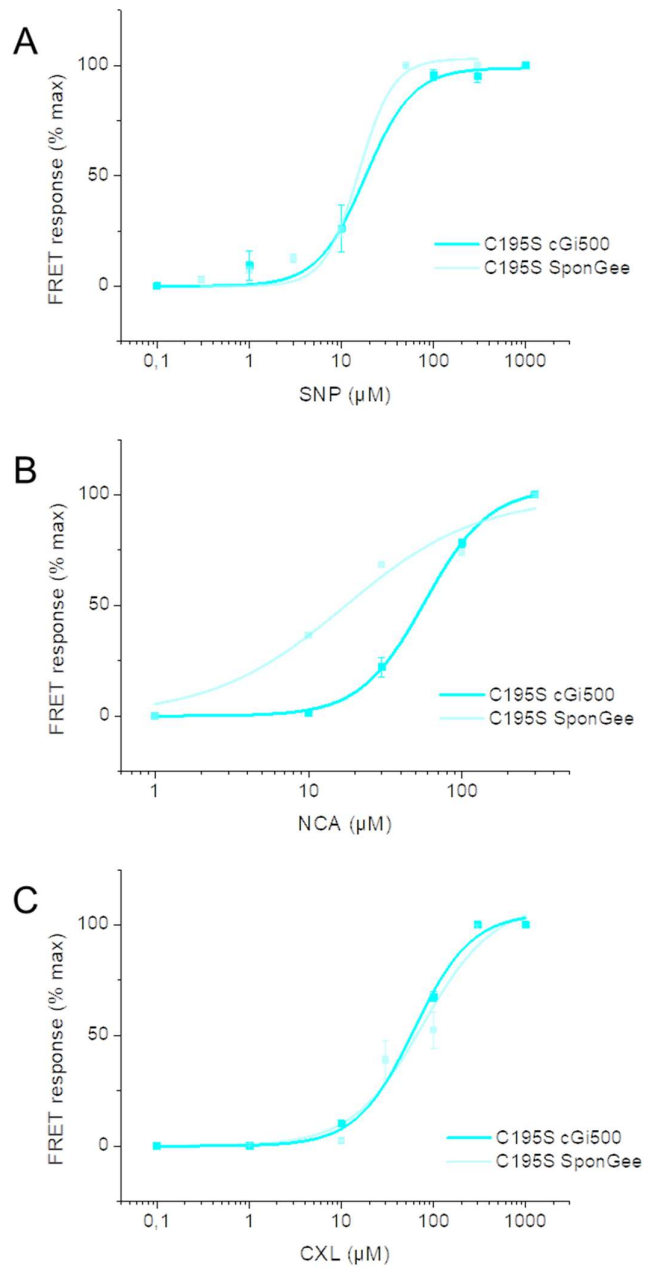


Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C195S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.

Hierbei ist die Antwort in Prozent normalisiert auf das Maximum angegeben und gegen die SNP (A), NCA (B) oder CXL (C) Konzentration in μM aufgetragen. Zu sehen ist der sigmoidale Hill-Fit zur Analyse.

Beide Zelltypen zeigten bei SNP Zugabe einen ähnlichen Verlauf mit leichtem Unterschied in der Steigung und Erreichen des Plateaus. Die Kurve der C195S SponGee Zellen erreichten das Plateau dabei früher mit einer größeren Steigung. Ähnlich wie bei NCA Zugabe zu den C117S SponGee Zellen, wiesen hier die C195S SponGee Zellen erneut eine flach ansteigende Kurve von Beginn bis zum Ende auf. Im Gegensatz dazu stieg die Kurve der C195S cGi500 Zellen erst bei einer NCA Konzentration von über 10 μM an und erreichte mit größerer Steigung ein kleineres Plateau der maximalen FRET Antwort. Bei CXL Zugabe war bei den Kurven der beiden C195S Zelltypen nur geringer Unterschied zu beobachten, die Kurve der C195S SponGee Zellen wies eine etwas geringere Steigung auf. Beide Zelltypen reagierten bei einer Konzentration von 10 μM CXL Konzentration.

4.2.4. C117/195S cGi500 mit SponGee

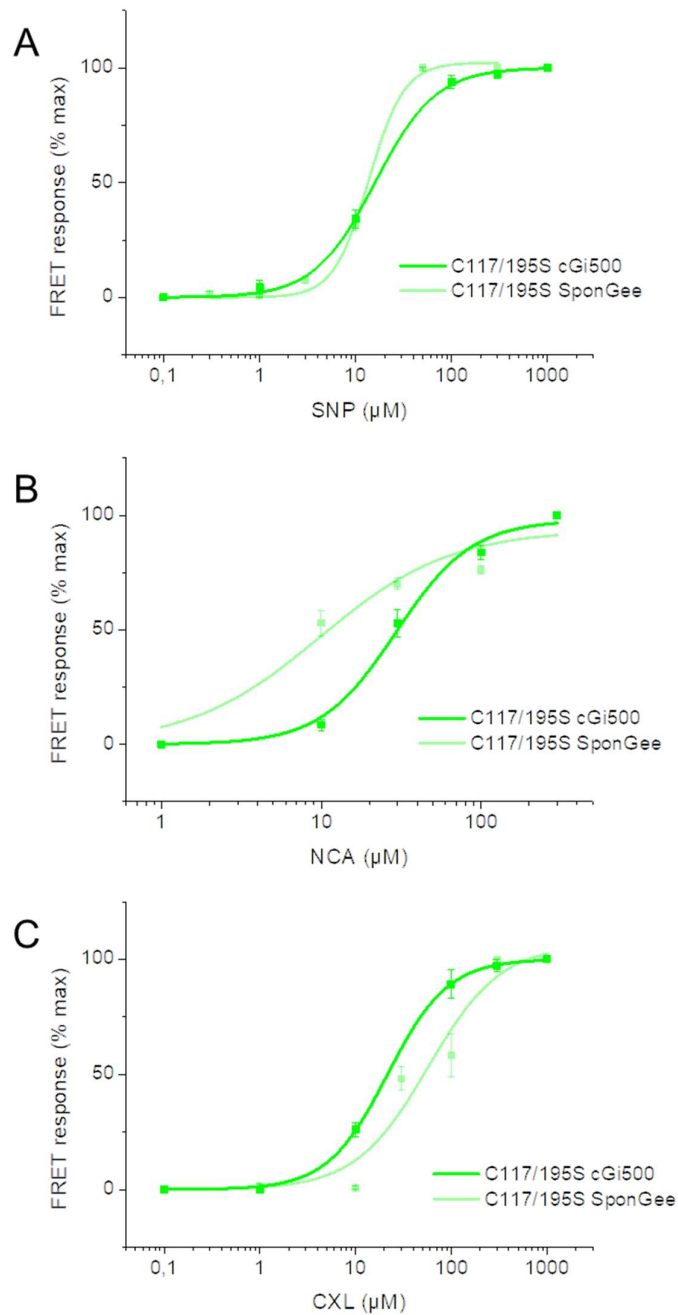


Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C117/195S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.

Hierbei ist die Antwort in Prozent normalisiert auf das Maximum angegeben und gegen die SNP (A), NCA (B) oder CXL (C) Konzentration in μM aufgetragen. Zu sehen ist der sigmoidale Hill-Fit zur Analyse.

Die Zugabe von SNP bewirkte eine frühere und flachere Steigung der Kurve der C117/195S cGi500 Zellen im Vergleich zu den C117/195S SponGee Zellen. Dessen Kurve zeigte eine Reaktion erst bei höherer SNP Konzentration mit früherem Erreichen des Plateaus der maximalen FRET Antwort. Wie bei der NCA Zugabe bei den anderen Mutanten der SponGee Zellen zuvor wies die Kurve der C117/195S SponGee Zellen eine sehr flache Steigung mit kleinem Plateau am Ende auf. Die Kurve der C117/195S cGi500 Zellen zeigte einen moderaten Anstieg mit leicht verzögertem Start im Vergleich zu der anderen Kurve. Bei CXL Zugabe zeigten beide Kurven einen gemeinsamen Anstieg. Die Kurve der C117/195S SponGee Zellen wies dabei eine geringere Steigung und kleineres Plateau im Vergleich zu der Kurve der C117/195S cGi500 Zellen auf.

4.2.5. Vergleich der EC50 Werten von SNP, NCA und CXL

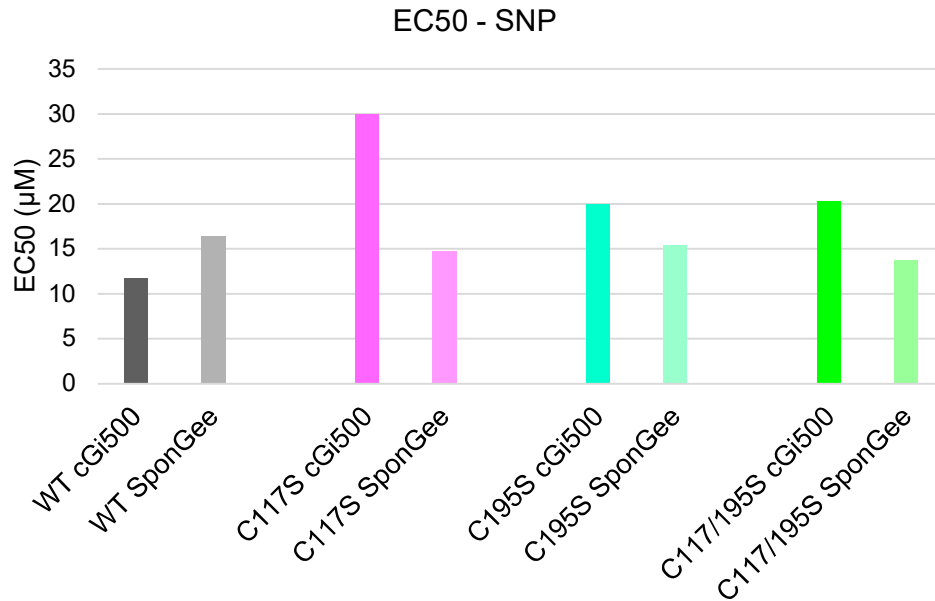


Abbildung 19: EC50 Werte bei Zugabe von SNP der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Origin erstellt und dessen halbmaximale Antwort der Zellen wurde bezüglich der Konzentration des zugegebenen SNP/NCA/CXL bestimmt. Die einzelnen EC50 Werte sind den einzelnen Varianten der Zellen farblich zugeordnet im Balkendiagramm. Grau entspricht den Wildtyp Zellen, Magenta den C117S Zellen, Türkis den C195S Zellen und Grün den C117/195S Zellen. Die entsprechenden Varianten mit SponGee sind mit abgeschwächter Farbe markiert.

Der EC50 Wert der Wildtyp Zellen war niedriger bei der cGi500 Variante mit 11,7 µM und 16,4 µM bei den SponGee Zellen. Die EC50 Werte der restlichen Zellen waren bei den SponGee Varianten jeweils niedriger als die EC50 Werte der cGi500 Zellen. Die C117S cGi500 Zellen besaßen einen EC50 Wert von 30,0 µM, während der EC50 Wert der SponGee Variante bei 14,7 µM lag. Der EC50 Wert der C195S cGi500 Zellen lag bei 20 µM und bei den C195S cGi500 Zellen bei 15,4 µM. Abschließend besaßen die C117/195S Zellen einen EC50 Wert von 20,3 µM bei der cGi500 Variante und 13,7 µM bei der SponGee Variante.

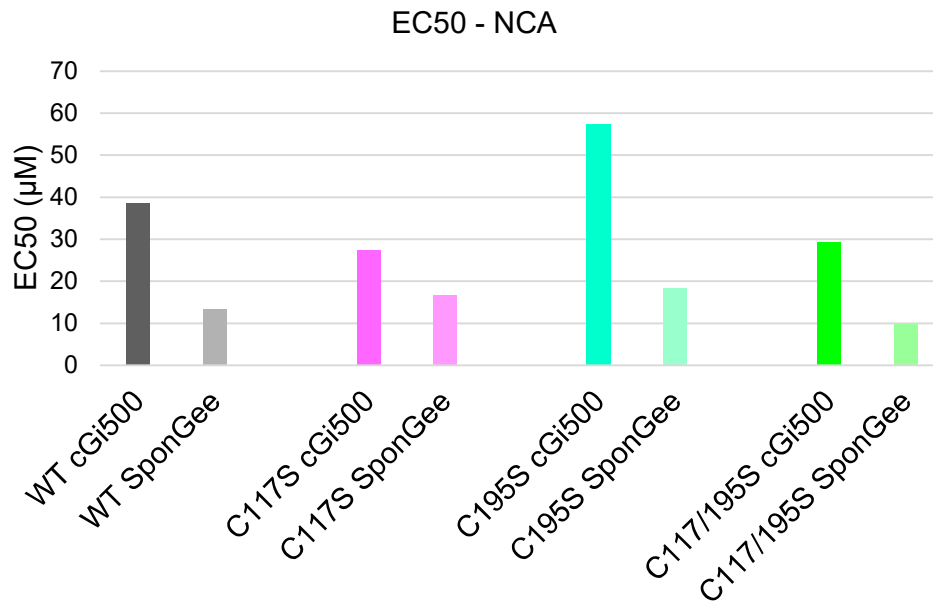


Abbildung 20: EC50 Werte bei Zugabe von NCA der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Origin erstellt und dessen halbmaximale Antwort der Zellen wurde bezüglich der Konzentration des zugegebenen SNP/NCA/CXL bestimmt. Die einzelnen EC50 Werte sind den einzelnen Varianten der Zellen farblich zugeordnet im Balkendiagramm. Grau entspricht den Wildtyp Zellen, Magenta den C117S Zellen, Türkis den C195S Zellen und Grün den C117/195S Zellen. Die entsprechenden Varianten mit SponGee sind mit abgeschwächter Farbe markiert.

Die EC50 Werte unter Zugabe von NCA zeigten eine Erhöhung in den cGi500 Zellen Varianten. Die mit SponGee transfizierten Zellen wiesen im Vergleich mit den cGi500 Zellen niedrigere EC50 Werte auf. Bei den Wildtyp cGi500 Zellen war ein EC50 Wert von 38,6 µM und die Wildtyp SponGee Zellen einen EC50 Wert von 13,3 µM zu beobachten. Bei den C117S Zellen erreichten die cGi500 Zellen einen Wert von 27,5 µM und die SponGee Zellen einen EC50 Wert von 16,7 µM. Bei den C195S cGi500 Zellen war ein Wert von 57,2 µM und ein Wert von 18,5 µM bei den C195S SponGee Zellen zu beobachten. Die Doppelmutanten zeigten ein EC50 Wert von 29,4 µM mit cGi500 und 9,8 µM mit dem Pufferprotein SponGee.

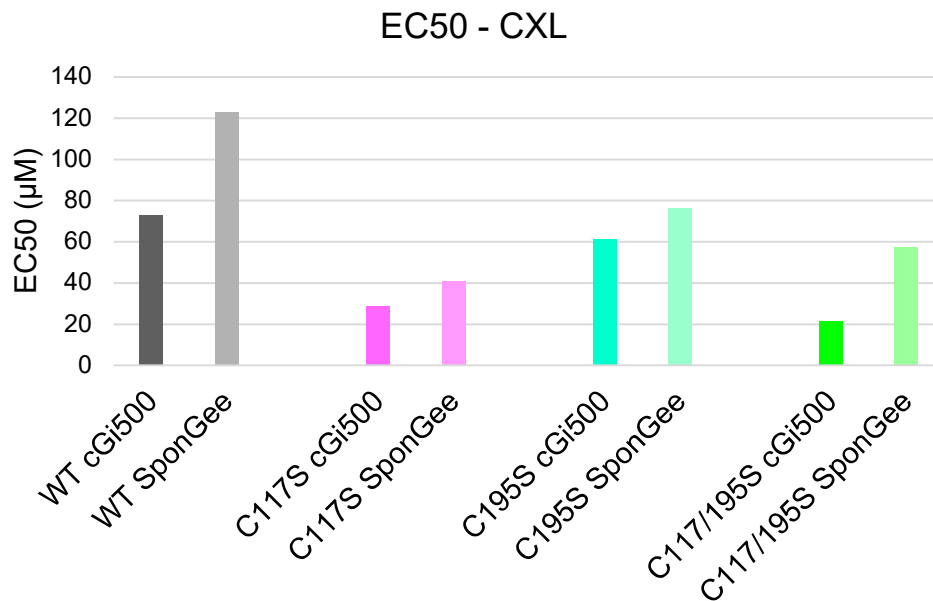


Abbildung 21: EC50 Werte bei Zugabe von CXL der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Origin erstellt und dessen halbmaximale Antwort der Zellen wurde bezüglich der Konzentration des zugegebenen SNP/NCA/CXL bestimmt. Die einzelnen EC50 Werte sind den einzelnen Varianten der Zellen farblich zugeordnet im Balkendiagramm. Grau entspricht den Wildtyp Zellen, Magenta den C117S Zellen, Türkis den C195S Zellen und Grün den C117/195S Zellen. Die entsprechenden Varianten mit SponGee sind mit abgeschwächter Farbe markiert.

Die Zugabe von CXL resultierte in höhere EC50 Werte bei den Zellen mit SponGee gegenüber den cGi500 Zellen. Bei den Wildtyp Zellen ohne SponGee lag er bei 73,0 µM und 122,7 µM bei den Zellen mit SponGee. Die Werte der C117S Zellen zeigten einen EC50 Wert von 28,6 µM ohne und 40,8 µM mit SponGee. Der EC50 Wert der C195S cGi500 Zellen lag bei 61,2 µM und der EC50 Wert der C195S SponGee Zellen bei 76,3 µM. Es ergab sich ein EC50 Wert bei der Doppelmutante von 21,6 µM ohne und 57,3 µM mit SponGee.

4.3. *In vitro* Messungen der Wildtyp und C177/195S cGi500 Mutanten ohne und mit SponGee

Wie in Kapitel 4.2 wurden die Klone an der FlexStation 3 vermessen. Es wurden die FRET Messungen der Wildtyp und C117/195S Mutante ohne und mit SponGee wiederholt, um zeitgleich gemessene FRET Antworten der einzelnen Klone zu erhalten. Die Daten der vermessenen Zellen wurden gesammelt im Zuge dieser Bachelorarbeit erhoben und ausgewertet.

4.3.1. Wildtyp cGi500 mit SponGee

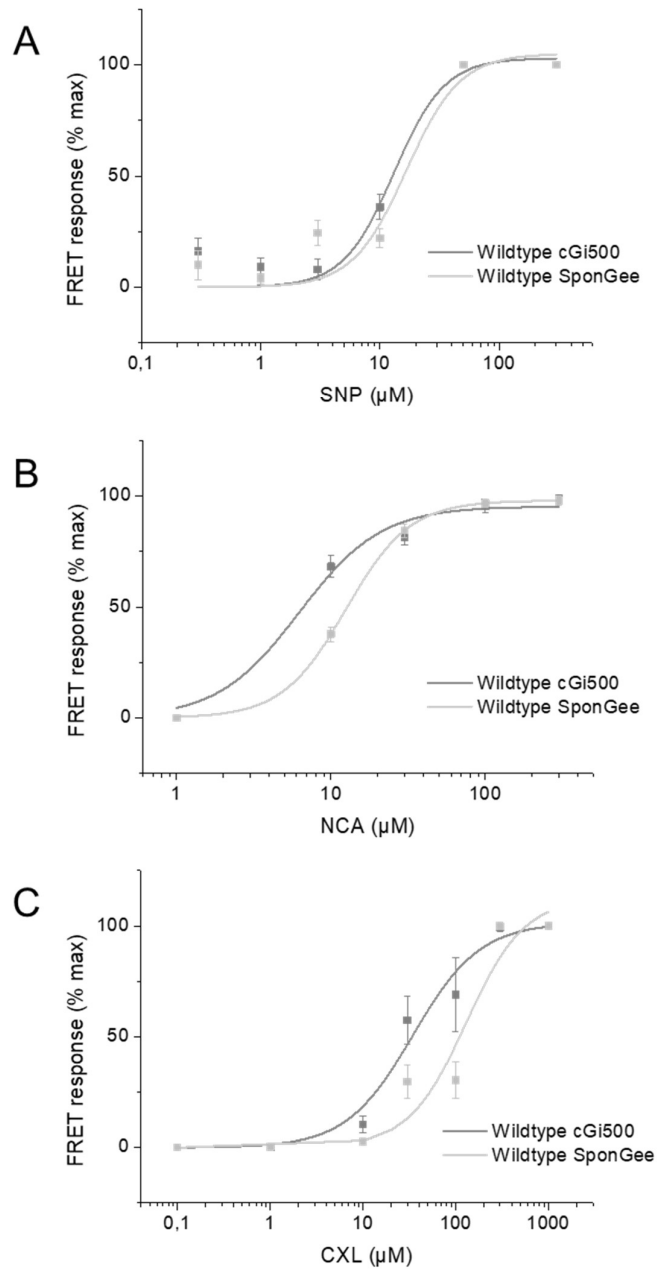


Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem Wildtyp cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.

Hierbei ist die Antwort in Prozent normalisiert auf das Maximum angegeben und gegen die SNP (A), NCA (B) oder CXL (C) Konzentration in μM aufgetragen. Zu sehen ist der sigmoidale Hill-Fit zur Analyse.

Bei SNP Zugabe zeigten beide Kurven der Wildtyp Zellen einen fast gleichen Verlauf. Die Kurve der Wildtyp SponGee Zellen begann leicht versetzt zu steigen und besaß somit ein verkürztes Plateau im Vergleich zu der Kurve der cGi500 Zellen. NCA bewirkte bereits bei kleiner Konzentration eine FRET Antwort in beiden Zelltypen. Die Kurve der Wildtyp cGi500 Zellen zeigte eine etwas flachere Kurve mit etwas steilerem Beginn. Die Kurve der Wildtyp SponGee Kurve stieg anfangs nur leicht erreichte aber nahezu gleichzeitig mit der anderen Kurve ihr Plateau. Wurde CXL hinzugegeben begannen beide Kurven erst bei höheren Konzentrationen zu steigen. Während die Kurve der Wildtyp cGi500 Zellen eine ähnliche Steigung wie die Kurve der Wildtyp SponGee Zellen besaß, stieg sie jedoch früher an. Die Kurve erreichte das Plateau bereits bei etwa 400 μM CXL.

4.3.2. C117/195S cGi500 mit SponGee

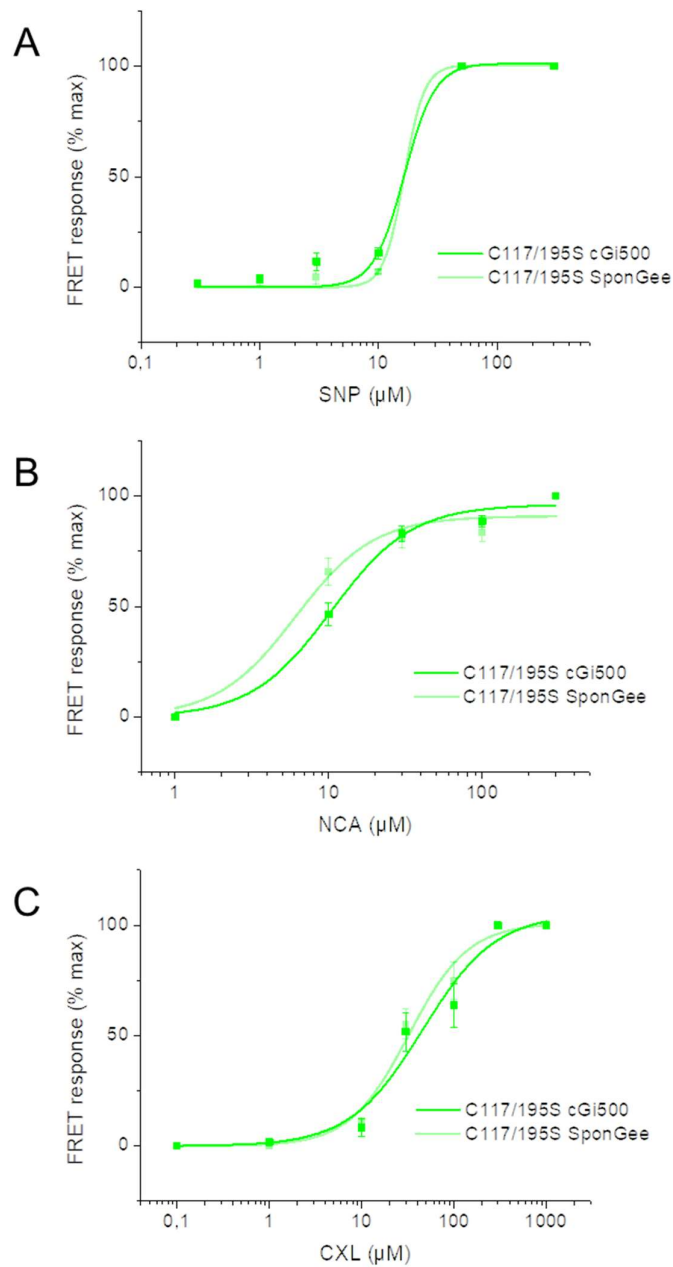


Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve der FRET Antwort gemessen von HEK293 Zellen mit dem C117/195S cGi500 Biosensor im Vergleich zu Zellen mit cGi500 und zusätzlich SponGee.

Hierbei ist die Antwort in Prozent normalisiert auf das Maximum angegeben und gegen die SNP (A), NCA (B) oder CXL (C) Konzentration in μM aufgetragen. Zu sehen ist der sigmoidale Hill-Fit zur Analyse.

Die Zugabe von SNP erzeugte bei beiden C117/195S Zelltypen nahezu identische Kurven, die Steigung der Kurve der C117/195S SponGee Zellen war minimal größer. Die NCA Zugabe bewirkte eine frühe Steigung beider Kurven. Die Kurve der C117/195S SponGee Zellen stieg früher an, als die der C117/195S cGi500 Zellen und besaß ein längeres Plateau am Ende. Bei CXL Zugabe stieg die Kurve der C117/195S SponGee Zellen etwas stärker zu gleichem Zeitpunkt wie die Kurve der C117/195S cGi500 Zellen an. Beide Kurven zeigten eine ansteigende FRET Antwort der Zellen bei etwa 5 μ M CXL.

4.3.3. Vergleich der EC50 Werte von SNP, NCA und CXL

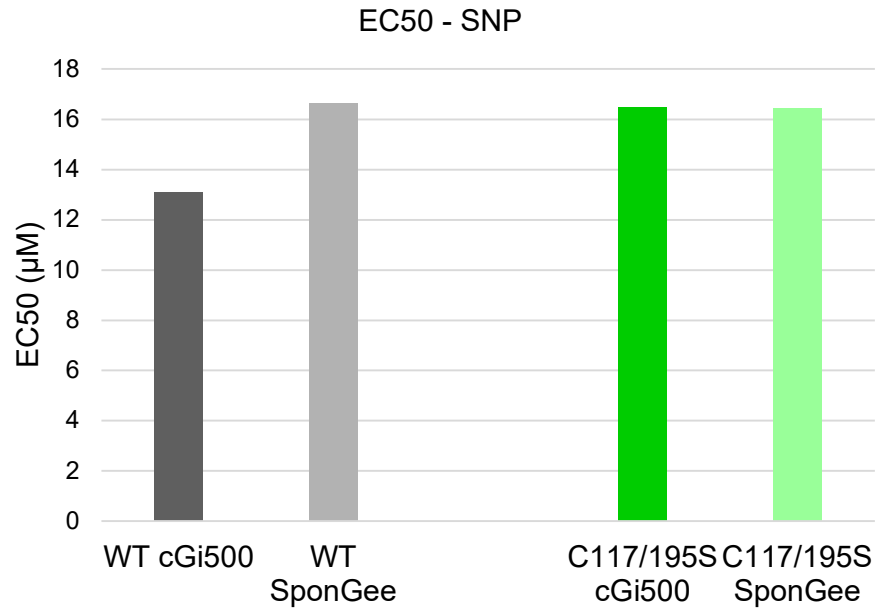


Abbildung 24: EC50 Werte bei Zugabe von SNP der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Origin erstellt und dessen halbmaximale Antwort der Zellen wurde bezüglich der Konzentration des zugegebenen SNP bestimmt. Die einzelnen EC50 Werte sind den einzelnen Varianten der Zellen farblich zugeordnet im Balkendiagramm. Grau entspricht den Wildtyp Zellen, Magenta den C117S Zellen, Türkis den C195S Zellen und Grün den C117/195S Zellen. Die entsprechenden Varianten mit SponGee sind mit abgeschwächter Farbe markiert.

Die Zugabe von SNP erzielte einen EC50 Wert der Wildtyp cGi500 Zellen von 13,1 µM. Der EC50 Wert der Wildtyp SponGee Zellen steigerte sich um 3,5 µM auf 16,6 µM. Bei der Mutante C117/195S war bei SNP Zugabe kaum ein Unterschied in den EC50 Werten von 6,5 µM für die cGi500 Zellen und bei 16,4 µM bei den SponGee Zellen zu erkennen.

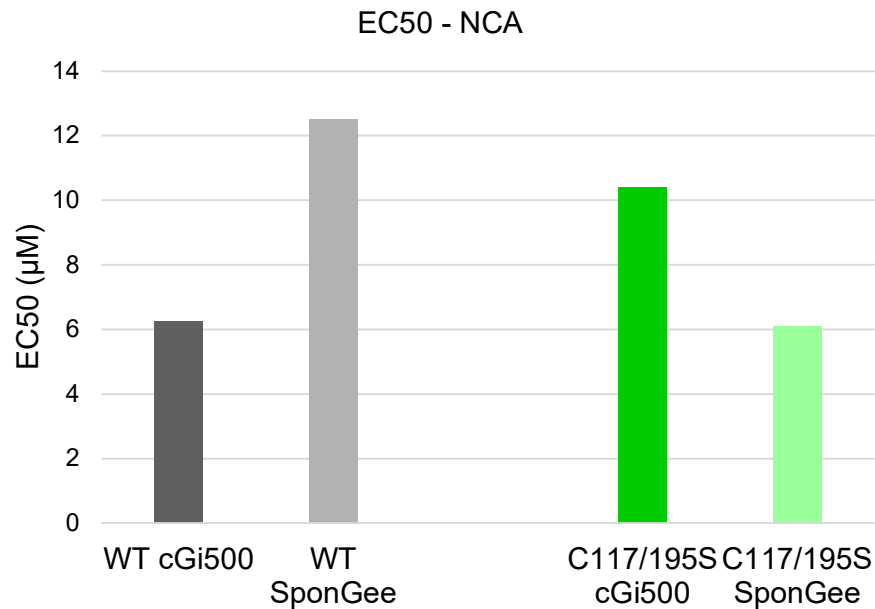


Abbildung 25: EC50 Werte bei Zugabe von NCA der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Origin erstellt und dessen halbmaximale Antwort der Zellen wurde bezüglich der Konzentration des zugegeben NCA bestimmt. Die einzelnen EC50 Werte sind den einzelnen Varianten der Zellen farblich zugeordnet im Balkendiagramm. Grau entspricht den Wildtyp Zellen und Grün den C117/195S Zellen. Die entsprechenden Varianten mit SponGee sind mit abgeschwächter Farbe markiert.

Bei Zugabe von NCA war eine deutliche Änderung der EC50 festzustellen. Der EC50 Wert der Wildtyp cGi500 Zellen lag bei 6,2 µM, der EC50 Wert der Wildtyp SponGee Zellen lag bei 12,5 µM. Bei der Doppelmutante ergab sich ein umgekehrtes Verhältnis mit einem geringeren Wert bei den SponGee Zellen mit 6,1 µM und einem Wert von 10,4 µM bei den cGi500 Zellen.

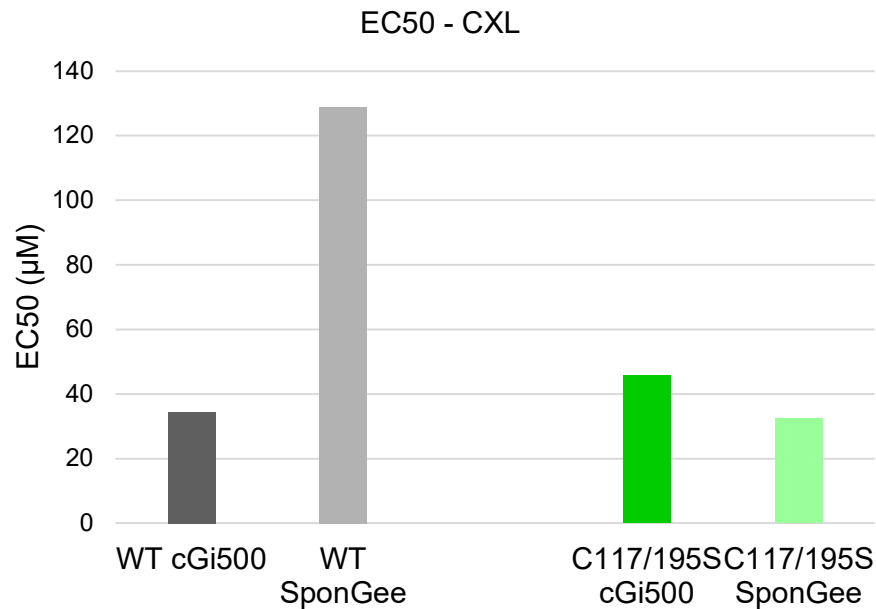


Abbildung 26: EC50 Werte bei Zugabe von CXL der verschiedenen cGi500 Varianten ohne und mit SponGee.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Origin erstellt und dessen halbmaximale Antwort der Zellen wurde bezüglich der Konzentration des zugegeben CXL bestimmt. Die einzelnen EC50 Werte sind den einzelnen Varianten der Zellen farblich zugeordnet im Balkendiagramm. Grau entspricht den Wildtyp Zellen und Grün den C117/195S Zellen. Die entsprechenden Varianten mit SponGee sind mit abgeschwächter Farbe markiert.

Es stellte sich ein signifikanter Unterschied in den EC50 Werten der Wildtyp cGi500 und Wildtyp SponGee Zellen dar. Der Wert der Wildtyp cGi500 Zellen lag bei 34,5 µM, während der EC50 Wert der Wildtyp SponGee Zellen bei 128,8 µM lag. Im Vergleich dazu existierte ein nur leichter Unterschied bei den Zelltypen der Mutante. Die cGi500 Variante erreichte hier einen EC50 Wert von 45,6 µM, der EC50 Wert der SponGee Variante lag bei 32,4 µM.

4.4. *In vitro* Einzelzellmessungen von VSMC transduziert mit AKAR3 Adenovirus

Es wurden Aorten von Wildtyp Mäusen entsprechend dem Protokoll in Kapitel 3.3.2 isoliert und im weiteren Verlauf auf eine 6-Well Platte mit Deckgläsern ausplattiert.



Abbildung 27: Eine isolierte, von Fett befreite Aorta einer Maus.

Waren diese ausreichend angewachsen und konfluent, folgte die Transduktion mit den AKAR3 Adenoviren. Aufgrund der geringen Zahl von Zellen, die unter einem Fluoreszenzmikroskop fluoreszierten und dementsprechend erfolgreich transduziert waren, folgte eine erneute Zugabe des AKAR3 Adenovirus. Im Anschluss erfolgte die Einzelzell-FRET-Messung mittels des Leica DMI 3000 B Mikroskops.

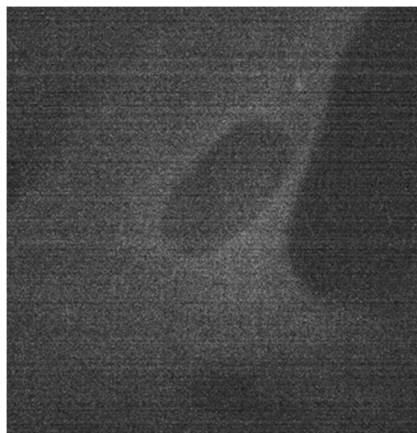


Abbildung 28: Fluoreszenz einer AKAR3-transduzierten VSMC.

Die geringe Fluoreszenz ist hier in Graustufen erkennbar, mittig im Bild sieht man den Zellkern der Zelle.

Dabei wurde je eine Basislinie der Fluoreszenz von etwa 10 Messungen eingestellt und im Anschluss die erste Zugabe von NCA getätigt. Zeigte sich nach Zugabe von NCA keine Änderung der Fluoreszenz Antwort, wurde eine zweite Zugabe von IBMX durchgeführt.

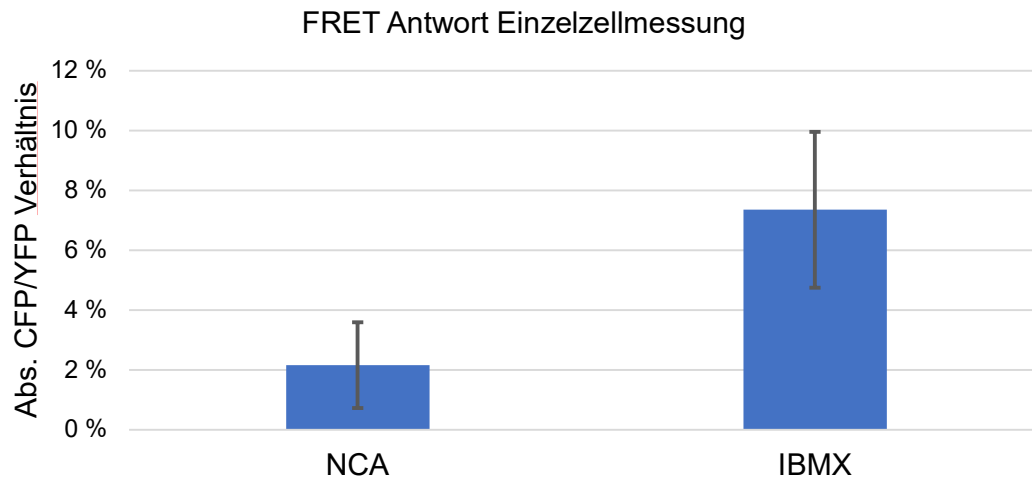


Abbildung 29: Mittlere absolute Änderung der FRET Antwort in den Zellen nach Zugabe von NCA und IBMX.

Die absolute Änderung aller Zellen wurde gemittelt und in Balkenform aufgetragen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus Abweichungen von drei Messungen mit NCA Zugabe und von vier Messungen IBMX Zugabe. Es wurden drei Zellen NCA und fünf Zellen IBMC zugegeben und in die Auswertung miteinbezogen.

Die absolute FRET Antwort mehrerer einzelner Zellen wurde aus dem Verhältnis der beiden Fluoreszenzen der beiden Fluorophore des Sensors ermittelt. Die mittlere absolute FRET Antwort lag für NCA bei 2,2% mit einer Abweichung von 1,4% und bei IBMX Zugabe bei 7,4% mit einer Abweichung von 2,6%.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es die freie cGMP-Konzentration in Zellen mittels dem Pufferprotein SponGee zu modulieren. Im Zuge dessen wurden mit dem Biosensor cGi500 und dem Pufferprotein SponGee stabil transfizierte HEK293-Zellen hergestellt und die FRET Antwort auf cGMP-erhöhende und pro-oxidative Interventionen *in vitro* untersucht. Der Biosensor cGi500 lag dabei als Wildtyp und als Mutante C117S, C195S oder C117/195S vor. Dadurch bedingte Unterschiede in der Antwort der Zellen auf Stimulation mit SNP, NCA und CXL sollte mittels *in vitro* FRET Messungen charakterisiert werden.

In vitro Messungen an der FlexStation 3 zeigten jeweils Reaktionen der HEK293-Zellen auf die Zugabe von SNP, NCA und CXL allein und wurden anschließend mit der FRET Antwort in Anwesenheit des cGMP Pufferprotein SponGee verglichen.

Des Weiteren wurden Mäuseaorten zur Isolierung von VSMC genutzt. Die VSMC wurden mit dem AKAR3 Adenovirus transduziert, welcher als Substrat für die PKG1 dient und bei Phosphorylierung durch die PKG1 dessen Aktivität durch FRET messbar macht. Hierbei wurde der Biosensor genutzt die Aktivität endogener PKG1 in den VSMC bei Stimulation durch NCA und IBMX zu verfolgen.

Zuvor isolierte und anschließend transduzierte VSMC wurden mit beiden Stoffen stimuliert und die Aktivität endogener PKG1 mittels Einzelzellmessung am Mikroskop vermessen.

5.1. *In vitro* Messungen von HEK293-Zellen mit dem Biosensor cGi500 und dem Pufferprotein SponGee

Die PKG spielt eine signifikante Rolle in der Regelung der Kontraktilität der vaskulären Gefäßmuskelzellen. Die aktivierte PKG induziert die Phosphorylierung der MLCP und reguliert den Ca²⁺-Spiegels. Zusammen mit der Dephosphorylierung der MLC wird die Relaxation der Muskelzellen erreicht (Francis et al., 2010).

Neben der PKG Aktivierung durch den *second messenger* cGMP wurde 2017 von Donzelli et al. eine weitere Aktivierung durch Oxidation und Induzierung der Bildung

von Intradisulfidbrückenbindungen in der PKG nachgewiesen (Donzelli et al., 2017). Eine Charakterisierung dieser Mechanismen wurde in dieser Bachelorarbeit untersucht.

Um die Oxidation zu untersuchen, wurden Zellen mit der stabil transfizierten Sequenz des Biosensors cGi500 mit den oxidierenden Stoffen NCA und CXL versetzt und die PKG durch Oxidation aktiviert. Die Daten der Aktivierung durch NCA und CXL wurden verglichen mit Daten von Zellen, welchen SNP zugegeben wurde. Mittels der Zugabe von NO-Donoren wird der cGMP-Spiegel von Zellen gesteigert und die PKG aktiviert.

Durch Zugabe der Oxidantien wurde eine vergleichbare Aktivität des Wildtyp Sensors beobachtet. Es war zu sehen, dass die EC50 Werte bei SNP, NCA und CXL zwischen 5 μM und 75 μM vergleichbar hoch lagen (Abbildung 19 bis Abbildung 21 und Abbildung 24 bis Abbildung 26). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Donzelli et al. 2017, in welchen ebenfalls eine Aktivierung der PKG durch Oxidation nachgewiesen wurde. Bei der Verfassung des Ziels der Arbeit wurde angenommen, dass durch Fehlen der für die Oxidation benötigten Cysteine 117 und 195 eine Steigerung der EC50-Werte gezeigt werden kann. Anders als vermutet konnte jedoch nicht bei allen Proben eine Steigerung der EC50-Werte in den Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp beobachtet werden.

Das Pufferprotein SponGee ist ein cGMP Scavenger, welcher in der Lage ist cGMP innerhalb der Zellen zu binden. Plasmide mit dessen Sequenz wurden zur Modulation der cGMP-Spiegel in den HEK293-Zellen stabil transfiziert. Basierend auf den Ergebnissen von Rodriguez-Pascual et al. war eine Steigerung des cGMP-Gehaltes in Zellen bei Zugabe von SNP zu erwarten (Rodriguez-Pascual et al., 1996). SponGee als Pufferprotein für cGMP, hätte diesem Anstieg entgegenwirken sollen (Ros et al., 2019). Dies würde eine zeitlich verzögerte Aktivierung des Biosensor cGi500 bedeuten, was sich in steigenden EC50 Werten widerspiegeln sollte. Bei Zugabe von den HNO-Donoren NCA und CXL sollte diese Änderung nicht in gleicher Weise stattfinden, da sie den Biosensor direkt, ohne den cGMP-Spiegel in den Zellen zu verändern, oxidieren (Donzelli et al., 2017).

Der eindeutige Nachweis über die Regulierung der cGMP-Spiegel durch SponGee in den Zellen konnte in dieser Bachelorarbeit nicht getätigt werden. Bei Zugabe von SNP konnte keine Modulation durch gesteigerte EC50-Werte gezeigt werden. Weiterhin zeigten sich nicht erwartete Änderungen der EC50-Werte bei Zugabe von NCA und CXL in den Daten, welches für eine Sensibilisierung des Biosensors für die Oxidation der HNO-Donoren sprechen könnte.

Hierbei könnten verschiedene Faktoren eine Rolle gespielt haben. Zum einen beruht die Auswertung der FRET Messungen auf den Endwerten der Fluoreszenz in den Zellen. Von Anfang an bestehende Fluoreszenz könnte aufgrund unzureichender Auflösung der FlexStation 3 nicht direkt messbar gewesen sein. Dies würde bedeuten, dass Änderungen in der FRET Antwort nicht die gesamte Änderung der Fluoreszenz von Beginn bis Ende des Experiments aufzeichnet, sondern nur den Teil ab der unteren Messgrenze der Fluoreszenz. Weiterhin wurden die Zellen 24 beziehungsweise 48 Stunden nach aussäen vermessen, jedoch wuchsen nicht alle Zellen gleich schnell wodurch weitere Ungenauigkeiten zwischen den verschiedenen Zelltypen auf der 96-Well Mikrotiterplatte denkbar waren.

Zudem könnte ein weiterer Grund für die Abweichungen der Messaufbau für die Messung der Modulation des cGMP-Spiegels durch SponGee gewesen sein. Die Messung an der FlexStation 3 beruht auf den Endwerten der FRET Antwort der Zellen. Eine zeitliche Verschiebung des Erreichens der maximalen FRET Antwort durch das Pufferprotein SponGee wurde so aufgrund möglicher maximaler Belegung aller SponGee Moleküle mit cGMP nicht berücksichtigt.

In aufbauenden Versuchen könnte eine Verbesserung der Ergebnisse erreicht werden, indem der Messzeitraum verkürzt wird. Im Weiteren wären weniger SponGee Moleküle in den Zellen bereits mit cGMP Molekülen besetzt. Somit wäre eine Modulation durch SponGee in den Messwerten eindeutiger am Ende sichtbar. Noch effektiver wäre zusätzlich die Vermessung einzelner Zellen, sodass sicher nachgewiesen werden kann, dass SponGee Expression in allen Zellen vorliegt, was in den Vermessungen mit FlexStation 3 nicht berücksichtigt wurde.

5.2. Transduktion von VSMC und Messungen der endogenen PKG Aktivität

Die Isolation von primären glatten Muskelzellen wurde einmalig erfolgreich durchgeführt. Nach Reinigung der Aorten, Aufbereitung in Enzymlösungen und Ausplattierung waren viele Zellen zu beobachten. Bei der anschließenden Transduktion wurde bei der Ansicht unter einem Fluoreszenz Mikroskop deutlich, dass nur sehr wenige Zellen den Biosensor exprimierten und somit leuchteten. Aus diesem Grund wurden die folgenden FRET Messungen an dem Leica DMI 3000 B Mikroskop als Einzelzellmessungen durchgeführt. Hierbei ergab die erste Messung mit Zugabe von SNP keine FRET Änderung, weshalb daraufhin lediglich NCA und die Positivkontrolle IBMX zugegeben wurden.

SNP ist ein NO-Donor, welcher unter normalen Umständen durch freigesetztes NO die sGC aktiviert, was zu erhöhtem cGMP-Spiegel führt und die PKG in den Zellen aktiviert (Rodriguez-Pascual et al., 1996). In dieser Arbeit wurde keine Reaktion bei SNP beobachtet, wohl aber bei dem PDE Inhibitor IBMX. Hierbei lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die zugegebene Konzentration SNP eventuell nicht ausreichend hoch war, um einen ausreichenden Anstieg von cGMP in der Zelle zu bewirken. Alternativ könnte auch die aktivierte endogene PKG nicht ausreichen, ausreichend AKAR3 Sensormoleküle zu phosphorylieren.

Diese Hypothese scheint wahrscheinlicher mit dem Fakt, dass die Positivkontrolle IBMX erfolgreich FRET im AKAR3 Biosensor auslöste. Einerseits könnte die Konzentration von IBMX deutlich effektiver gewesen sein, was zur breiten Inhibition der cGMP abbauenden PDE führte und die cGMP-Spiegel nach Zugabe stärker stiegen ließ. Zum anderen ist IBMX ein unspezifischer PDE Inhibitor und inhibiert alle PDE in den Zellen, somit auch die cAMP spezifischen PDE. Steigt die cAMP-Konzentration, wird auch die endogene PKA aktiviert, welche den AKAR3 Sensor auch phosphoryliert. Somit ist das Signal der IBMX Zugaben nicht rein auf die PKG, sondern auch auf die Aktivität der PKA zurückzuführen (Allen & Zhang, 2006).

Ähnliches könnte auch den Wert der FRET Antwort bei NCA beeinflussen. Zum einen oxidiert NCA die endogene PKG, welche den AKAR3 Sensor phosphoryliert (Gambaryan et al., 2012). Zum anderen zeigten Cuello et al., 2021, dass auch die

PKA durch Oxidation aktivierbar ist. Dies würde bedeuten, dass auch bei diesem Messwert der Effekt durch sowohl die PKG als auch die PKA entstanden ist.

6. Zusammenfassung

Die *in vitro* Messungen von den verschiedenen HEK293 Zellen waren erfolgreich, da für jeden Zelltyp eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden konnte. Des Weiteren wurde eine Aktivierung des Biosensors cGi500 durch Oxidation mittel NCA und CXL gezeigt. Allerdings ist es nicht eindeutig, ob sich die Messungen in dieser Weise eignen zu klären, ob die cGMP-Spiegel durch SponGee moduliert werden können. Die SNP Zugaben scheinen unter dem durchgeführten Versuchsaufbau nur beschränkt geeignet eine Modulation von cGMP darzustellen. Aufgrund der Messdauer eignet sich die Form einer Auswertung mittels Dosis Wirkungs-Kurve aufgrund der Art und Weise der Berechnung nur begrenzt. Eine zeitliche Verzögerung der Plateaus bei den Messungen und Messwerte zu der Zeit, bei der noch nicht das gesamte SponGee besetzt ist, wurden in der Auswertung nicht ausreichend betrachtet. Des Weiteren geben die Zugaben von NCA und CXL wenig Aufklärung über die Modulation von cGMP, da NCA und CXL nicht darauf abzielen cGMP-Spiegel innerhalb von Zellen zu beeinflussen. Mit verkürzter Messzeit bei Einzelzellmessungen könnte die Fragestellung möglicherweise effektiver und präziser in Zukunft geklärt werden.

Die Isolation und Transduktion der primären VSMC waren ein Erfolg. Jedoch konnte der transduzierte AKAR3 Sensor nur beschränkt genutzt werden, um die endogene PKG Aktivität direkt wiederzugeben. In Zukunft können diese Methoden jedoch genutzt werden im weiteren Verlauf endogene PKG beziehungsweise PKA Aktivität muriner Zellen zu messen und nach weiterer Optimierung auch spezifische Aktivität charakterisieren.

7. Bibliografie

1-Nitrosocyclohexyl acetate | HNO donor | NCA | CAS [10259-08-2] | Axon 2603 |

Axon Ligand™ with >98% purity available from stock from supplier Axon

Medchem. (2022). Abgerufen 28. Januar 2022, von

<https://www.axonmedchem.com/product/2603>

3-Isobutyl-1-methylxanthin ≥99% (HPLC), powder | Sigma-Aldrich. (2022).

Abgerufen 3. Februar 2022, von <http://www.sigmaaldrich.com/>

Acyloxy Nitroso Compounds as Nitroxyl (HNO) Donors: Kinetics, Reactions with

Thiols, and Vasodilation Properties | Journal of Medicinal Chemistry.

(2022). Abgerufen 28. Januar 2022, von

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm101432z>

Allen, M. D., & Zhang, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity

visualized by FRET-based reporters. *Biochemical and Biophysical*

Research Communications, 348(2), 716–721.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.136>

Cuello, F., Herberg, F. W., Stathopoulou, K., Henning, P., & Diering, S. (2021).

Regulation of Cardiac PKA Signaling by cAMP and Oxidants. *Antioxidants*,

10(5), 663. <https://doi.org/10.3390/antiox10050663>

CXL-1020 | HNO donor | 2-MSPA | 2MSPA | CXL1020 | CXL 1020 | CAS [950834-

06-7] | Axon 2653 | Axon Ligand™ with >99% purity available from stock

from supplier Axon Medchem. (2022). Abgerufen 28. Januar 2022, von

<https://www.axonmedchem.com/product/2653>

Donzelli, S., Fischer, G., King, B. S., Niemann, C., DuMond, J. F., Heeren, J.,

Wieboldt, H., Baldus, S., Gerloff, C., Eschenhagen, T., Carrier, L., Böger, R.

H., & Espey, M. G. (2013). Pharmacological Characterization of 1-

Nitrosocyclohexyl Acetate, a Long-Acting Nitroxyl Donor That Shows Vasorelaxant and Antiaggregatory Effects. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(2), 339–347.

<https://doi.org/10.1124/jpet.112.199836>

Donzelli, S., Goetz, M., Schmidt, K., Wolters, M., Stathopoulou, K., Diering, S., Prisyazhna, O., Polat, V., Scotcher, J., Dees, C., Subramanian, H., Butt, E., Kamynina, A., Schobesberger, S., King, S. B., Nikolaev, V. O., de Wit, C., Leichert, L. I., Feil, R., ... Cuello, F. (2017). Oxidant sensor in the cGMP-binding pocket of PKGI α regulates nitroxyl-mediated kinase activity. *Scientific Reports*, 7(1), 9938. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09275-1>

Francis, S. H., Busch, J. L., & Corbin, J. D. (2010). cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 525–563.

<https://doi.org/10.1124/pr.110.002907>

Gambaryan, S., Butt, E., Kobsar, A., Geiger, J., Rukoyatkina, N., Parnova, R., Nikolaev, V. O., & Walter, U. (2012). The oligopeptide DT-2 is a specific PKG I inhibitor only in vitro, not in living cells: No pharmacological PKG inhibitors in living cells. *British Journal of Pharmacology*, 167(4), 826–838.

<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02044.x>

Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F., & Schlossmann, J. (2004). Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Letters*, 575(1), 19–22.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.030>

Holme, M. R., & Sharman, T. (2021). Sodium Nitroprussid.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557487>

- Hottinger, D. G., Beebe, D. S., Kozhimannil, T., Prielipp, R. C., & Belani, K. G. (2014). Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 30(4), 462–471. <https://doi.org/10.4103/0970-9185.142799>
- Hypertension. (2022). Abgerufen 20. Januar 2022, von <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
- Kalyanaraman, H., Zhuang, S., Pilz, R. B., & Casteel, D. E. (2017). The activity of cGMP-dependent protein kinase α is not directly regulated by oxidation-induced disulfide formation at cysteine 43. *Journal of Biological Chemistry*, 292(20), 8262–8268. <https://doi.org/10.1074/jbc.C117.787358>
- Koschinski, A., & Zaccolo, M. (2017). Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: Implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Scientific Reports*, 7(1), 14090. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13021-y>
- Lincoln, T. M., Thompson, M., & Cornwell, T. L. (1988). Purification and characterization of two forms of cyclic GMP-dependent protein kinase from bovine aorta. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17632–17637. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77883-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77883-1)
- Mills, K. T., Stefanescu, A., & He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. *Nature Reviews. Nephrology*, 16(4), 223–237. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2>
- Natriumnitroprussiat Dihydrat ACS reagent, $\geq 99\%$ | Sigma-Aldrich. (2022). Abgerufen 24. Januar 2022, von <http://www.sigmaaldrich.com/>

- Prysyazhna, O., & Eaton, P. (2015). Redox regulation of cGMP-dependent protein kinase I α in the cardiovascular system. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 139. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00139>
- Rodriguez-Pascual, F., Miras-Portugal, M. T., & Torres, M. (1996). Effect of cyclic GMP-increasing agents nitric oxide and C-type natriuretic peptide on bovine chromaffin cell function: Inhibitory role mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Molecular Pharmacology*, 49(6), 1058–1070.
- Roof, S. R., Ueyama, Y., Mazhari, R., Hamlin, R. L., Hartman, J. C., Ziolo, M. T., Reardon, J. E., & del Rio, C. L. (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. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00894>
- Ros, O., Zagar, Y., Ribes, S., Baudet, S., Loulier, K., Couvet, S., Ladarre, D., Aghaie, A., Louail, A., Petit, C., Mechulam, Y., Lenkei, Z., & Nicol, X. (2019). SponGee: A Genetic Tool for Subcellular and Cell-Specific cGMP Manipulation. *Cell Reports*, 27(13), 4003-4012.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.102>
- Russwurm, M., Mullershausen, F., Friebe, A., Jäger, R., Russwurm, C., & Koesling, D. (2007). Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: A systematic approach. *The Biochemical Journal*, 407(Pt 1), 69–77. <https://doi.org/10.1042/BJ20070348>
- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Feil, R., Hofmann, F., & Beavo, J. A. (2002). Regulation of cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5) Phosphorylation in

Smooth Muscle Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3310–3317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106562200>

Sabbah, H. N., Tocchetti, C. G., Wang, M., Daya, S., Gupta, R. C., Tunin, R. S., Mazhari, R., Takimoto, E., Paolocci, N., Cowart, D., Colucci, W. S., & Kass, D. A. (2013). Nitroxyl (HNO) a Novel Approach for the Acute Treatment of Heart Failure. *Circulation. Heart failure*, 6(6), 1250–1258.

<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000632>

Thunemann, M., Fomin, N., Krawutschke, C., Russwurm, M., & Feil, R. (2013). Visualization of cGMP with cGi Biosensors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1020, 89–120. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-459-3_6

Ukena, C., Link, A., & Böhm, M. (2010). NO-Donatoren bei der Therapie der Herzinsuffizienz. Größtes Problem: Toleranzentwicklung. *Pharmazie in unserer Zeit*, 39(5), 369–373. <https://doi.org/10.1002/pauz.201000382>

Zaccolo, M. (2004). Use of Chimeric Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer to Monitor Cellular Responses. *Circulation Research*, 94(7), 866–873.

<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000123825.83803.CD>

Zhu, G., Groneberg, D., Sikka, G., Hori, D., Ranek, M. J., Nakamura, T., Takimoto, E., Paolocci, N., Berkowitz, D. E., Friebe, A., & Kass, D. A. (2015). SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE IS REQUIRED FOR SYSTEMIC VASODILATION BUT NOT POSITIVE INOTROPY INDUCED BY NITROXYL (HNO) in the MOUSE. *Hypertension*, 65(2), 385–392.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04285>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Hamburg, 14.03.2022

Fabian Gutknecht (Unterschrift)

Danksagung

Ich möchte mich gerne bei Allen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Großer Dank gilt meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Friederike Cuello und meiner Betreuerin Frau Julia Pflaumenbaum, die es mir ermöglicht haben meine Bachelorarbeit im Labor der Molekularen Pharmakologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchzuführen und die in dieser Bachelorarbeit verwendeten Zellen zur Verfügung stellten.

Ebenfalls gilt mein Dank meinem Erstgutachter Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker, welcher mir während meiner Bachelorarbeit in allen Bereichen mit tatkräftiger Unterstützung zur Seite stand und Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev, welcher mich bei Messungen in seinem Labor tatkräftig unterstützte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Pia Rausche und Celine Pöhlking für die Unterstützung bei der Korrektur.

Abschließend möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken für die konstante Unterstützung in jeder Phase meines Studiums, egal ob in guten oder schwierigen Zeiten.