

REDOX-SPEZIFISCHE REGULATION DER LÖSLICHEN GUANYLYL CYCLASE DURCH LIGANDEN DER HÄMBINDUNGSTASCHE UND IHRE PHARMAKOLOGISCHE BEDEUTUNG

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Justus-Liebig Universität Giessen

Vorgelegt von

Tatiana Y. Nedvetskaya

aus

Minsk, Weißrussland

Angefertigt am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Giessen 2005

Die vorliegende Dissertation im Studiengang Biologie der Justus-Liebig-Universität wurde am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Harald H. H. W. Schmidt in der Zeit vom 01.10.2001 bis zum 01.05.2005 angefertigt.

Erstgutachter:

Prof. Alfred Pingoud

Institut für Biochemie Fachbereich 08 Biologie Justus-Liebig-Universität Giessen

Zweitgutachter:

Prof. Klaus Preissner

Institut für Biochemie Fachbereich 10 Medizin Justus-Liebig-Universität Giessen

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Die Zitate wurden dem Wortlaut nach oder sinngemäß aus der Fachliteratur entnommen und sind durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Giessen, 01.06.2005

Tatiana Y. Nedvetskaya

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Geschichte der Entdeckung von NO-sGC-cGMP-Signalweges	1
1.2. NOS	3
1.3. sGC: Struktur und Isoformen	3
1.4. Regulation der sGC-Aktivität	6
1.4.1. Aktivatoren der sGC	6
1.4.2. Inhibitoren der sGC	11
1.5. Redox-Regulation	14
1.6. Pathologie	19
2. Zielsetzung der Arbeit	24
3. Material und Methoden	26
3.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
3.1.1. Chemikalien	26
3.1.2. Lösungen	27
3.1.3. Antikörper	27
3.1.4. Säulenfüllmaterial	28
3.1.5. Marker	28
3.1.6. Zellen	28
3.1.7. Puffer und Medium	28
3.1.8. Geräte	32
3.2. Software	33
3.3. Methoden	33
3.3.1. EZ	33
3.3.2. Sf9-Zellen	34
3.3.3. Aufreinigung des p160 und sGC aus Sf9/Baculoviren-Zellen durch Affinitätschromatographie mittels GSH-Sepharose	35
3.3.4. Bestimmung des cGMP-Levels in EZ	36
3.3.5. cGMP-Assay	36
3.3.6. Proteinbestimmung Micro-Lowry Assay	36
3.3.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37

3.3.8. Western Blot	38
3.3.9. Ponceau-S-Färbung von Blots	38
3.3.10. Coomassie-Färbung von Gelen	39
3.3.11. Coomassie Kolloidal von Gelen	39
3.3.12. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran mittels ECL	39
3.3.13. Gewebe- und Organhomogenisierung	40
3.3.14. Organbad	40
3.3.15. MALDI-TOF	41
3.3.16. Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Charakterisierung des Wirkungsmechanismus von BAY58-2667 auf sGC	42
4.1.1. Konkurrente Wirkung von BAY58-2667 und Porphyrine auf sGC	42
4.1.2. Wirkung von BAY58-2667 auf cGMP-Synthese in intakten Zellen	46
4.2. Wirkungen von Hämoxidanzien auf sGC-Proteinlevel	48
4.2.1. Wirkung von ODQ auf sGC-Proteinlevel	48
4.2.2. Wirkung von BAY58-2667 und ZnPPIX auf sGC-Proteinlevel	50
4.2.3. Wirkung von BAY58-2667 und PPIX auf sGC-Proteinlevel in Anwesenheit von Oxidanzien	52
4.3. Charakterisierung des p160	55
4.3.1. Hämoxidant und Inhibitor der sGC, ODQ, induziert die Bildung eines hochmolekularen sGC-immunreaktiven Proteins (p160) in EZ	55
4.3.2. ODQ-induziertes Protein (p160) in Sf9-Zellen	56
4.3.3. Aufreinigung des p160 aus Sf9-Zellen mittels Affinitätschromatographie	58
4.3.4. Effekt der harten denaturierenden Bedingungen auf p160	60

4.3.5. Rolle der prosthetischen Hämgruppe bei der Induktion des p160	62
4.3.6. Effekt des Hämunabhängigen Aktivators der sGC BAY58-2667 auf die Bildung des p160	63
4.4. BAY58-2667 als pharmakologisches Tool zur Korrektur von sGC-abhängigen Vasoparametern unter oxidativem Stress	65
4.4.1. Effekt von BAY58-2667 auf sGC in Anwesenheit von SIN-1 in EZ	65
4.4.2. Wirkung von BAY58-2667 auf Gefäßrelaxation unter oxidativen Bedingungen	67
4.4.3. Effekt von BAY58-2667 auf sGC-Proteinlevel in SHR	69
5. Diskussion	74
6. Zusammenfassung	86
7. Summary	88
8. Literaturverzeichnis	90
9. Danksagung	107
10. Lebenslauf	110
11. Publikationsliste	111

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAY 41-2272	5-Cyclopropyl-2-1-(2-fluoro-benzyl)-1 <i>H</i> -pyrazolo3,4- <i>b</i> pyridin-3yl-pyrimidin-4-ylamine
BAY 58-2667	4-((4-carboxybutyl)2-(4-phenethylbenzyl)oxyphenethylamino) methylbenzoicacid
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Cirka
cAMP	Cyclic Adenosine-3',5'-Monophosphate
cGMP	Cyclic Guanosine-3',5'-Monophosphate
CM	Carboxymethyl
DEA/NO	2-(N,N-Diethylamino)-Diazenolate-2-Oxide, Na
DETA/NO	(z)-1-[2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EZ	Endothelzellen
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDRF	Endothelialer relaxierender Factor (<i>Endothelium-derived-relaxing factor</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GnSCN	Guanidinisothiocyanat
GSH	Reduced Glutathion
GST	Glutathione-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphate

HEPES	N-2-HydroxyethylPiperazin-N'-2-Ethansulfon Säure
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
Kap	Kapitel
kDa	Kilodalton
l	Liter
L-NAME	N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger-Ribonucleinsäure</i>
MW	Molekulargewicht
μM	Mikromolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
NOS – I	Neuronal NO-Synthasen
NOS – III	Endothelial NO-Synthasen
n.c.	nicht signifikant
O ₂ ⁻	Superoxid Anion
ODQ	1H-1,2,4Oxadiazolo3,4-aquinoxalin-1-one
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat Puffer (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PKA	cAMP-abhängige Protein Kinase (Protein Kinase A)
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Flouride
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

p.o.	per oral
PPIX	Protoporphyrin IX
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfat</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sGC	Lösliche Guanylyl Cyclase (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
SHR	Spontanhypertensive Ratten
SIN-1	3-Morpholinosydnominin
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit 0.1 % Tween 20
TEA	Triethanolamine
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amio-2-Hydroxymethyl-1,3Propandiol
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl-benzylindazole)
Zaprinast	2-O-Propoxyphenyl-8-Azapurin-6-ein
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Entdeckung des NO-sGC-cGMP-Signalweges.

Die Entdeckung des NO-cGMP-Signalweges begann, nachdem Earl Sutherland das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) als intrazellulären Botenstoff identifizierte (Sutherland and Rall, 1957). In den 60er und Anfang der 70er Jahre wurde auch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) in verschiedenen Geweben entdeckt (Ashman et al., 1963; Goldberg et al., 1973). Seine wichtige Rolle als ein intrazellulärer Botenstoff (*second messenger*) in der Regulation von Vasodilatation, Thrombozytenaggregation, vaskulärer Proliferation von Glattmuskelzellen und in anderen wichtigen physiologischen Prozessen wurde auch gezeigt (McDonald and Murad, 1995; Carvajal et al., 2000; Hofmann et al., 2000). Die cGMP-bildenden Enzyme, die Guanylyl Cyclasen (GC), sind in verschiedenen Zellpräparationen und Geweben sowohl in der Membranfraktion als auch in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen. Da die kinetischen und physikalischen Eigenschaften der beiden Formen unterschiedlich sind, wurden sie als membranständige und lösliche Form bezeichnet (Chrisman et al., 1975; Garbers, 1990). 1977 haben Murad und Mitarbeiter gezeigt, dass Stickstoffmonoxid (NO) lösliche Guanylyl Cyclase (sGC) aktiviert, was zur Steigerung von cGMP Formation und anschließend zur Relaxation von Glattmuskelzellen führt (Arnold et al., 1977). Diese Enzymaktivierung durch NO wurde als ein nicht-physiologisches Phänomen aufgefasst, da zu diesem Zeitpunkt NO in biologischen Systemen unbekannt war. Erst 1980 wiesen Furchgott und Zawadzki die Existenz einer vom Endothel produzierten Substanz nach, die erforderlich war, um die Relaxation von Blutgefäßen zu vermitteln (Furchgott and Zawadzki, 1980). Sie bezeichneten diese Substanz als "endothelium derived relaxing

factor" (EDRF). 1986 zeigten Ignarro und Moncada unabhängig voneinander, dass EDRF mit NO identisch ist (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Moncada et al., 1988).

Kurz darauf wurde das Enzym in Makrophagen identifiziert, das NO aus der

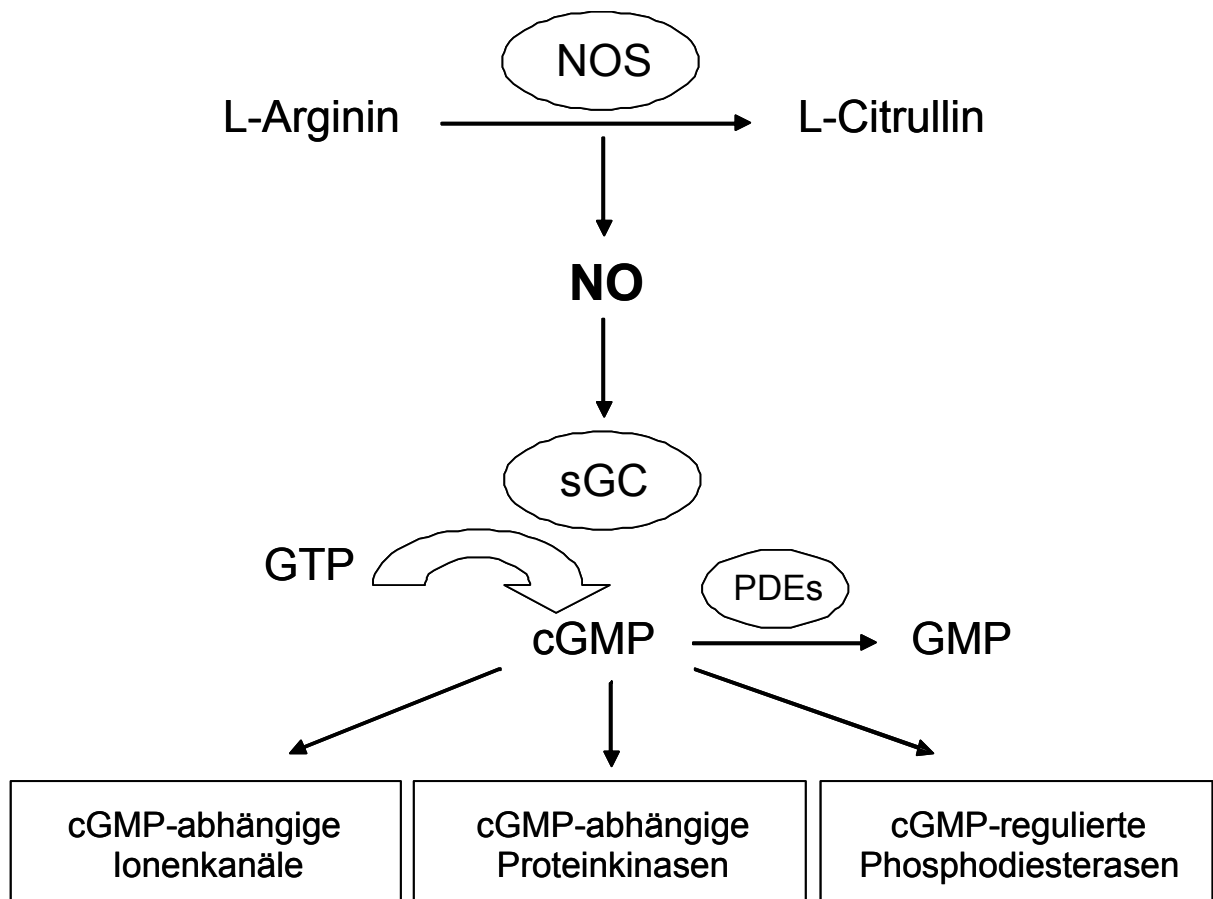


Abb.1.1 Komponente des NO-sGC-cGMP-Signalweges.

Aminosäure L-Arginin bildete. Es wurde später gereinigt und als NO-Synthase (NOS) bezeichnet (Hibbs et al., 1988; Marletta et al., 1988; Hevel et al., 1991). Damit waren die beiden wesentlichen Komponenten des NO/cGMP-Signalweges identifiziert: NO-produzierende NOS und die cGMP-bildende sGC (Abb.1.1).

1.2 NOS

Wichtigster physiologischer Bildungsort von NO in der Blutgefäßwand sind die Endothelzellen (EZ). NO wird hier wie andernorts aus der Aminosäure L-Arginin durch NOS gebildet. Drei unterschiedlich exprimierte und regulierte Isoformen sind bekannt (Andrew and Mayer, 1999). Zwei Kalzium-regulierte NOS, von denen eine im Endothel (eNOS oder NOS-III) und die andere in Neuronen (nNOS oder NOS-I) exprimiert wird. Diese beiden NOS-Isoformen sind für die Botenstofffunktionen von NO unter physiologischen Bedingungen verantwortlich. Expression der dritten Isoform (iNOS oder NOS-II) wird in Zellen des Immunsystems durch bakterielle Endotoxine oder inflammatorische Zytokine induziert (Hecker et al., 1999). Sie liegt an Kalmodulin gebunden vor und bildet unabhängig vom intrazellulären Kalzium (Ca^{2+})-Spiegel große Mengen an NO.

1.3 sGC: Struktur und Isoformen

GC katalysieren die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu cGMP, welches als intrazellulärer *second messenger* an der Regulation wichtiger Funktionen in verschiedenen Zelltypen beteiligt ist. Sowohl partikuläre (pGC) als auch lösliche Isoformen der GC sind beschrieben worden. pGC sind homodimere Membranrezeptoren für natriuretische Peptide. sGC ist ein heterodimeres (sGC α/β) zytosolisches Hämprotein, das als Rezeptor für NO fungiert.

sGC besteht aus einer größeren α - (sGC α) und einer kleineren β -Untereinheit (sGC β), die die Hämgruppe bindet (Harteneck et al., 1990; Buechler et al., 1991). Die

β -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa, während die α -Untereinheit 73 kDa (Schwein, Rind) oder 82 kDa (Mensch, Ratte) groß ist (Gerzer et al., 1981; Kamisaki et al., 1986). Getrennt exprimierte Untereinheiten besitzen selbst keine katalytische Aktivität (Zabel et al., 1999), obwohl die Sequenzanalyse zeigt, dass jede Untereinheit eine regulatorische Domäne besitzt. Beide Untereinheiten von sGC haben eine ähnliche Struktur (Abb.1.2): eine C-terminale katalytische Domäne, eine N-terminale regulatorische Domäne und eine Dimerisierungsdomäne (Wedel et al., 1995). Die N-terminale Domäne von sGC ist verantwortlich für die unterschiedlichen Eigenschaften der α - und β -Untereinheit. Die sGC ist ein Hämprotein, das ein Hämmolekül pro Heterodimer besitzt (Brandish et al., 1998). Ein fünffach koordiniertes Häm hat ein zweiwertiges zentrales Eisenatom und ein Histidin als axialen Liganden in der fünften Koordinationsbindung (Stone and Marletta, 1994) (Abb.1.2). Häm ist mit der N-terminalen Domäne der β -Untereinheit durch das Histidin (His105) verbunden (Wedel et al., 1994). Das Häm hat eine zentrale Bedeutung für den Aktivierungsmechanismus.

Es sind vier verschiedene Isoformen der sGC beschrieben worden: sGC α_1 , sGC α_2 , sGC β_1 und sGC β_2 (Koesling et al., 1988; Nakane et al., 1988; Koesling et al., 1990; Yuen et al., 1990; Harteneck et al., 1991). Für den Mensch wurden zwei zusätzliche Untereinheiten (sGC α_3 und sGC β_3) postuliert (Giulli et al., 1992), die erst aufgrund von Sequenzfehlern für nicht identisch mit den bereits bekannten sGC α_1 - und sGC β_1 -Untereinheiten gehalten wurden (Zabel et al., 1998). Die relative Verteilung und Bedeutung der verschiedenen Untereinheiten ist nicht klar. Während sGC α_1 bzw. sGC α_2 mit sGC β_1 Heterodimere mit nahezu gleichen enzymatischen

Eigenschaften bildet (Russwurm et al., 1998), scheint sGC β_2 in der Lage zu sein, katalytisch aktive Homodimere zu bilden (Koglin et al., 2001). Es bildet aber keine aktiven Heterodimere mit anderen Untereinheiten.

Die Dimerisierung des Proteins spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität, da dieses im Wesentlichen nur als Heterodimer aktiv ist.

Die verschiedenen Untereinheiten sind in gewissem Maße austauschbar, jedoch kann nur die Kombination einer α - mit einer β -Untereinheit ein funktionelles Enzym liefern. sGC α_1 und sGC β_1 werden in fast allen Zellen und Gewebe (am stärksten in der Lunge und im Gehirn) exprimiert (Schmidt et al., 1992; Budworth et al., 1999; Theilig et al., 2001). Die sGC α_2 -Untereinheit wurde als Protein in Plazenta (Russwurm et al., 1998) und im Gehirn (Russwurm et al., 2001) nachgewiesen, während die sGC β_2 -Untereinheit nur in Nieren und Leber auf mRNA Ebene gefunden

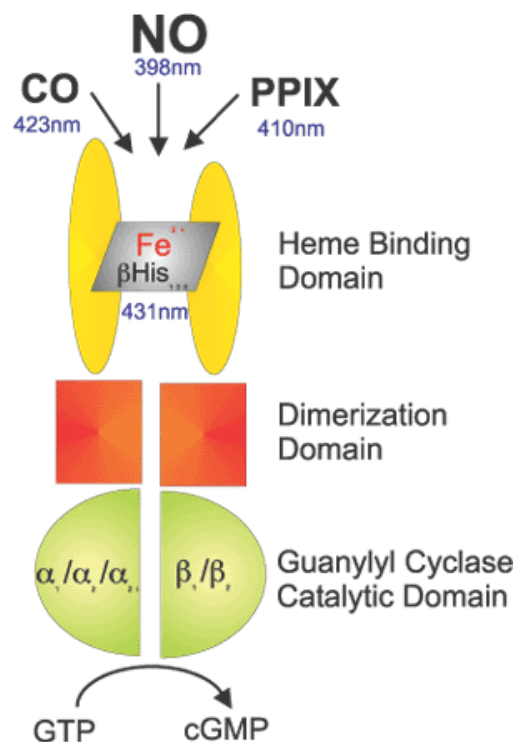


Abb.1.2 Struktur der sGC. Übernommen von der Internetseite von Alexis Corporation .

wurde (Yuen et al., 1990). Interessanterweise ist eine Bildung von Homodimeren (sGC α_1/α_1 und sGC β_1/β_1) in sGC-exprimierenden Sf9-Zellen möglich (Zabel et al., 1999). Da Homodimere jedoch inaktiv sind, ist eine Rolle in der cGMP-Synthese nahezu ausgeschlossen. Das Vorkommen einer sGC-Homodimerisierung *in vivo* und deren mögliche physiologische oder pathophysiologische Bedeutung ist momentan unklar. Die Kenntnis der subzellulären Verteilung der verschiedenen sGC Untereinheiten in verschiedenen Geweben und deren Regulation ist für unser Verständnis des NO-cGMP-Signaltransduktionweges essentiell.

1.4 Regulation der sGC-Aktivität

1.4.1 Aktivatoren der sGC

Die Aktivität der sGC kann durch unterschiedliche Faktoren moduliert werden, der Hauptregulator der sGC ist jedoch NO.

NO bindet direkt an die prosthetische Hämgruppe der sGC. Die reversible Interaktion von sGC mit NO bewirkt eine dramatische Steigerung der Enzymaktivität. Diese kann beim nativen Enzym bis zu 200-fach sein (Stone and Marletta, 1998; Hoenicka et al., 1999; Lee et al., 2000) oder sogar bis zu 400-fach (Humbert et al., 1990; Stone and Marletta, 1995). Bereits nanomolare Konzentrationen von NO sind ausreichend, um maximale Stimulierung der sGC zu induzieren (Bellamy et al., 2000; Bon and Garthwaite, 2001). Im nicht-aktiven Zustand ist das Eisenatom des Häms der sGC mit dem His105 koordiniert (Stone and Marletta, 1994). Ein Absorptionsspektrum dieser NO-freien Hämgruppe zeigt ein Maximum bei 431 nm (Gerzer et al., 1981). Die koordinative Bindung von NO an die sechste Position des zentralen Eisenatoms führt zur Bildung eines sechsfachkoordinierten Nitrosyl-Häm-

Komplexes. Dabei zieht NO das Eisen aus der Ebene des Porphyrinringes, wodurch die im basalen Zustand vorhandene Histidin-Eisen-Bindung schnell gelöst wird (Abb.1.3). Nach der Öffnung der Histidin-Eisen-Bindung entsteht ein fünffachkoordinierter Nitrosyl-Häm-Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 398 nm, dadurch wird vermutlich die sGC aktiviert (Koesling, 1999). Spektrale Untersuchungen bestätigen das Vorhandensein des fünffachkoordinierten Nitrosyl-

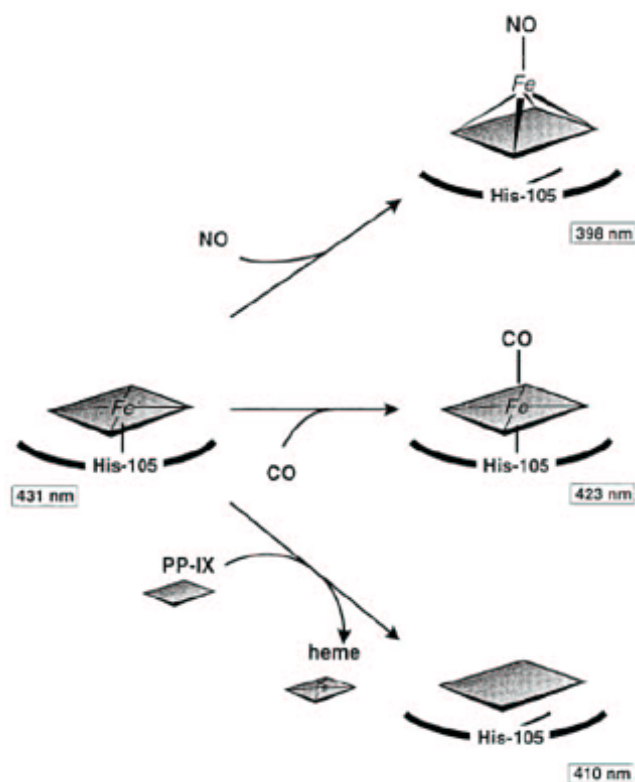


Abb.1.3 Hämgruppe von sGC. Übernommen aus Koesling (1999)

Häm-Komplexes in sGC nach der Stimulation (Schelvis et al., 1998; Sharma and Magde, 1999).

Wie NO bindet auch Kohlenmonoxid (CO) an die Hämgruppe der sGC mit hoher Affinität (Cary and Marletta, 2001). Aber im Gegensatz zu NO, bildet CO einen sechsfachkoordinierten Carbonyl-Häm-Komplex (Absorptionsmaximum bei 423 nm), ohne die Histidin-Eisen-Bindung zu brechen (Stone and Marletta, 1994; Burstyn et

al., 1995) (Abb.1.3). Wesentlich geringere Stimulation der sGC durch CO wird als Indiz für die essentielle Rolle der Fe-His105 Bindung in der Regulation der sGC betrachtet. Die physiologische Bedeutung von CO als Signalmolekül bei der Aktivierung der sGC ist bis jetzt unklar.

Protoporphyrin IX (PPIX), das eisenfreie Häm analog, stimuliert die sGC Häm- und NO-unabhängig (Ignarro et al., 1982). Da PPIX kein Eisen enthält, könnte die Struktur dem NO-Häm-Komplex ähneln, bei welchem das Eisen aus der Ebene des Porphyrinringes gezogen wird (Ignarro et al., 1982) (Abb.1.3). Im Gegensatz zu NO und CO stimuliert PPIX die Häm-freie Form der sGC (Ohlstein et al., 1982). PPIX bindet an sGC bei niedrigen Konzentrationen und bildet einen stabilen Komplex (Ignarro et al., 1982; Wolin et al., 1982) mit einem Absorptionsmaximum bei 410 nm. Der Effekt von PPIX auf die kinetischen Parameter der sGC gleicht dem Effekt von NO.

5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl-1-Benzylindazol (YC-1) wurde als erster direkter Aktivator der sGC beschrieben. Es aktiviert ohne die Beteiligung von NO (Abb.1.4). 1995 haben Wu und Mitarbeiter diese Substanz als einen Inhibitor der Thrombozytenaggregation beschrieben, der die intrazelluläre cGMP-Konzentration erhöht (Wu et al., 1995). YC-1 ist ein schwacher sGC-Stimulator, der bis zur 12-fachen Aktivierung der gereinigten sGC führt (Friebe et al., 1996; Mulsch et al., 1997). Diese Aktivierung ist unabhängig von NO, erfordert aber die Anwesenheit der prosthetischen Hämgruppe, obwohl es keine direkte Interaktion zwischen YC-1 und der prosthetischen Hämgruppe des Enzyms gibt (Friebe and Koesling, 1998). Die Substanz erhöht die Empfindlichkeit der sGC gegenüber NO oder CO (Friebe and Koesling, 1998). Der schwache Aktivator CO aktiviert bei gleichzeitiger Anwesenheit

von YC-1 die sGC in einem ähnlichen Ausmaß wie NO (Friebe et al., 1996). Die Untersuchungen haben gezeigt, dass YC-1 und NO die sGC synergistisch aktivieren (Friebe et al., 1996; Mulsch et al., 1997). YC-1 verlangsamt die Deaktivierung der NO-stimulierten sGC-Aktivität, die durch Zugabe von NO-scavenger (Substanzen, die NO abfangen) ausgelöst wird (Friebe and Koesling, 1998). Zusammengefasst wird der Effekt von YC-1 über die Abnahme der Dissoziationsgeschwindigkeit der gasförmigen Liganden (NO oder CO) vom Häm vermittelt. Der enorme Effekt von YC-1 auf den cGMP-Level in Trombozyten wird sowohl durch den Anstieg der cGMP-Synthese als auch durch Reduktion des cGMP-Abbaus als Folge der Inhibition der Phosphodiesterase (PDE) verursacht (Friebe et al., 1998; Galle et al., 1999).

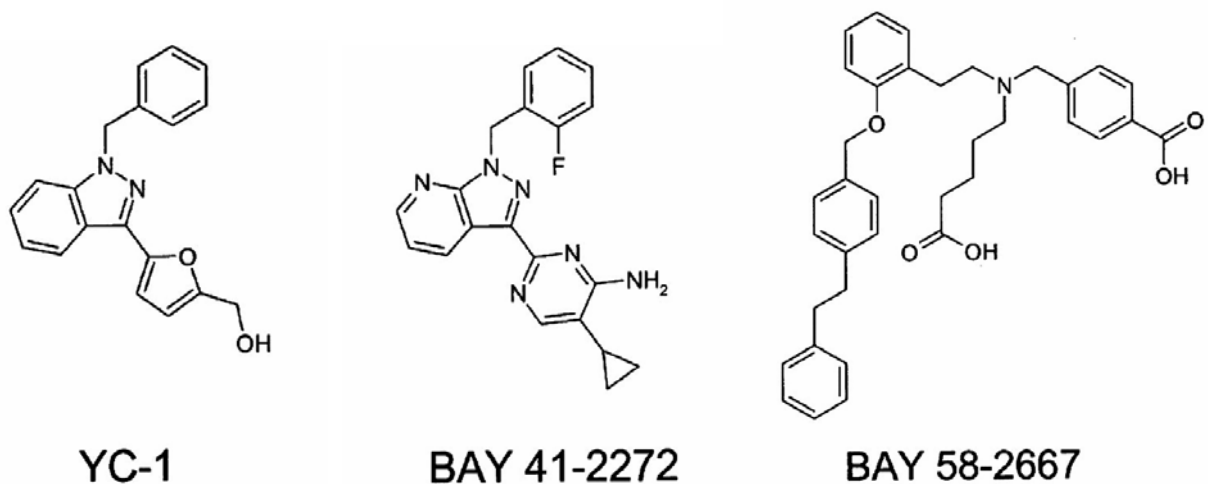


Abb.1.4. Aktivatoren der sGC: YC-1, BAY 41-2272, BAY 58-2667

Neben YC-1 wurden weitere Modulatoren der sGC entwickelt. 5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine (BAY41-2272) (Abb.1.4) besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu YC-1. Es stimuliert die NO-sensitive sGC bis zu 30-fach NO-unabhängig (Stasch et al., 2001). Es scheint, dass die Bindungsstelle von YC-1 und BAY41-2272 identisch ist (Stasch et al., 2001). Im Gegensatz zu YC-1 wirkt BAY41-2272 spezifischer und zeigt keinen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität von PDE5 (Stasch et al., 2001). Andere Arbeitsgruppen haben aber gezeigt, dass BAY41-2272 ähnlich wie YC-1 auch eine Hemmung der PDE5 verursacht (Mullershausen et al., 2004), welche zum pharmakologischen Effekt von BAY41-2272 beitragen kann.

Vor kurzem wurde noch ein Aktivator der sGC 4-[[[(4-carboxybutyl)]2-[(4-phenethylbenzyl)oxy] phenethyl(amino) methyl[benzoic]acid (BAY58-2667) beschrieben (Abb.1.4). Besonders interessant ist ein ganz neuer Mechanismus der Aktivierung von sGC durch diese Substanz. BAY58-2667 aktiviert nicht nur die native sGC, sondern auch die Häm-freie oder oxidierte sGC (Stasch et al., 2002), was ein klarer Unterschied zu NO, YC-1 und BAY41-2272 ist. Aufgrund der Bindungsstudien sind zwei Bindungsstellen für BAY58-2667 an dem Enzym gezeigt worden (Stasch et al., 2002). Gleichzeitig hat eine Gruppe von Aventis Pharma zwei andere, aber ähnlich wirkende Substanzen, entwickelt. S3448 und HMR1766 aktivieren reversible *in vivo* und *in vitro* die Häm-oxidierte Form der sGC (Schindler et al., 2003). Es konnte ein Anstieg von Potenz und Effizienz dieser beiden sGC-Aktivatoren gezeigt werden, wenn das Eisen der Hämgruppe durch 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ) oder 4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazin-1-one (NS2028) oxidiert wird (Nedvetsky et al., 2003).

1.4.2 Inhibitoren der sGC

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Produktion der cGMP durch sGC zu hemmen. Die erste Möglichkeit ist die Verfügbarkeit von NO zu verringern. Es gibt eine Reihe von NO-scavenger und alle diese Substanzen regulieren die sGC-Aktivität runter. Dabei kann diese Hemmung durch Überschuss von NO rückgängig gemacht werden. Streng genommen sollten aber diese Substanzen nicht als sGC-Hemmer betrachtet werden, da sie nur die Verfügbarkeit des Liganden und nicht die Funktion des Enzyms verändern. Da NO auch eine Reihe von cGMP-unabhängigen Effekten hat, braucht man einen spezifischen sGC-Hemmer, um zwischen cGMP-abhängigen und cGMP-unabhängigen Effekten von NO zu unterscheiden.

Eine andere Möglichkeit zur Hemmung der sGC ist der Einsatz von Substanzen, die durch strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat (GTP) in der Lage sind, an die katalytische Stelle zu binden und auf diese Weise das Enzym zu hemmen. Entscheidender Nachteil dieser Substanzen ist, dass sie sowohl sGC als auch pGC hemmen, da die katalytischen Domänen beider Enzyme strukturell ähnlich sind.

Die breiteste Anwendung in der sGC-Forschung haben zwei andere Gruppen von Substanzen bekommen. Die Wirkung dieser Substanzen beruht entweder auf dem Verdrängen des Häms aus der sGC oder auf der Oxidation der prosthetischen Gruppe.

Als einer der ersten sGC-Inhibitoren ist Methylenblau (MB) beschrieben worden (Abb.1.5). Der Wirkungsmechanismus dieser Substanz auf sGC ist nicht vollständig verstanden, obwohl die Oxidation des Häms eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Zuerst galt MB als ein spezifischer Inhibitor der sGC, dann konnte aber eine Inhibition

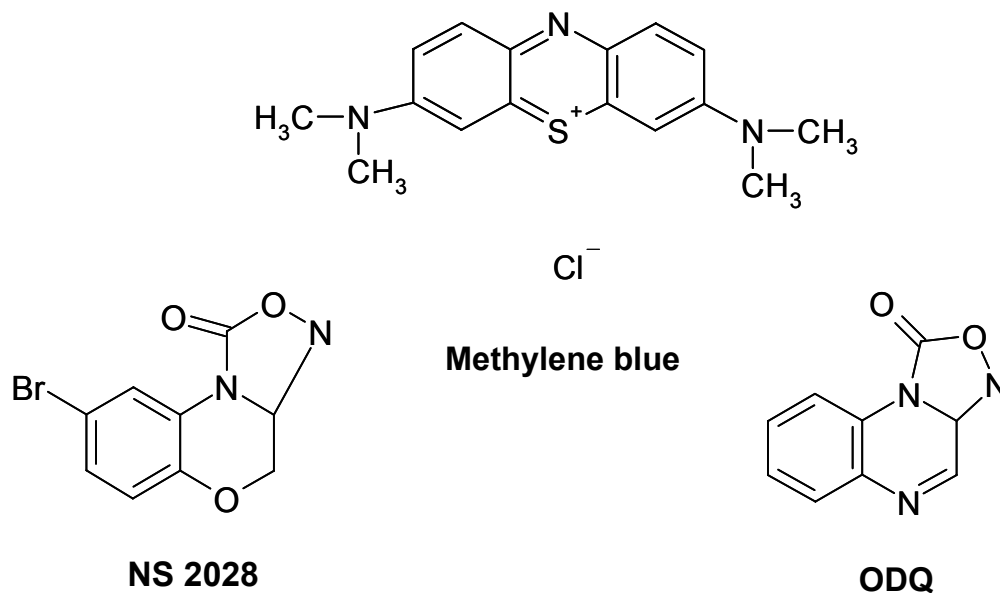


Abb.1.5. Inhibitoren der sGC: MB, ODQ, NS2028.

der anderen Enzyme, zum Beispiel NOS (Mayer et al., 1993), oder eine Beteiligung im Abfangen von NO durch Produktion von Superoxid (O_2^-) (Marczin et al., 1992) gezeigt werden. O_2^- reagiert mit NO, wobei Peroxynitrit ($ONOO^-$) entsteht, welches nur geringe stimulierende Wirkung auf sGC hat (Marczin et al., 1992). Im Gegensatz zu dem anderen sGC-Inhibitor ODQ, konnte MB keine komplette Blockierung der cGMP-Synthese und Relaxation in Antwort auf Sodyumnitroprusside (SNP) in Meerschweinchentracheen induzieren (Hwang et al., 1998). Es zeigte sich, dass die Fähigkeit von MB, die cGMP-Akkumulation in kultivierten Glattmuskelzellen zu hemmen, direkt mit seiner Fähigkeit NO abzufangen korreliert (Marczin et al., 1992).

Ein anderer indirekter Inhibitor der sGC ist 6-anilino-5,8-quinolinedion (LY-83583), deren Wirkung sich ebenfalls wie MB durch Superoxiddismutase teilweise unterbinden lässt. Es wurde gezeigt, dass LY-83583 ein Substrat für die Gluthathion-Reduktase ist, wodurch die intrazelluläre Konzentration an oxidiertem Glutathion steigt, welches die sGC irreversible hemmen kann (Braugher, 1983).

ODQ und die andere chemisch verwandte Substanz NS2028 sind die

spezifischsten zur Zeit bekannten sGC-Hemmer, die direkt die Stimulierbarkeit der sGC verringern (Abb.1.5). Sie hemmen sGC durch eine Oxidation des Eisens der Hämgruppe (Fe(II) zu Fe(III)) (Schrammel et al., 1996; Dierks and Burstyn, 1998). Diese Modifikation des Enzyms ist irreversibel und führt zu einer deutlichen Reduktion der Affinität des Häms zu NO, so dass die Stimulierbarkeit der sGC mit physiologischen NO-Konzentrationen abnimmt.

NS2028 inhibiert irreversibel und konzentrationsabhängig gereinigte sGC (Olesen et al., 1998). Die Nitroglycerin-induzierte Relaxation der Meerschweinchentracheen wurde durch NS2028 komplett inhibiert (Olesen et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass NS2028 die YC-1-stimulierte sGC-Aktivität auch inhibiert (Olesen et al., 1998).

ODQ kann sowohl NO-vermittelte sGC-Aktivität bei Stimulation der Gehirnschnitten durch Glutamat (Garthwaite et al., 1995), als auch NO-abhängige Relaxation der Glattmuskelzellen und Abnahme der Trombozytenreaktivität (Cellek et al., 1996; Moro et al., 1996) blockieren. ODQ kann aber auch andere Hämproteine (NOS und Cytochrome P450) inhibieren (Feelisch et al., 1999). Interessanterweise, kann sGC-Aktivator YC-1 entweder die Affinität der oxidierten sGC zu NO erhöhen oder Oxidation der sGC durch ODQ verlangsamen (Bellamy and Garthwaite, 2002).

Metalloporphyrine besitzen ebenfalls die Fähigkeit, die Stimulierbarkeit der sGC zu senken. Zink-Protoporphyrin IX (ZnPPIX) und Zinn-Protoporphyrin IX (SnPPIX) hemmen *in vivo* die NO-induzierte cGMP-Produktion in Rattenkleinhirn (Luo and Vincent, 1994) und hohe ZnPPIX Konzentrationen inhibieren die basale Aktivität von gereinigtem sGC auf 80% (Serfass and Burstyn, 1998). Es wurde gezeigt, dass andere Metalloporphyrine (MnPPIX und CoPPIX) auch Inhibitoren von sGC sind

(Ignarro et al., 1984; Serfass and Burstyn, 1998). Diese Substanzen sind offenbar in der Lage, mit dem Häm um die Bindungsstelle der sGC zu konkurrieren und es durch eine Koordinationsbindung mit dem Enzym zu inhibieren (Ignarro et al., 1984).

Es wurde noch ein weiterer Inhibitor der NO-abhängigen sGC-Aktivierung beschrieben. β -Alanyl-L-Histidine (Karnosin) ist ein natürlich vorkommendes Dipeptid, das wichtige biologische Funktionen, vor allem durch seine antioxidativen Eigenschaften, erfüllt (Boldyrev, 1998). Es wurde gezeigt, dass Karnosin die sGC-Aktivierung durch SNP und Furoxan-1,2,5,-oxadiazolo-trioxide (NO-Donor) inhibiert (Severina et al., 2000). Es ist bekannt, dass Karnosin chelate Komplexe mit Ionen von bivalenten Metallen (zum Beispiel mit Fe (II)) bilden kann (Vladimirov, 1996). So könnte die Inhibition der sGC durch die Interaktion von Karnosin mit dem Hämeisen des Enzyms erfolgen.

1.5 Redox-Regulation der sGC

Von allen oben genannten Regulatoren der sGC (Aktivatoren und Inhibitoren) gilt nur NO als ihr physiologischer Regulator. Es wird aber immer deutlicher, dass es zusätzliche Mechanismen geben muß, die sGC regulieren. Eine stark diskutierte Möglichkeit der sGC-Regulation ist die Regulation durch eine oxidative Modifikation der essentiellen Gruppen des Enzyms (Redox-Regulation).

Es wurde sehr früh gezeigt, dass Substanzen mit reduzierendem oder oxidierendem Potenzial einen Effekt auf sGC-Aktivität haben, der vermutlich über Modifizierung von Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) des Enzyms vermittelt wird (Ignarro et al., 1980; Ignarro and Gruetter, 1980). So inhibieren SH-Gruppen-oxidierende Substanzen sowohl basale als auch stimulierte sGC-Aktivität (Craven

and DeRubertis, 1978a). Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass erst anhaltende Behandlung mit Thioloxydantien sGC inaktiviert (Braugler, 1983), während eine kurzzeitige Behandlung eine stimulierende Wirkung hat (Braugler et al., 1979). Sowohl stimulierende (Niroomand et al., 1989) als auch hemmende (Braugler, 1983) Effekte der SH-reduzierenden Substanzen auf sGC wurden beschrieben. Trotz dieser beiden Effekte der Thiolreduktantien wurde postuliert, dass die Anwesenheit bestimmter reduzierter SH-Gruppen der sGC für ihre Aktivität erforderlich ist (Ignarro et al., 1981; Wu et al., 1992). Eine in diesem Zusammenhang sehr interessante Studie wurde durch eine deutsche Arbeitsgruppe um Prof. V. Ullrich veröffentlicht. Es wurde beschrieben, dass geringe Konzentrationen von Thioloxydantien in Gegenwart von Gluthation sGC aktivieren, wobei es zu kovalenten Bindungen zwischen dem Enzym und dem Gluthation kommt (Wu et al., 1992). Es wurde postuliert, dass diese posttranskriptionellen Modifikationen sGC-Aktivität regulieren.

Da NO und einige seiner Derivate sehr leicht und schnell mit SH-Gruppen reagieren, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass auch NO seine Effekte auf sGC zum Teil über Modifizierung der SH-Gruppen ausübt. Andererseits sind Nitrosothiole (Substanzen, die als Produkte in der Reaktion zwischen Thiolen und NO entstehen) auch NO freisetzende Substanzen und sGC-Aktivatoren. Aus diesem Grund ist es sehr schwierig genau zu sagen, ob Thiole ihre Effekte durch eine direkte Wirkung auf sGC ausüben oder Freisetzung und Verfügbarkeit von NO beeinflussen. Als Beispiel dafür könnte ONOO- dienen. Diese Substanz ist nur ein sehr schwacher sGC-Aktivator (Mayer et al., 1995). Dabei spielt wahrscheinlich die geringfügige Freisetzung von NO die entscheidende Rolle. Mayer und Mitarbeiter haben gezeigt,

dass OONO—induzierter Anstieg des cGMP-Spiegels in EZ durch Anwesenheit von Substanzen beeinträchtigt war, die den intrazellulären Glutathion-Spiegel senken (Mayer et al., 1995). Der Grund dafür könnte eine Reaktion zwischen ONOO- und Thiolen sein, wobei Nitrosothiole entstehen (Stamler et al., 1992), die bessere sGC-Aktivatoren als ONOO- selbst sind. Andererseits könnte Glutathion die oxidierende Wirkung von ONOO- auf sGC vermindern (Weber et al., 2001).

Weitere Studien bezüglich sGC, ihre Empfindlichkeit gegenüber NO, aber auch die Freisetzung von NO aus NO-Donoren haben die Interpretationen der Wirkung von Redox-aktiven Substanzen auf sGC in Frage gestellt. Es wurde einerseits gezeigt, dass sGC extrem empfindlich gegenüber NO ist und bereits bei geringsten Konzentrationen aktiviert werden kann (Bellamy et al., 2000; Bon and Garthwaite, 2001). Andererseits setzen fast alle NO-Donoren, die in den früheren Studien verwendet wurden, NO entweder mit sehr geringer Geschwindigkeit oder sehr rasch frei. In beiden Fällen ist es sehr schwierig, die reale NO-Konzentration vorauszusagen, besonders wenn Redox-aktive Substanzen, die NO abfangen können oder seine Freisetzung aus NO-Donoren beeinflussen, in dem Medium vorhanden sind. Es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, dass viele Effekte von Redox-aktiven Substanzen auf sGC durch Veränderung der realen Konzentration von NO zustande kommen. Dass diese Vereinfachung nicht für alle Fälle zutrifft, zeigt eine jüngere Arbeit aus unserem Labor. In dieser Arbeit wurden Protein- und Aktivitätslevel der sGC im Rattenhirn gemessen (Nedvetsky et al., 2002). Während die Proteinlevels der sGC in verschiedenen Hirnregionen nur marginal variierten (maximal bis zu 2-fach), erreichten die Unterschiede in sGC-Aktivität zwischen verschiedenen Regionen das 10-fache. Da in der Arbeit eine sehr hohe

Konzentration eines neuartigen NO-Donors mit gut untersuchter Kinetik der NO-Freisetzung benutzt wurde, können diese Unterschiede nicht auf unzureichende Stimulation der sGC zurückgeführt werden. Es müssen Mechanismen vorhanden sein, die neben NO die sGC-Aktivität modulieren.

Eine andere Möglichkeit sGC zu regulieren, ist sGC-Häm zu beeinflussen. So wurde es bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass der Verlust der Aktivität der gereinigten sGC durch Zugabe von Hämatin, Hämoglobin und Methämoglobin in Gegenwart von reduzierenden Substanzen (Dithiothreitol (DTT), Cystein, Ascorbinsäure oder Glutathion) aufgehoben werden kann (Craven and DeRubertis, 1978b). In weiteren Experimenten mit gereinigter sGC wurde gezeigt, dass Häm für die Aktivierung des Enzyms durch NO und NO-Donore notwendig ist (Ignarro et al., 1982). Dabei spielt der Oxidationszustand des Häms eine wichtige Rolle, da nur reduziertes Häm in der Lage ist, die Aktivierung der sGC durch NO zu unterstützen. Darauf basiert der Wirkungsmechanismus des sGC-Inhibitors ODQ, dessen Effekt durch Oxidation des sGC-Häms vermittelt wird (Garthwaite et al., 1995; Schrammel et al., 1996). Oxidation der prosthetischen Hämgruppe durch ODQ führt zu Inaktivierung der sGC (Schrammel et al., 1996). Auch andere Substanzen, die sGC-Häm oxidieren (wie z.B. Sauerstoff, MB oder Ferrizyanid), inaktivieren das Enzym (Dierks and Burstyn, 1998). Sehr ähnliche Reaktionsgeschwindigkeiten für Hämoxidation und Inaktivierung der sGC deuten darauf hin, dass beide Vorgänge verbunden sind (Dierks and Burstyn, 1998). Es wurde auch gezeigt, dass oxidiertes Häm weniger stabil mit dem Enzym verbunden ist, als reduziertes Häm (Burstyn et al., 1995). Zusätzlich wurde spekuliert, dass das oxidierte Häm vom Enzym dissoziieren kann (Dierks and Burstyn, 1998). Faßt man alle diese Daten zusammen,

dann stellt sich die Frage, warum eine Oxidation des Häm, die zur kompletten Inaktivierung der sGC führt, nicht einer der Faktoren sein kann, die die sGC-Regulation *in vivo* beeinflusst.

Das Häm wird über das Eisen mit dem His105 der sGC koordiniert. Offensichtlich spielen aber auch andere Aminosäurereste eine wichtige Rolle für die Bindung des Häms an sGC. Koesling und Mitarbeiter haben gezeigt, dass zwei weitere Cystein-Reste (Cys-78 und Cys-214 der sGC β 1) für der Hämbindung notwendig sind (Friebe et al., 1997). Die Bedeutung des oxidativen Zustandes dieser Cysteine für die Bindung von Häm und sGC-Aktivierung ist unklar.

Obwohl viele Arbeiten die Bedeutung der Redox-Vorgänge in der Regulation der sGC indirekt andeuten, war es bis jetzt sehr schwierig, oxidierte sGC experimentell nachzuweisen. In erste Linie verhinderte die sehr hohe Empfindlichkeit der sGC gegenüber verschiedenen oxidativen Faktoren ihre Reinigung im nativen Oxidationszustand. Die Anwesenheit der oxidierten sGC in Präparaten des gereinigten Enzyms könnte einen Aufreinigungsartefakt darstellen. Andererseits, da in allen Protokollen für sGC-Reinigung starke reduzierende Substanzen (wie z.B. DDT) vorhanden sind, könnte man auch nicht ausschließen, dass oxidierte sGC (falls sie *in vivo* vorkommt) bei der Reinigung reduziert wird.

Die biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften der reduzierten und oxidierten sGC sind unterschiedlich. Während nur reduzierte Häm-haltige sGC durch NO- und sGC-sensibilisierende Substanzen aktiviert wird, vermutet man, dass oxidierte sGC inaktiv ist. Vor kurzen wurde aber eine Substanz entwickelt, die sehr wohl in der Lage ist, Häm-freie oder oxidierte sGC zu aktivieren. BAY58-2667 aktiviert sGC nach der Behandlung mit ODQ viel stärker als natives unbehandeltes

Enzym (Stasch et al., 2002). Auch Häm-freie sGC wird in gleichen Maßen aktiviert. Die Autoren vermuteten, dass sowohl reduzierte Häm-haltige als auch oxidierte oder Häm-freie sGC durch diese Substanz aktiviert wird. Das zu überprüfen, war ein wichtiger Teil unserer Arbeit. Denn eine Substanz, die spezifisch nur oxidierte sGC aktiviert, ist ein sehr wichtiges Tool, um die Anwesenheit und Bedeutung der oxidierten sGC zu untersuchen.

1.6 Pathologie

sGC wird in fast allen menschlichen Organen exprimiert. Die meisten physiologischen Effekte von NO in Blutgefäßsystem, wie Vasorelaxation (Palmer et al., 1987), Hemmung der Aggregation und Freisetzungsreaktion der Thrombozyten (Doni et al., 1991), Regulation der Zellproliferation (Ziche et al., 1994) und Permeabilität der Endothelschichten (Draijer et al., 1995) werden überwiegend durch sGC und cGMP vermittelt. Die wichtige Frage lautet, ob sGC mit irgendwelchen Krankheiten verbunden ist.

Störungen in sGC-Proteinlevel und/oder Aktivität scheinen eine wichtige Rolle bei Hypertonie zu spielen. Eine frühere Arbeit zeigte einen höheren SNP-induzierten Einstieg in die cGMP-Synthese und den β_1 -mRNA-Level in Glattmuskelzellen von spontanhypertensiven Ratten (SHR) (Papapetropoulos et al., 1994). Im Gegensatz dazu wurde in allen späteren Arbeiten Unterregulation der sGC bei Hypertonie beobachtet. So haben Busse und Mitarbeiter eine Abnahme der Expression von sGC β_1 bei genetischer Hypertonie in der Aorta von 16 Monate alten SHR beobachtet (Bauersachs et al., 1998). Eine Erniedrigung der sGC-Proteinlevels oder mRNA-

Levels in der Aorta wurde auch bei jungen SHR gezeigt (Ruetten et al., 1999). Auch in der Schwanzarterie von 4 bis 8 Wochen alten SHR wurde eine Abnahme der Expression und der Aktivität von sGC beobachtet (Ndisang et al., 2003). Die vasodilatorische Effizienz von SNP auf die sGC-Aktivität war bei Hypertonie deutlich reduziert (Kloss et al., 2000). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass in der Aorta von SHR der sGC-Proteinlevel und mRNA-Level niedriger als in normotensiven Ratten sind, was die verminderte Aktivität erklären kann.

Bei Hypoxia konnte eine Hochregulation des sGC-Proteinlevels, der mRNA und der Enzymaktivität in Glattmuskelzellen gezeigt werden (Li et al., 1999). Diese Hochregulation von sGC kann eine wichtige Rolle in der Regulation des Tonus von Glattmuskelzellen und des Blutdrucks in der pulmonaren Blutbahn während Hypoxie spielen.

In Ratten mit Herzinfarkt waren Proteinlevel von NOS-III und sGC β_1 erhöht, während sGC-Aktivität deutlich reduziert war (Bauersachs et al., 1999). Diese komplexen Änderungen in der Regulation der sGC-Aktivität und -Proteinlevel deuten darauf hin, dass es wahrscheinlich mehrere Faktoren gibt, die sGC regulieren. Erhöhung des Proteinlevels könnte eine kompensatorische Antwort auf verringerte sGC-Aktivität sein.

Faktoren, die Störungen in der sGC-Regulation während Krankheiten verursachen, sind noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass veränderte NO-Spiegel und vermehrter oxidativer Stress wichtige Regulatoren des sGC-Spiegels und der sGC-Aktivität sein können. Chronisch gegeben verursachen NO- produzierende sGC-Aktivatoren eine zunehmende Desensibilisierung der sGC (Ujiie et al., 1994). Dies wird auch als Nitrattoleranz bezeichnet (Mulsch et al., 1988).

Diese ist ein Zustand mit verminderter cGMP-Antwort und ausbleibenden physiologischen Effekten. Es wurde gezeigt, dass sGC in Astrozyten durch Zugabe von NO schnell desensibilisiert wird (Bellamy et al., 2000). Eine Langzeitbehandlung mit dem NO-Donor (z)-1-[2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolate (DETA/NO) reguliert in EZ sowohl die sGC-Aktivität als auch das sGC-Proteinlevel nach unten (Ibarra et al., 2001a). Das gleiche Phänomen wurde auch in Nebennierenzellen beobachtet (Ferrero and Torres, 2002). In Glattmuskelzellen verursacht eine kurze Inkubation (2 Std.) mit NO-Donoren eine Abnahme der sGC-Aktivität, während eine langfristige Inkubation (12-24 Std.) auch eine Abnahme von mRNA- und Proteinlevel zur Folge hat (Papapetropoulos et al., 1996b). Filippov und Mitarbeiter haben eine Abnahme von sGC-Aktivität, Proteinlevel und mRNA-Level bei chronischer Behandlung der Glattmuskelzellen von Ratten mit NO gezeigt (Filippov et al., 1997).

Da Zustände mit erhöhtem NO-Spiegel oder vermehrtem oxidativem Stress bei verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten eine wichtige Rolle spielen, kann vermutet werden, dass diese Faktoren zu einer Fehlregulation der sGC führen können. Die Frage, ob diese Fehlregulation der sGC dabei Ursache der Krankheiten oder nur eine Begleiterscheinung ist, bleibt noch unbeantwortet.

Nicht nur NO, sondern auch andere Oxidanzien können sGC beeinflussen. Peroxynitrit, das Produkt der Reaktion zwischen NO und O_2^- , inhibiert gereinigte sGC über eine Modifikation der essentiellen Aminosäurereste (Mayer et al., 1995). Auch in Blutgefäßen verursacht ONOO- eine Verminderung der sGC-Aktivität (Weber et al., 2001). Die Autoren vermuten, dass Oxidation der prosthetischen Hämgruppe dabei die Ursache der Aktivitätssenkung sein könnte.

Auch bei Entzündungen wird der NO-sGC-cGMP-Signalweg moduliert. Während der Entzündungen steigt der Level des inflammatorischen Zytokins IL-1 β (Interleukin-1 β) an (Benveniste et al., 1995; Rothwell and Luheshi, 2000). In Glattmuskelzellen wird der sGC-Proteinlevel und mRNA-Level durch diese Substanz unterreguliert (Takata et al., 2001). Dabei spielen sowohl NO-abhängige als auch NO-unabhängige Mechanismen eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 β in Astrozyten für die Abnahme der Aktivität, der Protein- und mRNA-Level der sGC verantwortlich ist (Pedraza et al., 2003). In Zellen, die dem Zytokin ausgesetzt sind, wird NOS-II exprimiert, was einen hohen NO-Level zur Folge hat (Knowles et al., 1994; Förstermann and Kleinert, 1995). Also könnte auch in diesem Modell ein erhöhter NO-Spiegel die Ursache der sGC-Fehlregulation sein.

Langzeitbehandlungen mit einem NO-Donor werden sowohl als Modell für eine chronische Behandlung mit Nitrovasodilatoren als auch für bestimmte Krankheitszustände (Ruetten et al., 1999), die teilweise mit erhöhter NO-Produktion einhergehen, betrachtet (Sepsis, Entzündung, Schlaganfall). Bei solchen Zuständen scheint eine Verschlechterung der physiologischen Antwort auf NO ein essentieller Teil des Krankheitsbildes zu sein. NO-unabhängige sGC-Aktivatoren wie YC-1 oder direkte Stimulatoren der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) wurden als potentielle neue therapeutische Prinzipien zur Behandlung dieser Zustände beschrieben. Es muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass die Hemmung der PDE durch die Vorläuferverbindung YC-1 (Galleet al., 1999) zu einem überschießenden Anstieg des cGMP, des GTP-Verbrauchs und zur Kreuzaktivierung des cAMP-Signalweges führen kann.

Darüber hinaus scheint sGC über die bekannten Nitrovasodilatoren hinaus ein

interessantes Target für neuartige pharmakologische Behandlungsprinzipien zahlreicher krankhafter Zustände im kardiopulmonalen Gefäßsystem zu sein. Nitrovasodilatoren werden seit über 100 Jahren zur Behandlung von Angina pectoris eingesetzt, NO und NO-freisetzende Substanzen (NO-Donoren) darüber hinaus auch für die Behandlung arterieller Hypertonie, glattmuskulärer Spasmen und zur Tokolyse (Sogo et al., 2000), sowie inhalativ bei der pulmonalen Hypertonie (Hoeper et al., 2000). Deswegen werden NO-unabhängige sGC-Aktivatoren immer häufiger als eine Alternative zu klassischen Nitrovasodilatoren gesehen (Rothermund et al., 2000).

2. Zielsetzung der Arbeit

1. Identifizierung der Redox-Form der sGC, die für pharmakologische Effekte von BAY58-2667 verantwortlich ist.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass in Gegensatz zu anderen bekannten sGC-Aktivatoren BAY58-2667 die oxidierte und Häm-freie sGC aktivieren kann. Es ist aber nicht klar, ob auch die reduzierte Häm-haltige sGC oder ausschließlich die oxidierte Häm-freie sGC für die pharmakologischen Effekte von BAY58-2667 verantwortlich sind. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die reduzierte Häm-haltige sGC durch BAY58-2667 aktiviert werden kann.

2. Charakterisierung der Rolle des Redox-Zustandes des sGC-Häms in der Regulation des sGC-Proteinlevels.

Die Bedeutung von sGC-Häm in der Regulation der sGC-Aktivität ist gut untersucht. Andererseits ist es absolut unklar, welche Rolle Häm und sein Redox-Zustand in der Aufrechterhaltung des sGC-Proteins spielen. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit Wirkung von Hämoxydation auf den sGC-Proteinlevel detailliert untersucht werden.

3. Charakterisierung des ODQ-induzierten sGC-immunpositiven Proteins (p160).

In unseren früheren Arbeiten wurde festgestellt, dass eine Behandlung der EZ mit ODQ zur Entstehung eines hochmolekularen sGC-immunpositiven Proteins

führt. In dieser Arbeit soll dieses Protein und die Rolle der Hämoxidation in seiner Entstehung untersucht werden.

4. Charakterisierung der Wirkung von BAY58-2667 auf sGC-Aktivität und Proteinlevel bei oxidativem Stress.

Oxidativer Stress ist ein wichtiger Risikofaktor verschiedener Herz-Kreislaufkrankheiten. Dabei scheinen die oxidativen Modifikationen an der sGC entscheidend zu den Pathologien beizutragen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob BAY58-2667 zur Korrektur von sGC-Aktivität und sGC-Proteinlevel unter oxidativen Bedingungen angewandt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

3.1.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
30%ige Acrylamid Amid 0,8% Bisacrilamid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
APS	Merck (Darmstadt, Deutschland)
BAY-58-2667	Bayer (Wuppertal, Deutschland)
Benzamidin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
BSA	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
cGMP Detection Kit	Biotrend (Köln, Deutschland)
Coomassie Brillant Blau G-250	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Cystein	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
DEA/NO	Alexis Corporation (Lausen, Schweiz)
DETA/NO	Alexis Corporation (Lausen, Schweiz)
DMNQ	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Dodecylsulfat-Na salz	Serva (Heidelberg, Deutschland)
DTT	Serva (Heidelberg, Deutschland)
EDTA	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Folin-Chiocalteu's Phenol Reagent	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Phosphorsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glutathion reduziert; GSH	Boehringer (Mannheim, Deutschland)
Glycine	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Serva (Heidelberg, Deutschland)
GndHCl	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
GnSCN	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
HEPES Medium 199	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
IBMX	Alexis Corporation (Lausen, Schweiz)
Kreatinphosphat	Calbiochem (Bad Söden, Deutschland)
Kreatinkinase	Calbiochem (Bad Söden, Deutschland)
KCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Leupeptin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MG132	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
MgCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaNO ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaOH	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
ODQ	Alexis Corporation (Lausen, Schweiz)

Pepstatin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
PPIX	Alexis Corporation (Lausen, Schweiz)
Protease Inhibitor Cocktail Tablett	Roche Diagnostics (Penzberg, Deutschl.)
SDS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TEA	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Zaprinast	Alexis Corporation (Lausen, Schweiz)

Der Reinheitsgrad aller Chemikalien war immer *pro analysi*. Für alle Versuche, Puffer und Lösungen wurde entionisiertes Wasser verwendet, das über eine Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) 18 m gewonnen wurde.

3.1.2. Lösungen

BAY 58-2667, PPIX und ZnPPIX wurden in DMSO gelöst

DEA/NO wurde in 10 mM NaOH gelöst

3.1.3 Antikörper

In dieser Arbeit wurden folgende Antikörper (AK) für Western Blot benutzt:

1) Primär-AK:

- anti-sGC α_1** (Kaninchen), Verdünnung: 1:2000
Polyklonale affinitätsgereinigte anti-sGC α_1 AK
(gegen AA 634-647 menschlicher sGC) hergestellt in
unseren Labor
- anti-sGC α_1** (Kaninchen), Verdünnung: 1:5000
Polyklonale affinitätsgereinigte anti-sGC α_1 AK
(gegen AA 673-690), Hersteller: Sigma, Saint Louis, USA
- anti-sGC β_1** (Kaninchen), Verdünnung: 1:2000
Polyklonale affinitätsgereinigte anti-sGC β_1 AK

(gegen AA 593-614), hergestellt in unseren Labor

2) Sekundär-AK:

anti-Kaninchen- (Ziege) Verdünnung: 1:2000

Peroxidase konjugierte HPR-konjugierte Immunglobuline gegen Kaninchen AK aus Zige, Hersteller: DAKO (S/K) (Dänemark)

3.1.4 Säulenfüllmaterialien

GSH-Sepharose 4B Pharmacia Amersham (Freiburg, Deutschland)

3.1.5 Markers

HMW SDS-High Molecular Weight Marker Kit (Glutamine dehydrogenase, 53 kDa; Transferring, 76 kDa; - Galactosidase, 116 kDa; Macroglobin, 170 kDa und Myosin, 212 kDa), Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)

3.1.6 Zellen

Sf9 Eierstockzellen aus Insekten (*Spodoptera frugiperda*)

EZ primäre EZ aus Schweinaorta

3.1.7 Puffer

In dieser Arbeit wurden folgenden Puffer benutzt:

Homogenisierung:

Marletta Puffer, pH 7,4:

25 mM	TEA/HCl
1 mM	EDTA, pH 8,0
5 mM	DTT
75 mM	NaCl
10% (v/v)	Glycerin
1 Tabl/50 ml	Proteaseinhib.-Mix Complete (EDTA frei)

SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse:

Auftragspuffer (Rotiload Puffer):

62,5mM	Phosphate Puffer (pH 7,0)
10 % (v/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
0,001 % (w/v)	Bromphenol blue
5 % (v/v)	2-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer (pH 8,9):

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Transferpuffer für „Semi-Dry-Blotting“ (pH 10,0):

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

Waschpuffer (TBST) (pH 7,5):

20 mM	Tris
150 mM	NaCl
0,1 %	Tween 20

Bestimmung der sGC-Aktivität

sGC Reaktionspuffer:

50 mM	TEA (pH 7,4)
5 mM	Kreatinphosphate
0,25 mg/ml	Kreatinkinase
1 mM	IBMX
100 µM	Zaprinast
3 mM	MgCl ₂
1 mM	GTP
3 mM	Glutathion

Affinitätschromatographie (GSH-Sepharose):

Puffer A: (Phosphatpuffer) pH= 7,4:

10 mM	Na ₂ HPO ₄
1,8 mM	KH ₂ PO ₄
140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl

Puffer B (Waschpuffer) pH= 7,8:

25 mM	TEA
1 mM	EDTA
5 mM	DTT
75 mM	NaCl

Puffer C (Elutionpuffer) pH=8,0:

10 mM	GSH
50 mM	Tris

Reagenzien für Proteinbestimmung *Micro-Lowry Assay* (Peterson, 1977):

<u>A</u> : 0,15 %	Desoxycholic Acid im Wasser
<u>B</u> : 72 % (w/v)	Trichloracetil Acid im Wasser
<u>C</u> : 1 %	CuSO ₄ im Wasser
<u>D</u> : 2 %	Na/K Tartrat im Wasser
<u>E</u> : 3,4 %	Na ₂ CO ₃ im 0,2 M NaOH
<u>F</u> : 10 %	SDS im Wasser
<u>G</u> :	mix C, D, E und F im Proportion 1:1:28:10
<u>H</u> :	Folin-Reagent in 1/4 mit Wasser verdünnt.

EZ

PBS; pH 7,4 :

140 mM	NaCl
2,7mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄

	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
Inkubationsmedium:		
	15 %	FCS
	100 U/mL	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin

in Heppes Medium 199

EZ-Homogenisierung Puffer:

	25 mM	TEA/HCl
	1 mM	EDTA
	5 mM	DTT
	50 mM	NaCl
	10 %(v/v)	Glycerol
	1 Tabl/50 ml	Komplete (EDTA frei)

Sf9-Zellen

IPL-41 Medium:

	100 ml	FCS
	20 ml	Tryptose Phosphat Broth
	10 ml	Pluroic F-68m
	0,5 ml	Gentamycin

Organbad

Krebs-Hanseleit-Puffer; pH 7,4:

	118 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	2,5 mM	CaCl ₂
	1,18 mM	MgSO ₄
	1,18 mM	KH ₂ PO ₄
	24,9 mM	NaHCO ₃
	10 mM	Glukose
	0,03 mM	EDTA

3.1.8 Geräte

Neben den laborüblichen Geräten wurden folgende Geräte eingesetzt:

Chromatographische Säule XK 50 (Pharmacia, Biotech)

Dampfsterilisator Varioklav (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland),

pH-Meter 761 (Calimatic, Deutschland),

Homogenisator Ultra Turrax (Janke&Kunkel; Staufen, Deutschland),

Image Station Kodak Digital Science 440 (Eastman Kodak Company; New Haven, USA),

Komputer PowerMac G3 iMac (Apple Computer Inc.; Cupertino, CA, USA),

Kühlzentrifugen Typ RC 5C Plus (Sorvall, Laboratory Products; Bad Nauheim, Deutschland) und Typ LE-70 Ultracentrifuge (Beckman, USA),

Milliporanlage „Milli-Q“ (Millipore, Neu-Isenburg),

Mini SDS-PAGE Systeme Mini Protean II (Bio-Rad, Hercules; CA, USA),

Mixer Vortex (Janke&Kunkel; Staufen, Deutschland),

Pipetten (Gilson, Middleton, Frankreich),

Semi-dry Transfer Zellen Trans-Blot SD (Bio-Rad, Hercules; CA, USA),

Spannungsgeber Biometra Power Pack P 25 (Biomedizinische Analytik; Göttingen, Deutschland),

Spektrophotometer SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA),

Thermomixer Eppendorf 5436 (Eppendorf-Netheler-Hinz; Hamburg, Deutschland),

Tischzentrifuge Typ 5804 (Eppendorf; Hamburg, Deutschland) und OptimaTMTLX (Beckman Coulter, USA),

Wagen Typ MP-3000 (Electronic Balance; Chyo, Japan) und Typ AT 250 (Mettler, Giessen, Deutschland).

3.2 Software

Adobe Photoshop 3.0	Adobe Systems Inc (San Jose, CA, USA)
Adobe Acrobat 4.0	Adobe Systems Inc (San Jose, CA, USA)
Acrobat reader 5.0	Adobe Systems Inc (San Jose, CA, USA)
EndNote 5.0	ISI ResearchSoft (Berkeley, CA, USA)
GraphicConverter 4.0.8	Lemke Software (Peine, Germany)
Kodak 1D Image Analysis Software	Eastman Kodak Co (New Haven, USA)
Mac OS 9.2	Apple Computer Inc. (Cupertino, USA)
Microsoft Excel 2001	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft PowerPoint 2001	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Word 2001	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
NIH Image Software 1.59	NIH (Maryland, USA)
Prism GraphPad 3.0	Graph Pad Software (San Diego, USA)

3.3 Methoden

Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken und unter Berücksichtigung steriler Arbeitsweisen durchgeführt. Die Haltung der Zellen fand in CO₂-Inkubatoren bei 37°C mit 5% CO₂ statt. Alle Medium und Puffer wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

3.3.1 Endothelzellenkultur

Vorbereitung der Zellkultur. Pulmonale Schweineaorta wurde frisch vom Schlachthof besorgt. Sofort nach der Isolierung wurde die Aorta auf Eis ins Labor transportiert und dann in PBS (37°C) überführt. Die Isolierung von EZ fand enzymatisch statt. Hier wurde die innere Schicht der Aorta mit Collagenase Type CLS II (0,5 mg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurden die Zellen in Heppes Medium 199 gesammelt. Diese Zellsuspension wurde 10 min bei 250 x g zwei Mal zentrifugiert und mit Heppes Medium 199 gewaschen. Der Niederschlag wurde im Inkubationsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in Plastikschaalen mit 0,05% Gelatine überführt. Das Wachstum erfolgte im Inkubator

bei 37°C und 5% CO₂.

Behandlung der Zellen. Die Effekte verschiedener Substanzen auf sGC wurden bei 37°C untersucht. Bei einer Inkubationszeit von mehr als einem Tag, wurden die Zellen alle 24 Std. mit Inkubationsmedium und den zutesteten Substanzen versetzt. Sofort nach der Beendigung der Inkubation wurden die Zellen 3 mal mit eiskalten PBS gewaschen, in 250 µL Routiload lysiert und 10 min bei 95°C aufgekocht (für Western Blot).

3.3.2 Sf9 Zellkultur

Vorbereitung der Zellkultur. Der Ursprung der Sf9-Zellen ist die IPLBSF-21 Zelllinie. Sf9-Insekten-Zellen stammen aus dem Eierstock des in der Verpuppungsphase befindlichen *Spodoptera frugiperda* (Familie Noctuidae, Ordnung Lepidoptera). Die Inkubation der Sf9-Zellen erfolgte im Brutschrank bei 27°C. Wenn nicht anders angegeben wurde das Medium IPL-41 mit Gentamycin (inhibiert die bakterielle Proteinsyntase) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml verwendet. Die Zellen wurden in Glassflaschen bis zu einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml gezüchtet und weiter für sGC-Expression benutzt.

Baculoviren Konstrukte. Die zur Expression von rekombinantem Protein eingesetzten Baculoviren sind doppelsträngige zirkuläre DNA-Viren, die die Insektenzellen befallen. Für die Infektion von Zellen wurden rekombinante Baculoviren verwendet, die *human* sGC (hsGC) kodieren: hsGC α_1 (oder getaggte-hsGC α_1 -GST) und hsGC β_1 (Zabel et al., 1999).

Produktion von rekombinanter hsGC. Zur Infektion der Sf9-Zellen mit dem Baculovirus erfolgte das Wachstum der Zellen bis zu einer Dichte von $4-2 \times 10^6$ Zellen/ml (spinner Kultur). Dann wurden die Zellen abzentrifugiert in frisches IPL-41 Medium umgesetzt und rekombinante Baculoviren (5 pfu/Zellen) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 72 Std. lang bei 27°C. Alternativ, um Bildung des p160 zu ermöglichen, wurde nach 48 Std. Inkubation mit den Viren 100 µM ODQ zugegeben und weitere 24 Std. inkubiert.

Herstellung der cytosolischen Fraktion. Der Ansatz mit infizierten Zellen wurde bei 400 x g 20 min bei 4°C zentrifugiert und das Medium wurde dekantiert. Der

Niederschlag wurde in PBS aufgespült, zentrifugiert (400 x g, 20 min bei 4°C) und dekantiert. Zum Niederschlag wurde hypotonische Marletta Puffer (ohne NaCl und Glycerin) zugegeben. Die Zellen wurden gut resuspendiert, in ein 50 ml Röhrchen überführt und 20 min auf Eis lysiert. Anschließend konnten die Zellreste abzentrifugiert (20 min bei 49 000 x g) und der Überstand gesammelt werden. Danach wurde der Überstand mit NaCl und Glycerin (bis zu Endkonzentrationen von 75 mM und 10 % entsprechend) versetzt, aliquotiert (ca. 8 ml in 15 ml Röhrchen) und bei -20°C eingefroren.

3.3.3 Reinigung p160 und sGC aus Sf9/Baculoviren Zellen durch Affinitätschromatographie mittels GSH-Sepharose

Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist, dass durch Kopplung von geeigneten Liganden an Gelpartikeln eine Affinitätsmatrix entsteht, an der der zu isolierende Stoff hochspezifisch gebunden und von dem er spezifisch eluiert werden kann.

sGC und p160 wurden durch Affinitätschromatographie mittels GSH-Sepharose durch Bindung der GST-getagten sGC α_1 an Glutathion-Sepharose aufgereinigt.

Die Affinitätschromatographie wurde mit GSH-Sepharose in einer 50 ml Säule (Biorad) durchgeführt. Säulenmaterial wurde in die Säule gepackt und mit 10 Säulenvolumina von Puffer A und dann mit 4 Säulenvolumina von Puffer B äquilibriert. Cytosolische Proteine von Sf9-Zellen wurden auf die Säule appliziert und der Load (L) wurde aufgefangen. Das Waschen der Säule erfolgte mit 10 Säulenvolumina Puffer B wobei zuerst der Durchlauf (D) und dann die Waschfraktion (W) aufgefangen wurde. Anschließend konnten die Proteine mit 5 Säulenvolumina Puffer C eluiert werden. Das Elutionsvolumen wurde in Fraktionen (E) gesammelt. Zu allen Elutionsfraktionen wurde 10% (v/v) Glycerin zugegeben. Die Identifizierung von sGC und p160 erfolgte mittels SDS-PAGE-Elektrophorese und Western Blott. Dafür wurden Fraktionen (L, D, W, E $_n$, wo n - Zahl der Elutionsfraktionen) mit Rotiload versetzt und für 10 min bei 95°C gekocht. Fraktionen mit einem hohen Gehalt von p160 wurden mit Coomassie Kolloidal gefärbt. Die gefärbten Banden von sGC α_1 , sGC β_1 und p160 wurden ausgeschnitten und die Proteine konnten mittels einer

Massenspektrometrie MALDI-TOFF identifiziert werden.

3.3.4 Bestimmung der cGMP-Levels in EZ

Zur Bestimmung des cGMP-Levels in EZ, wurden diese mit sGC stimulierenden Substanzen bei 37°C behandelt. Um cGMP-Synthese und -Abbau zu stoppen wurden die Zellen dreimal mit 3 ml PBS gewaschen und mit 1 ml 70 % Ethanol lysiert. Die Zellen wurden abgekratzt und zusammen mit Ethanol in Eppendorf-Gefäss überführt. Die Entfernung des Ethanols erfolgte durch Speedvac-Zentrifugation (über Nacht bei RT). Die Pellets wurden in 300 µl Assaypuffer aus dem cGMP-EIA Kit (Biotrend; Köln, Deutschland) aufgenommen und mit Ultraschall bis zur Homogenität behandelt. Diese Proben wurden für den cGMP-Assay verwendet.

3.3.5 cGMP-Assay

cGMP wurde mit Hilfe von Enzym-Immunoassay Kit (cGMP-EIA Kit) von Biotrend (Köln, Deutschland) gemessen. cGMP-enthaltene Proben wurden im Assay Puffer (cGMP-EIA Kit) solubilisiert und 100 µl davon auf die Mikrotiter-Platten (cGMP-EIA Kit) mit Anti-Kaninchen AK aufgetragen. Danach wurde zur jeder Probe 50 µl cGMP-alkalischer Phosphatase Konjugate (cGMP-EIA kit) und 50 µl anti-cGMP AK aus Kaninchen (cGMP-EIA Kit) zugegeben. Für die Bestimmung der basalen Aktivität wurden 10 µl Lösungsmittel für den sGC-Aktivator hinzugefügt. Die Platte wurde bei 350 rpm 2 Std. bei RT geschüttelt. Nach vier Waschschritten mit 200 µl Waschpuffer (cGMP-EIA Kit), erfolgte die Zugabe von 200 µl Substrat (cGMP-EIA Kit) für die alkalische Phosphatasen. Die Platte wurde bei RT 1 Std. inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 5 M NaOH gestoppt. Die Messung der optische Dichte der Proben erfolgte bei 405 und 650 nm. Die Auswertung der cGMP-Messung wurde nach dem Protokoll des Herstellers des Kits mit Hilfe der AssayZap-Software (Biosoft, Cambridge, UK) durchgeführt.

3.3.6 Proteinbestimmung mittels Micro-Lowry Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach einer Trichloressigsäure (TCA)-Proteinfällung mit Hilfe der modifizierten Lowry-Methode (Peterson, 1977)

durchgeführt. Diese Methode nutzt aus, dass die Verbindung zwischen Peptidbindungen und Cu^{2+} sich im alkalischen Milieu violett anfärben und damit kolorimetrisch messbar sind. Als Standardkurve wurden Lösungen von 0 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg, 0,8 mg, 1,6 mg, 2,4 mg und 3,2 mg BSA / ml in Wasser hergestellt. 50 μl der BSA-Standardreihe bzw. Proben (20 – 50 μl) wurden in 1 ml Wasser verdünnt und mit 100 μl 0,15 % (w/v) Desoxycholatsäure 10 min stark geschüttelt. Nach Zugabe von 100 μl 72 % (w/v) TCA wurden die Proben weitere 15 min stark geschüttelt und das gefällte Protein anschließend abzentrifugiert (3 000 x g, RT, 10 min). Der Überstand wurde vorsichtig vom Proteinniederschlag abgenommen. Der Lösung des Niederschlags erfolgte durch Zugabe von 300 μl Wasser, 300 μl Lösung E und durch 10 min langes starkes Schütteln. Dann wurden 150 μl 25 % (v/v) Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck) hinzugefügt und die Proben für weitere 30 – 45 min stark geschüttelt. Von jeder Probe wurden 2 Mal jeweils 250 μl in eine 96-Well-Platte pipettiert und anschließend konnte die Extinktion im SpektraMax 340 (Molecular Devices) bei 745 nm gemessen werden. Für die Auswertung wurde das Programm „Micro-Lowry“ der „Softmax“-Software verwendet.

3.3.7 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Vorbereitung der Gele. Das 10%ige Trenngel wurde wie folgt hergestellt: 2 ml 30 % Acrilamid/0,8 % Bisacrilamid, 1,875 ml Trenngelpuffer, bis 7,5 ml Wasser, 7,5 μl TEMED, 70 μl APS. Dieses 10%ige Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und nach 30minütiger Polymerisation mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet: 375 μl 30 % Acrilamid/0,8 % Bisacrilamid, 750 μl Sammelgelpuffer, bis 3 ml Wasser, 4 μl TEMED, 30 μl APS. Nach weiteren 30 min konnte das Gel für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt werden.

Vorbereitung der Proben. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Zugabe von Rotiload Puffer mit anschließender 10minütiger Inkubation der Proben bei 95°C. Nach der Denaturierung wurden die Proben mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und bis zum Auftragen auf das Gel bei –20°C aufbewahrt.

Elektrophorese-Laufbedingungen. Die Elektrophorese wurde in Elektrophoresepuffer mit 15 mA pro Gel und maximal 200 V ca. 2-3 Std.

durchgeführt.

3.3.8 Western Blot

Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran, die 20 min im Transferpuffer vorinkubiert wurde, gelegt. Das "Blot-Sandwich" wurde auf der unteren Graphit-Bloteinheit folgendermaßen aufgebaut:

- 1 Lage in Transferpuffer getränkt Filterpapier
- Nitrozellulosemembran getränktes in Transferpuffer
- Trenngel
- 1 Lage in Transferpuffer getränktes Filterpapier

Danach wurde die obere Graphit-Bloteinheit unter Druck aufgebracht und die Blotkammer geschlossen. Die durch gebundenes SDS negativ geladenen Proteine wurden mit 60 mA für 70 min auf die Membran geblottet.

Die angelegte Stromstärke und die Dauer des Blottens ergaben sich aus der Effizienz der Proteinübertragung, die anhand von Coomassie Färbung des geblotteten Gels bzw. Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran beurteilt wurde.

3.3.9 Ponceau-S-Färbung von Blots

Die nach dem Blotten auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine können mit Ponceau-S-Färbung reversibel gefärbt werden. Diese Färbung dient dazu die Proteine auf dem Blot zu markieren, um bei einer nachfolgenden antigenspezifischen Färbung eine Molekulargewichtsbestimmung zu ermöglichen. Des Weiteren lässt sich anhand der Ponceau-S-Färbung die Effizienz des Transfers beurteilen.

Dazu wurde die Nitrozellulosemembran direkt nach Beendigung des Blottens 1 min in Ponceau-S-Färbelösung gelegt und anschließend bis zur Klärung des Hintergrunds in sterilem bidestiliertem Wasser gewaschen. Die Markerproteine konnten dann markiert und der Blot bis zum Verschwinden der Färbung in TBST Puffer gewaschen werden.

3.3.10 Coomassie-Färbung von Gelen

Direkt im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele in einer 0,25%igen (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung in Methanol:Eisessig:Wasser (40:10:50, v/v) unter Schütteln für 2-4 Std. angefärbt und anschließend in Methanol:Eisessig:Wasser (25:5:70, v/v) bis zu völligen Farbfreiheit des Hintergrundes entfärbt. Der Farbstoff Coomassie Brillant Blue G-250 haftet dabei an den Proteinen und macht dadurch die nach ihrer Grösse getrennten Makromoleküle sichtbar.

3.3.11 Coomassie Kolloidal von Gelen

Direkt im Anschluss an die Elektrophorese folgte die Fixierung der Gele in einer Lösung (50 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Phosphorsäure im Wasser bidist.) für ca. 10-12 Std.. Danach wurden die Gele in bidistiliertem Wasser 3 x 30 min gewaschen und für 1 Std. in Inkubationlösung (34 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Phosphorsäure, 17 % (v/v) Ammoniumsulfat in bidistiliertem Wasser) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gele unter Schütteln in Coomassie Brillant Blue G-250 Lösung (34 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Phosphorsäure, 17 % (w/v) Ammoniumsulfat, 0,066 % (w/v) Coomassie G-250 in bidistiliertem Wasser) angefärbt. Die Färbung erreicht nach drei Tagen die maximale Empfindlichkeit.

3.3.12 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran mittels ECL

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 1 Std. in in Waschpuffer mit 3 % Milkpulver inkubiert. Danach wurde der primär-AK zugegeben und entweder für 2-3 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde 3 mal für 15 min in Waschpuffer gewaschen und der sekundär-AK in Waschpuffer mit 3 % Milkpulver zugegeben. Nach dem Waschen der Membran mit Waschpuffer wurden die ECL Detektionlösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt, auf die Membran zugegeben und 1 min inkubiert. Im Fall von ECL Advance wurden Detektionslösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt, auf die Membran zugegeben und ca. 3 min inkubiert.

Danach wurde die Lösung abgegossen, und die Lumineszenz konnte mit Hilfe von "Image Station Kodak" detektiert und ausgewertet werden.

3.3.13 Gewebe- und Organhomogenisierung

Die Organe wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Organe erfolgte bei -80°C . Alle Organe wurden anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert und das pulverisierte Gewebe bei -80°C aufbewahrt und für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Es wurde streng darauf geachtet, dass die Organe nicht auftauten.

Für Protein- und Western Blot Analysen wurden ca. 50 mg des gemörserten Gewebes verwendet. Das pulverisierte Gewebe wurde zuerst mit 4-10 Volumen Marletta Puffer in den Homogenisator Ultra Turrax überführt und bei 4°C kurz homogenisiert. Direkt im Anschluss wurden die Proben mit 4x Rotiload versetzt und 10 min bei 95°C aufgekocht. Nach Abkühlung wurden die nicht löslichen Gewebereste abzentrifugiert (2-3 min / 14 000 rpm) und die Überstände zur Analyse verwendet. Die Proteinkonzentration wurde nach Mikro-Lowry bestimmt. Die Untersuchung des sGC-Proteinlevels fand mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot statt.

3.3.14 Organbad

Mäuse wurden mit CO_2 betäubt, die Thoracalaorten präpariert und übertragen in Krebs-Hanseleit-Puffer mit 2% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin. In diesem Medium wurden die Aorten mit 500 μM 3-Morpholinonydonimin (SIN-1) für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Montage in ein Organbad. Die Aorten wurden für 90 min vorinkubiert, bevor sie mit 120 mM Kaliumchlorid (KCl) kontrahiert wurden. Gefäße, die auf die Stimulation mit KCl geantwortet haben, wurden in weiteren Versuchen benutzt. Zuerst wurde die Kontraktilität in Antwort auf Phenylephrin gemessen und die Halb-maximal-wirkende Konzentration bestimmt. Im Versuch wurden Gefäße mit dieser Konzentration Phenylephrin präkontrahiert und die Relaxation als Antwort auf BAY58-2667, Spermin/NONOate oder Acetylcholin wurde gemessen. Die Präparation von

Gefässen und die Versuche im Organbad wurden von Ashraf Taye in unserem Labor durchgeführt.

3.3.15 MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

Die massenspektroskopische Methode beruht auf der analytische Auftrennung von einzelnen geladenen Molekülen durch elektrische und magnetische Felder im Vakuum. Bei MALDI wird die in einer Matrix eingebettete Probe durch einen Laserblitz verdampft und die entstehenden Ionen massenspektrometrisch analysiert. Identifizierung von p160 wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Albert Sickmann (Rudolf-Virchow-Zenter, Würzburg) durchgeführt.

3.3.16 Statistische Auswertungen

Der Student t-Test wurde verwendet, wenn lediglich zwei Gruppen auf signifikante Unterschiede in ihren Mittelwerten untersucht wurden. Für eine multivariante Untersuchung mehrerer Gruppen erfolgte eine Analyse mittels eines einseitigen ANOVA-Test einschließlich eines Newman-Keuls-Nachfolgetests. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 3.0 Software durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des Wirkungsmechanismus von BAY58-2667 auf sGC

4.1.1. Konkurrente Wirkung von BAY58-2667 und Porphyrinen auf sGC

Da es noch nicht bekannt war, ob BAY58-2667 ausschließlich Häm-freie (bzw. oxidierte) sGC stimuliert, wurde der Wirkungsmechanismus dieser Substanz auf sGC näher untersucht. Dazu wurden die Wirkungen von PPIX und verschiedenen anderen Metalloporphyrinen mit den Effekten von BAY58-2667 verglichen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Porphyrine in der Lage sind mit dem Häm um die Bindungsstelle in der sGC zu konkurrieren und auf diese Weise ihre Effekte auf die sGC-Aktivität ausüben (Ignarro et al., 1982; Ignarro et al., 1984).

Bei unseren Versuchen wurde gereinigte sGC aus Sf9-Zellen verwendet. Die Transfektion der Sf9-Zellen mit Baculoviren, die beide sGC-Untereinheiten kodieren, wurden wie in Kap.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Inkubation und Lyse der Zellen, fand eine Proteinaufreinigung der sGC durch GSH-Affinitätschromatographie (Kap.3.3.3) statt. Der Proteinnachweis in den Elutionsfraktionen fand mit Hilfe einer Coomassie Färbung (Kap.3.3.10) sowie der Immunfärbung mittels Western Blot (Kap.3.3.8 und 3.3.12) mit anti-sGC α_1 - und anti-sGC β_1 -spezifischen AK statt. Bestimmung der sGC-Aktivität und der cGMP-Assay wurden nach den beschriebenen Methoden (Kap.3.3.4 und 3.3.5) durchgeführt. Die Stimulation der sGC erfolgte mittels des NO-Donors 2-(N,N-diethylamino)-diazolot-2-oxide, Na (DEA/NO), PPIX oder BAY58-2667.

Als erstes wurde untersucht welche Wirkung PPIX und NO auf die Aktivität der gereinigten sGC haben.

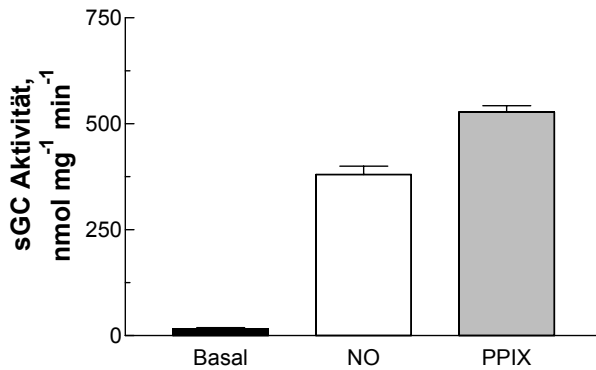


Abb.4.1. Stimulation der sGC durch PPIX und NO-Donor. Aktivität der rekombinanten hsGC wurde in Anwesenheit von 300 μ M DEA/NO (weiße Säule) oder 10 μ M PPIX (graue Säule) gemessen. Die basale Aktivität der sGC war $16,5 \pm 2,6 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (jedes durchgeführt in Triplikaten).

Wie in der Abb.4.1 zu sehen, führte eine Zugabe des NO-Donors DEA/NO (300 μ M) zu einer 23-fachen Erhöhung der sGC-Aktivität. In Gegenwart von PPIX (10 μ M) konnte eine 32-fache Zunahme der sGC-Aktivität gemessen werden.

PPIX ist ein weniger effektiver Aktivator der sGC als NO (Ignarro et al., 1984), wobei hauptsächlich Häm-freie sGC durch PPIX aktiviert wird. Die starke Stimulation der sGC durch PPIX in unseren Versuchen deutet darauf hin, dass ein großer Anteil der gereinigten sGC in der Häm-freien Form vorliegt. Reduzierte Häm-haltige sGC wurde durch die Aktivitätszunahme bei der Behandlung mit dem NO-Donor auch nachgewiesen.

BAY58-2667 bewirkte eine konzentrationsabhängige Stimulation der Aktivität in dieser sGC-Präparation. Maximale Aktivierung der sGC (bis zu 50-fach) wurde bei den BAY58-2667 Konzentrationen zwischen 100 nM und 1 μ M erreicht (Abb.4.2). In Anwesenheit von maximal aktivierender PPIX Konzentration (10 μ M) konnte BAY58-

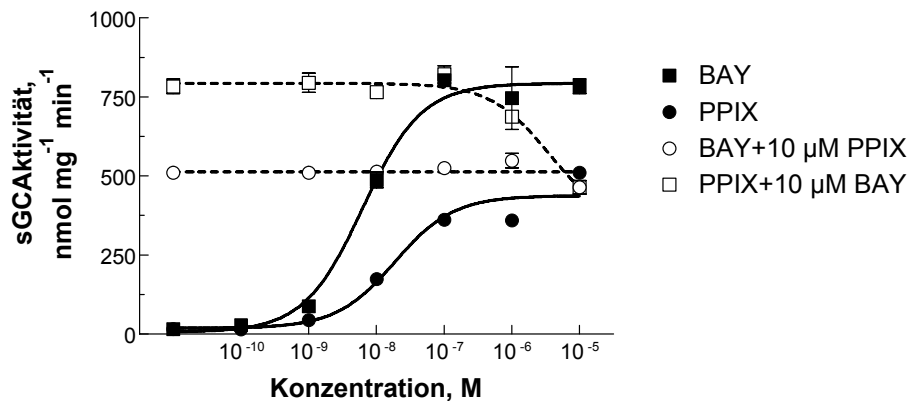


Abb.4.2. Kompetitiver Effekt von BAY58-2667 und PPIX auf sGC. Die Aktivität der rekombinanten hsGC wurde in Anwesenheit von 10 μM BAY58-2667 und verschiedenen Konzentrationen von PPIX, oder 10 μM PPIX und verschiedenen Konzentrationen von BAY58-2667 gemessen. Die basale Aktivität der sGC war $17 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (jedes durchgeführt in Triplikaten).

2667 aber keine zusätzliche Zunahme der sGC-Aktivität hervorrufen. Zusätzlich, führte die Zugabe steigender Konzentrationen von PPIX zu einer Abnahme der sGC-Aktivität in Gegenwart von 10 μM BAY58-2667. Diese Ergebnisse zeigen, dass BAY58-2667 und PPIX keinen additiven Effekt auf die sGC haben, sondern eher um die gleiche Enzympopulation konkurrieren.

Als nächstes wurde die Wirkung verschiedener Metalloporphyrine als Liganden für die Bindungsstelle des Häms auf die BAY58-2667-stimulierte sGC-Aktivität untersucht. Diese Versuche wurden in Rahmen eine Zusammenarbeit von der Gruppe von Dr. Stasch (Bayer AG) durchgeführt. Aus den Ergebnissen in Abb.4.3A ist zu erkennen, dass die BAY58-2667 stimulierte sGC-Aktivität durch Zugabe von FePPIX, ZnPPIX, MnPPIX komplett inhibiert wurde. Außerdem konnte die BAY58-2667-Bindung an sGC durch ZnPPIX komplett verhindert werden (Abb.4.3B; IC_{50} : $20,0 \pm$

1,3 nM). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass Protoporphyrine und BAY58-2667 auf die gleiche (Häm-freie) sGC Population wirken.

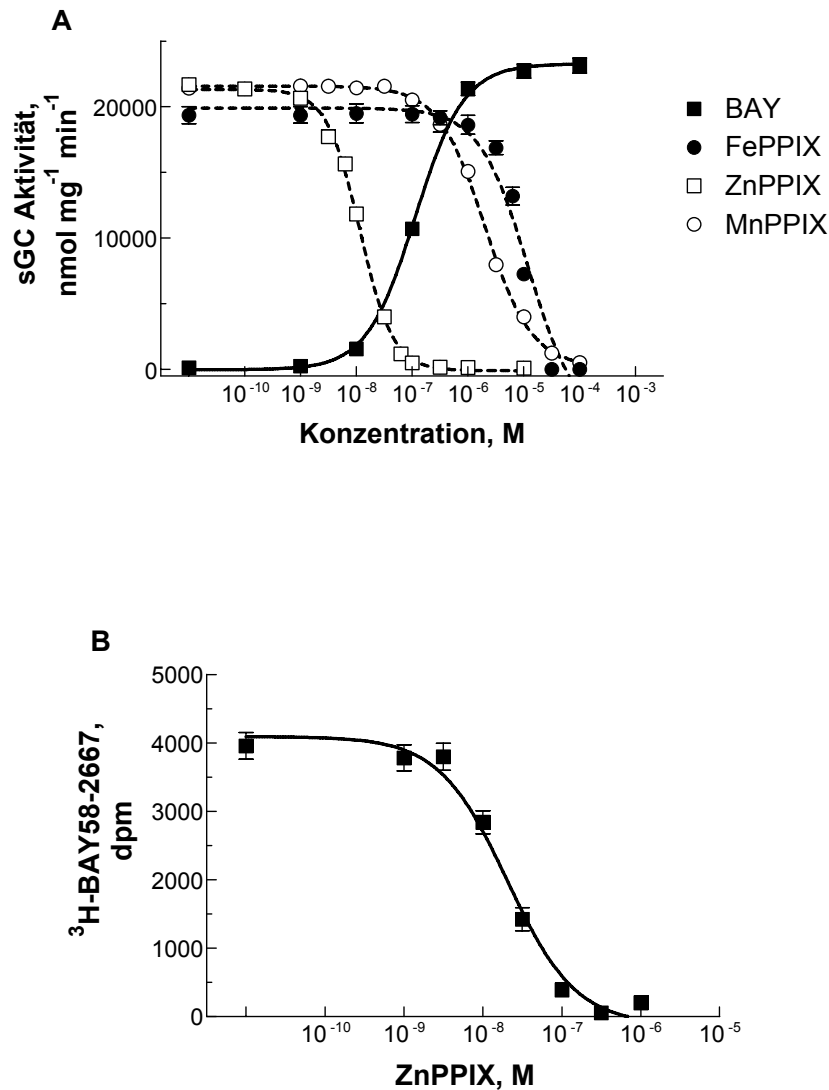


Abb.4.3. Kompetitiver Effekt von BAY58-2667 und verschiedene Porphyrine auf sGC. (A), ZnPPIX, Fe(II)PPIX und MnPPIX inhibieren komplett BAY58-2667-induzierte Aktivierung ($1 \mu\text{M}$) der rekombinanten Häm-freien sGC von Ratten. (B), ZnPPIX verdrängt $^3\text{H-BAY58-2667}$ ($100 \mu\text{M}$) komplett aus der rekombinanten Häm-freien sGC. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (jedes durchgeführt in Triplikaten).

4.1.2 Wirkung von BAY58-2667 auf cGMP-Synthese in intakten Zellen

Das Ziel dieser Untersuchungen war es zu klären, ob in intakten Zellen die Häm-freie sGC vorhanden ist, die durch BAY58-2667 aktiviert werden kann. Um das zu erreichen, wurde cGMP-Synthese in EZ in Anwesenheit und in Abwesenheit des Aktivators der sGC BAY58-2667 und/oder Inhibitoren der sGC gemessen.

Die Versuche wurden nach den beschriebenen Methode im Kap.3.3.1 durchgeführt. Die Bestimmung der sGC-Aktivität und der cGMP-Assay erfolgt wie im Kap.3.3.4 und 3.3.5 dargestellt. Zur Stimulierung der sGC wurden BAY58-2667 oder NO-Donor DEA/NO eingesetzt.

Als erstes wurde die sGC-Aktivität in EZ unter basalen Bedingungen in Anwesenheit von 10 μM BAY58-2667 oder 10 μM BAY58-2667 zusammen mit 20 μM ODQ untersucht. Die Behandlung der EZ mit 10 μM BAY58-2667 für 3 min führte zur einer Erhöhung des cGMP-Levels bis zu 3,4-fach (Abb.4.4). Interessanterweise wurde der cGMP-Spiegel durch zusätzliche Präinkubation mit 20 μM ODQ für 30 min sogar noch weiter gesteigert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit von BAY58-2667 die cGMP-Synthese in intakten Zellen zu stimulieren mit der Oxidation der sGC korreliert.

Wie unsere Ergebnisse (Kapitel 4.1.1) zeigen, verhindern Metalloporphyrine BAY58-2667-induzierte sGC-Aktivierung. Aus diesem Grund wurde ZnPPIX verwendet um zu zeigen, dass der BAY58-2667-induzierte cGMP-Anstieg in EZ durch Aktivierung der sGC vermittelt wird. EZ wurden 1 Std. mit ZnPPIX (10 μM) behandelt und danach die cGMP-Synthese durch 10 μM BAY58-2667, 300 μM DEA/NO oder eine Kombination von 10 μM BAY58-2667 und 20 μM ODQ stimuliert. Die Behandlung der EZ mit ZnPPIX führte zu einem Anstieg des basalen cGMP-Levels

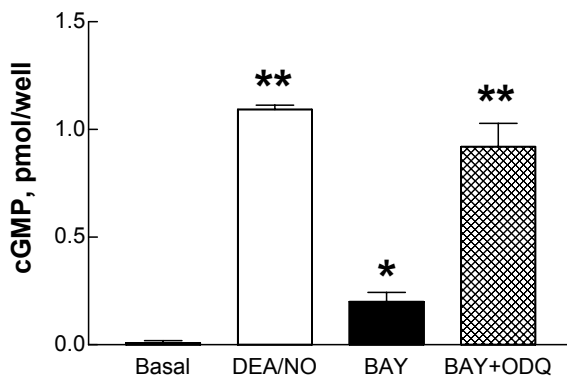


Abb.4.4. Effekt von ODQ auf BAY58-2667-induzierte cGMP-Level in EZ. EZ wurden unbehandelt gelassen (Basal), mit 250 μ l DEA/NO, 10 μ l BAY58-2667 (BAY) oder mit einer Kombination bestehend aus 20 μ l ODQ (30 min vor BAY58-2667) und BAY58-2667 (BAY+ODQ) stimuliert und der cGMP-Level wurde gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (jedes durchgeführt in Triplikaten). * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$ vs. unbehandelte Zellen (Basal). Der basale cGMP-Level war 0.10 ± 0.01 pmol/ 10^6 Zellen.

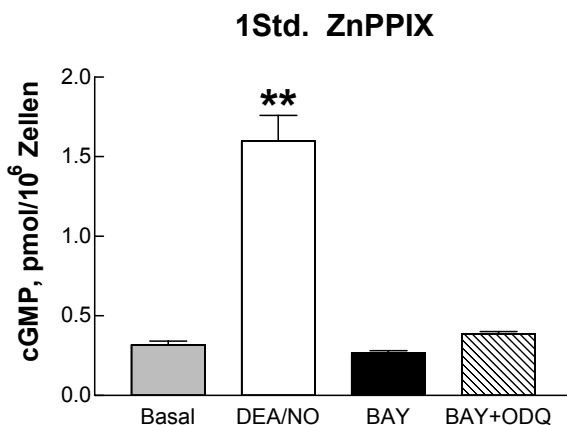


Abb.4.5. Wirkung von BAY58-2667 auf cGMP-Level in EZ in Anwesenheit von ZnPPIX. EZ wurden 1 Std. mit 10 μ l ZnPPIX vorinkubiert. Danach wurden sie unstimuliert gelassen (Basal) oder mit 250 μ l DEA/NO, 10 μ l BAY58-2667 (BAY) oder mit einer Kombination bestehend aus 20 μ l ODQ (30 min vor BAY58-2667) und BAY58-2667 (BAY+ODQ) für 3 min stimuliert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (jedes durchgeführt

in Triplikaten). **- $p < 0.01$ vs. nicht stimulierte Zellen (Basal). Der basale cGMP-Level war 0.32 ± 0.02 pmol/ 10^6 Zellen.

(Abb. 4.5.). Es ist aber wichtig, dass unter diesen Bedingungen weder BAY58-2667 alleine noch in Kombination mit ODQ zu einer weiteren Zunahme von cGMP führt. Der NO-induzierte Anstieg blieb unverändert in Vergleich zu den Zellen ohne Vorbehandlung mit ZnPPIX (Abb. 4.5.).

4.2 Wirkungen von Hämoxidanzien auf sGC-Proteinlevel.

Bislang wurde der Einfluss von Hämoxidanzien nur auf die Aktivität der sGC und nicht auf den sGC-Proteinlevel untersucht. In unseren Versuchen sollte die Rolle des Redox-Zustandes des sGC-Häms und der Besetzung der Häm-Bindungstasche auf den sGC-Proteinlevel untersucht werden.

4.2.1 Wirkung von ODQ auf den sGC-Proteinlevel

Zuerst wurde die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Wirkungen des sGC- Inhibitors ODQ auf den Proteinlevel in intakten Zellen untersucht.

Veränderungen des Proteinlevels von sGC α_1 und sGC β_1 wurden in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von ODQ (10 nM - 10 μ M) oder nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 Std. - 24 Std.) untersucht. Die Aufarbeitung der EZ erfolgte wie im Kap.3.3.1 beschrieben. Danach wurden die Zellen mit entsprechenden Konzentrationen von ODQ mit unterschiedlichen Zeiten inkubiert. Als Negativkontrolle wurden jeweils unbehandelte EZ verwendet. Nach entsprechender Inkubation konnten die Zellen geerntet werden. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Proben, die Proteinbestimmung nach Micro-Lowry (Kap.3.3.6) und das Beladen des SDS-PAGE-Gels (Kap.3.3.7). Zum Nachweis von sGC wurden anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet.

Abb.4.6 zeigt eine konzentrationsabhängige Abnahme des sGC-Proteinlevels in Gegenwart von ODQ. Die Proteinlevel von beiden Untereinheiten reduzierten sich bis auf 30-40 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb.4.6A). Die ODQ-induzierte Abnahme des sGC-Proteins erfolgte schnell und wurde bereits nach 4 Std.

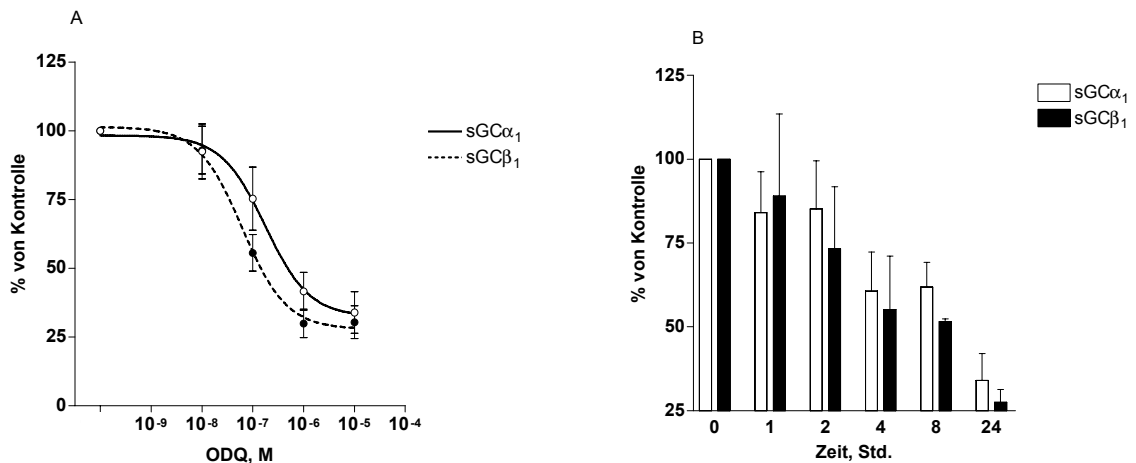


Abb.4.6 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Wirkung von ODQ auf sGC-Proteinlevel in intakten Zellen. (A) EZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ODQ 24 Std. inkubiert. (B) EZ wurden mit 10 μ M ODQ mit unterschiedlichen Zeiten inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3 verschiedenen Versuchen.

deutlich Abb.4.6B).

Um festzustellen, ob ODQ den sGC-Proteinlevel durch Veränderung der Genexpression oder Proteininstabilität beeinflusst, haben wir die Zeitabhängigkeit der ODQ Wirkung mit den Effekten von Proteinsynthesehemmern verglichen. Sowohl Cycloheximid (CHX) als auch Emetin konnten innerhalb von 8 Std. keine Veränderung des sGC-Levels in den EZ verursachen (Abb. 4.7). Eine weitere Behandlung der Zellen mit diesen Proteinsynthesehemmern war nicht möglich, da die beiden Substanzen eine starke Toxizität aufwiesen. Dass diese Substanzen in angewandten Konzentrationen die Proteinsynthese tatsächlich hemmen, wurde in der Literatur beschrieben (Sidhu and Omiecinski, 1998) und in unserem Labor mit Hilfe von Sf9-Zellen überprüft. Beide Substanzen verhinderten die Expression von

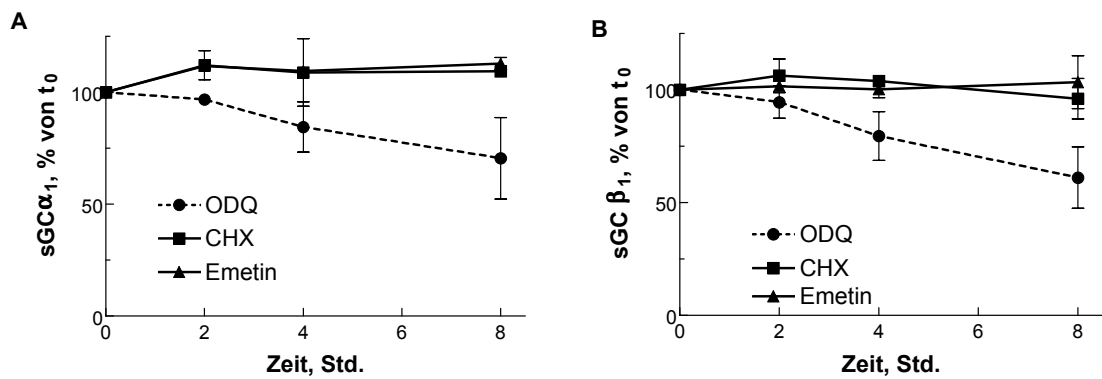


Abb. 4.7 Effekte von ODQ und Proteinsynthese-hemmer auf sGC-Protein. EZ wurden mit 10 μ M ODQ, 10 μ g/ml CHX oder 10 μ g/ml Emetin mit unterschiedlichen Zeiten inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und der Proteinlevel von sGC α_1 (A) oder sGC β_1 (B) mittels Western Blot bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3 verschiedenen Versuchen.

rekombinantem sGC-Protein in diesem System (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten demonstrieren, dass die schnelle ODQ-induzierte sGC-Proteinabnahme durch eine verminderte sGC-Proteinstabilität und erhöhten Proteinabbau vermittelt werden muss.

4.2.2 Wirkung von BAY58-2667 und ZnPPIX auf sGC-Proteinlevel

Es wurde bereits in mehreren Studien beschrieben, dass sGC-aktivierende Substanzen (NO-Donoren und YC-1) auch einen Effekt auf den sGC-Proteinlevel haben (Filippov et al., 1997). Die Wirkung von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel ist bis jetzt noch unbekannt. Ebenfalls unklar ist, welchen Effekt Metalloporphyrine auf den sGC-Proteinlevel haben.

Um zu untersuchen, welchen Effekt BAY58-2667 und ZnPPIX auf den sGC-Proteinlevel haben, wurden EZ mit steigenden Konzentrationen von BAY58-2667 (für 24 Std.) oder von ZnPPIX (für 48 Std.) inkubiert. Die Versuche wurden wie im Kap.3.3.1 beschrieben durchgeführt. Nach entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen geerntet. Anschließend erfolgte die Aufbearbeitung der Proben, die Proteinbestimmung nach Micro-Lowry (Kap.3.3.6) und ein SDS-PAGE (Kap.3.3.7). Zum Nachweis der sGC wurden anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet.

Unerwartet führte die Anwesenheit von BAY58-2667 zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung des Proteinlevels von sGC β_1 , während der Level von sGC α_1 unverändert blieb (Abb.4.8). Um zu klären, ob andere Substanzen die die sGC-Bindungstasche besetzen, auch solche Wirkung auf sGC haben, wurde

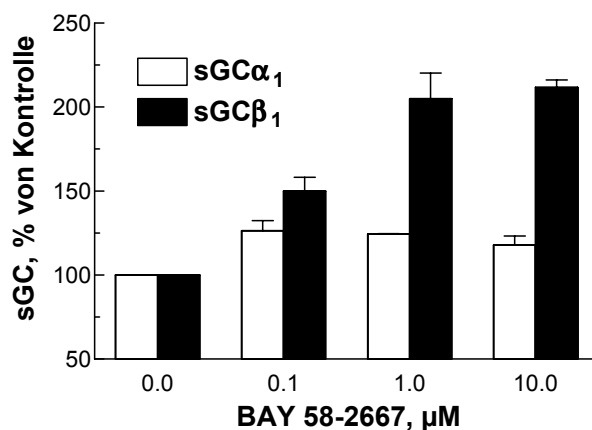


Abb.4.8 Effekt von BAY 58-2667 auf den sGC-Proteinlevel in EZ. EZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von BAY58-2667 24 Std. inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Die Daten wurden als Prozent von der Kontrolle (Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten) dargestellt.

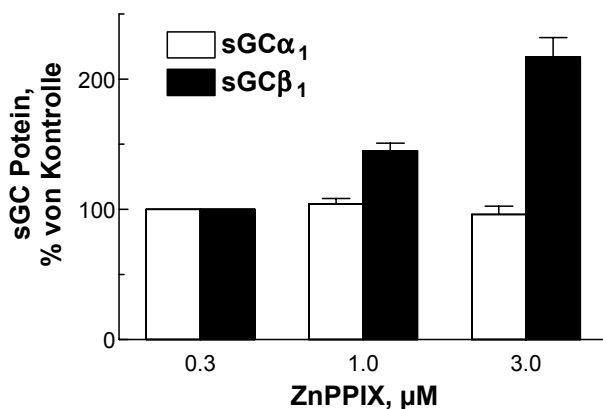


Abb.4.9 Effekt von ZnPPIX auf sGC-Proteinlevel in EZ. EZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ZnPPIX 48 Std. inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Die Daten sind als Prozent von Kontrolle (Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, jedes durchgeführt in Triplikaten) dargestellt.

der Effekt von ZnPPIX auf den sGC-Proteinlevel untersucht. Hierbei ergab sich ein ähnliches Verhalten wie es für BAY58-2667 zu beobachten war. In Gegenwart von steigenden ZnPPIX-Konzentrationen konnte ein signifikanter Anstieg des Proteinlevels von sGC β_1 aber nicht von sGC α_1 ermittelt werden (Abb.4.9).

4.2.3 Wirkung von BAY58-2667 und ZnPPIX auf den sGC-Proteinlevel in Anwesenheit von Oxidanzien.

ODQ vermittelt seine inhibitorische Wirkung auf die sGC durch Oxidation des Hämeisens (Schrammel et al., 1996). Unsere Vermutung war, dass oxidiertes Häm schwächer an sGC gebunden ist und ein Verlust des Häm eine destabilisierende Wirkung auf sGC haben könnte, die möglicherweise durch Substitution der Hämgruppe durch BAY58-2667 rückgängig gemacht werden kann. Um dass zu prüfen, wurden EZ mit ODQ und BAY58-2667 behandelt und der sGC-Proteinlevel bestimmt.

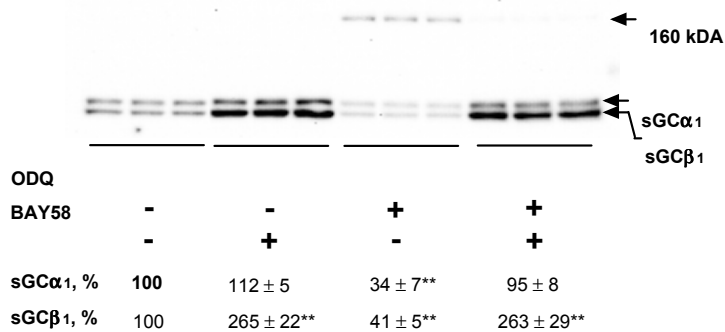


Abb.4.10 Effekt von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel in Anwesenheit von ODQ. EZ wurden mit 10 μ M ODQ, 10 μ M BAY58-2667 oder mit einer Kombination von beiden Substanzen 24 Std. inkubiert. Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mittels der Micro-Lowry Methode (Kap.3.3.6).

Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Die Daten wurden als Prozent von Kontrolle (Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, jedes durchgeführt in Triplikaten) dargestellt. *- $p < 0.05$ und **- $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

Wie bereits gezeigt wurde (Abb.4.6), führte eine 24-stündige Inkubation der EZ mit 10 μ M ODQ zu einer starken Verringerung der sGC α_1 - und sGC β_1 -Proteinlevel im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollwerten. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt

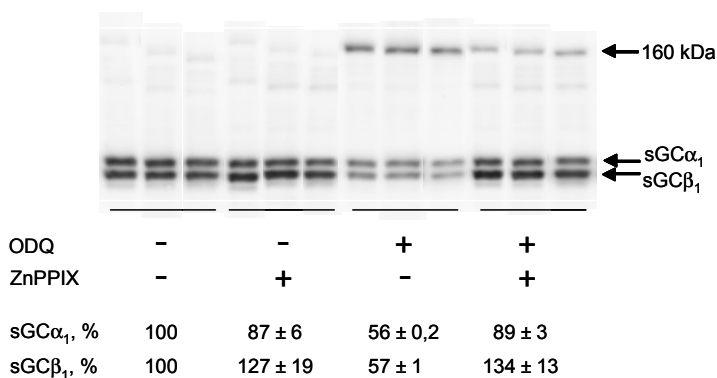
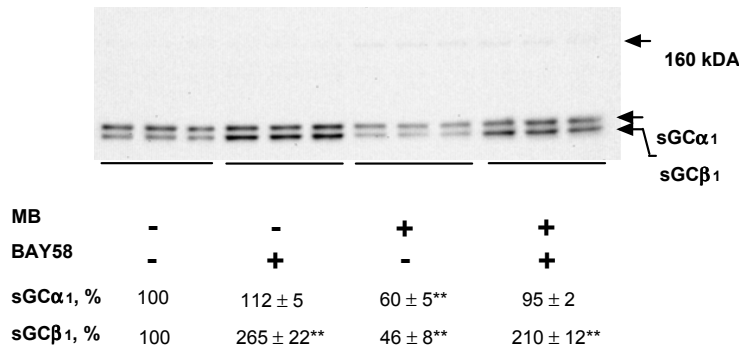


Abb.4.11 Effekt von ZnPIX auf den sGC-Proteinlevel in Anwesenheit von ODQ. EZ wurden mit 10 μ M ODQ, 3 μ M ZnPIX oder mit einer Kombination von beiden Substanzen 48 Std. inkubiert. Die Proteinbestimmung in Proben erfolgte mittels der Micro-Lowry Methode (Kap.3.3.6). Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Die Daten wurden als Prozent von

Kontrolle (Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten) dargestellt. *- $p < 0.05$ und **- $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

Abb.4.12 Effekt von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel in EZ in Anwesenheit von Methylenblau. Die EZ wurden mit 10 μ M MB, 10 μ M BAY58-2667 oder mit einer Kombination von beiden Substanzen 24 Std. inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Die Daten wurden als Prozent von Kontrolle (Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten) dargestellt. *-p<0.05 und **-p<0.01 vs. Kontrolle.



von ODQ in Gegenwart von BAY58-2667 (10 μ M) komplett aufheben (Abb.4.10). Nicht nur BAY58-2667, sondern auch ZnPPIX konnte den Effekt von ODQ rückgängig machen (Abb.4.11).

Als nächstes wurde die Wirkung von MB, einem weiterer Hämoxidant und sGC-Hemmer (Mayer et al., 1993; Luo et al., 1995), auf densGC-Proteinlevel untersucht. Hierbei ergab sich ein ähnliches Verhalten, wie es für ODQ zu beobachten war. In Gegenwart von 10 μ M MB konnte eine signifikante Abnahme des Proteinlevels von sGC α ₁ und sGC β ₁ beobachtet werden, die in Gegenwart von 10 μ M BAY58-2667 komplett aufgehoben wurde (Abb.4.12).

4.3 Charakterisierung des p160

4.3.1 ODQ, Hämoxidant und Inhibitor der sGC, induziert die Bildung eines hochmolekularen sGC-immunreaktiven Proteins (p160) in EZ

Durch Behandlung der EZ mit ODQ wurde ein sGC-immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 160 kDa (p160) induziert (Abb.4.13). Das Ziel folgender

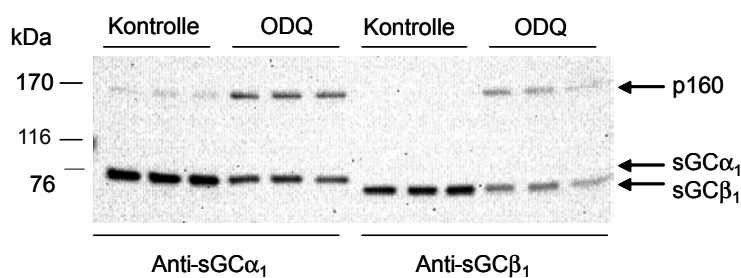


Abb.4.13. Bildung eines sGC α_1/β_1 -immunreaktiven Proteins mit einem molekularen Gewicht von 160 kDa in EZ nach Behandlung mit ODQ. EZ wurden mit 10 μ M ODQ 24 Std. inkubiert. Als Negativkontrolle wurden EZ ohne ODQ-Behandlung benutzt. Der Nachweis der

Proteine erfolgte mit der Hilfe des Western Blots, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden. In ODQ-behandelten Zellen erkannten die beiden AK immunreaktives p160.

Untersuchungen war dieses Protein zu charakterisieren. Die Aufarbeitung der EZ erfolgte wie im Kap.3.3.1 beschrieben. Danach wurden die Zellen mit 10 μ M ODQ für 24 Std. inkubiert. Die zugefügte Menge von ODQ reichte aus, um eine Induktion des p160 zu ermöglichen. Als Negativkontrolle wurden jeweils EZ ohne ODQ-Behandlung verwendet. Nach entsprechender Inkubation konnten die Zellen geerntet werden. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Proben und das Beladen des SDS-PAGE-Gels. Zum Nachweis von p160 wurden anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet (Abb.4.13).

Es wurden der Zeitablauf und die Konzentrationsabhängigkeit der ODQ-stimulierten Induktion untersucht. Die ODQ-induzierte Bildung von p160 war

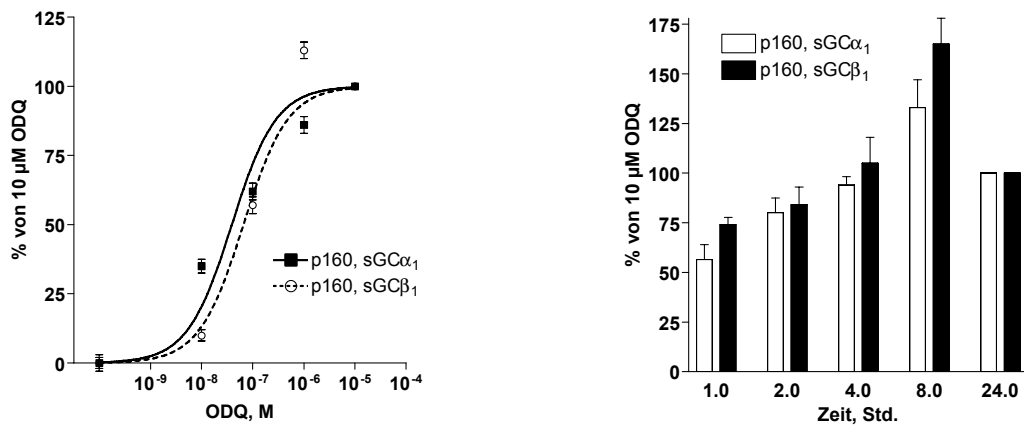


Abb.4.14 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Bildung von p160 in EZ nach Behandlung mit ODQ. (A) EZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ODQ 24 Std. inkubiert. (B) EZ wurden mit 10 µM ODQ mit unterschiedlichen Zeiten inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3 verschiedenen Versuchen.

konzentrationsabhängig mit halbmaximal wirkender Konzentration zwischen 40 und 80 nM (Abb.4.14A). p160 war bereits nach 1 Std. der Behandlung zu detektieren (Abb.4.14B). Ein maximaler p160-Level wurde nach 8 Std. beobachtet.

4.3.2 ODQ-induziertes Protein (p160) in Sf9-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bildung des ODQ-induzierten p160 in Zellen, die rekombinante hsGC exprimieren, stattfindet. Um das zu überprüfen, wurden Sf9-Zellen mit den sGC α_1 - und sGC β_1 -kodierenden Baculoviren infiziert (Zabel et al., 1999; Kap.3.3.2).

Zunächst wurde festgestellt unter welchen experimentellen Bedingungen p160 in Sf9/Baculovirus-System induziert wird. Behandlung mit 10 µM ODQ (wie bei EZ) induzierte keine bemerkenswerte Bildung von p160, das gewünschte Ergebnis wurde

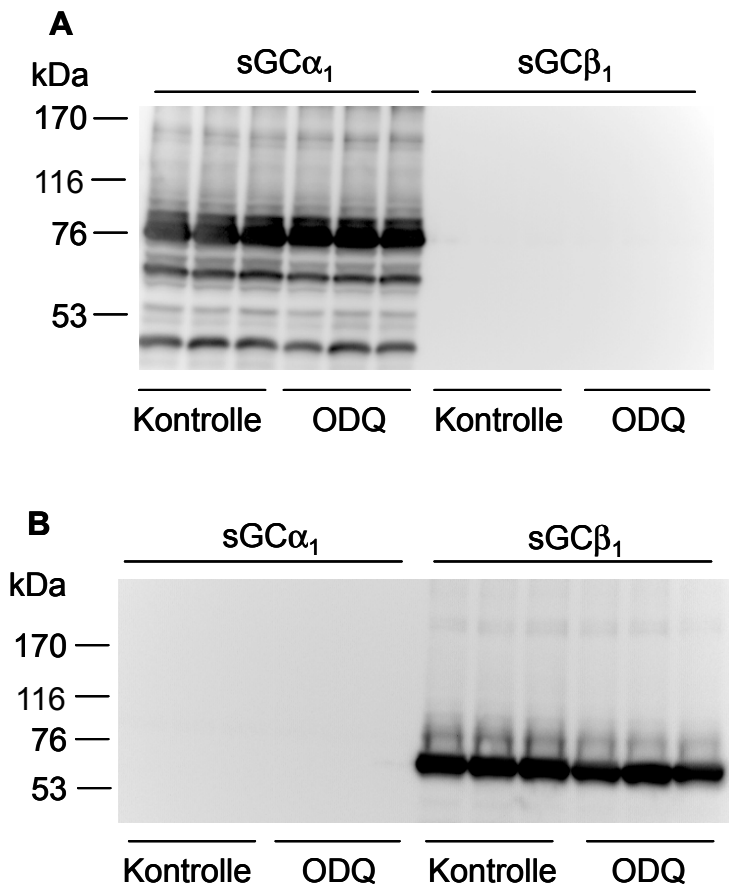
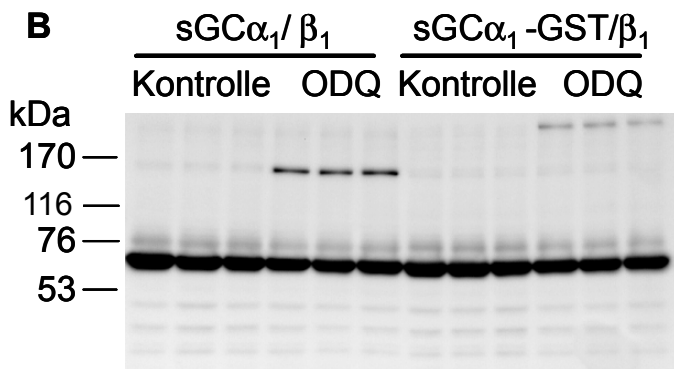
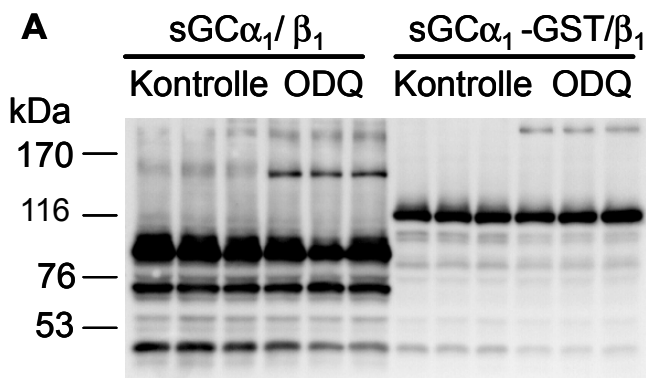


Abb.4.15 ODQ-induzierte Bildung des p160 in Sf9-Zellen, die sGC α_1 (oder GST-sGC α_1)- und sGC β_1 -Untereinheiten exprimieren. Sf9-Zellen wurden mit den sGC α_1 (oder mit getaggten-GST-sGC α_1) und sGC β_1 kodierenden Baculoviren transfiziert und 48 Std. inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 100 μ M ODQ 24 Std. behandelt. Zum Nachweis der Proteine wurden anti-sGC α_1 (A) und anti-sGC β_1 (B) spezifische AK verwendet. In ODQ-behandelten Zellen erkannten die beiden AK immunreaktives p160. Gezeigt sind repräsentative Blots (n=3).

Abb.4.16 Keine Bildung von p160 in Sf9-Zellen, die einzelne sGC-Untereinheiten exprimieren. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die sGC α_1 oder sGC β_1 , kodieren, transfiziert und 48 Std. inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 100 μ M ODQ 24 Std. behandelt. Zum Nachweis der Proteine wurden anti-sGC α_1 (A) und anti-sGC β_1 (B) spezifische AK verwendet. Gezeigt sind repräsentative Blots (n=3).

aber mit 10-fach höherer Konzentration von ODQ (100 μ M) erreicht (Abb.4.15). Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Sf9-Zellen verwendet. Und genauso wie in EZ wurde dieses Protein sowohl mit anti-sGC α_1 AK als auch mit anti-sGC β_1 AK detektiert (Abb.4.15).

Immunologische Daten deuten darauf hin, dass p160 ein SDS-resistentes Heterodimer von sGC α_1 und sGC β_1 ist. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Bildung des p160 die Anwesenheit von beiden sGC-Untereinheiten benötigt. Dazu wurden einzelne Untereinheiten sGC α_1 oder sGC β_1 in Sf9-Zellen exprimiert. Nach 48 Std. wurde 100 μ M ODQ zugegeben und die Zellen weitere 24 Std. inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufbearbeitung der Proben und das Beladen des SDS-PAGE-Gels. Zum Nachweis von p160 wurden anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet. Wie es zu erwarten war, zeigte sich keine Bande bei 160 kDa in den Sf9-Zellen, die die einzelnen sGC-Untereinheiten exprimieren, wobei sGC α_1 - oder sGC β_1 -Proteine deutlich zu sehen waren (Abb.4.16).

4.3.3 Aufreinigung des p160 aus Sf9-Zellen mittels Affinitätschromatographie

Da es von Bedeutung war, dieses Protein näher zu charakterisieren, wurde es aufgereinigt. Um die Aufreinigung des p160 durchzuführen, wurden rekombinante sGC α_1 mit dem GST-Tag (GST-sGC α_1) und sGC β_1 in Sf9-Zellen koexprimiert. Die Bildung von p160 wurde durch die Zugabe von 100 μ M ODQ induziert. Die Anwesenheit des Tags am N-Terminus von sGC α_1 verhinderte die Induktion von p160 nicht (Abb.4.15).

Nach der Induktion des p160 und anschließender Zellyse, fand eine Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie (Kap.3.3.3) statt, die durch die Bindung des p160 mit dem GST-Tag an GSH-Sepharose erfolgte. Nach dem Waschen wurde p160 mit GSH eluiert. Der Proteinnachweis im Durchlauf, Waschfraktionen und Elutionsfraktionen fand mit Hilfe einer Coomassie Färbung und Immunfärbung statt.

Aus den Ergebnissen in Abb.4.17 ist zu erkennen, dass das Elutionsprofil von

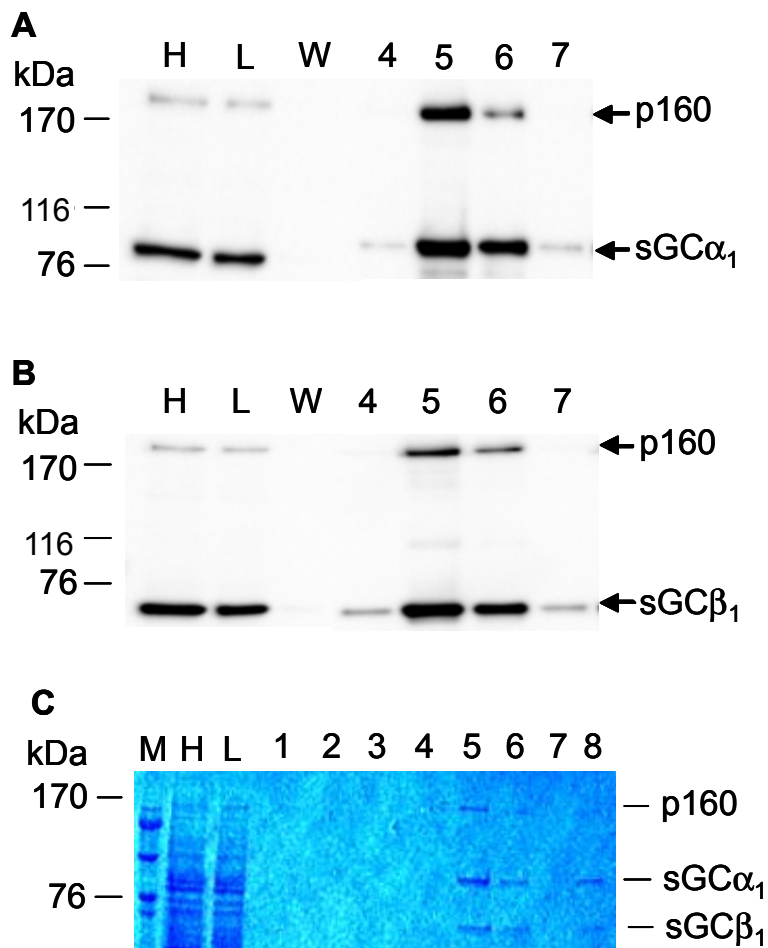


Abb.4.17 Aufreinigung des p160 aus Sf9/Baculovirus System mittels Affinitätschromatographie.

Sf9-Zellen wurden mit GST-sGC α_1 und sGC β_1 -kodierenden Baculoviren transfiziert und 48 Std. inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 100 μ M ODQ 24 Std. inkubiert und anschließend lysiert. Die Aufreinigung des p160 und der sGC erfolgte mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. Der Proteinnachweis in den Proben fand mit Hilfe des Western Blots mit anti-sGC α_1 (A) und anti-sGC β_1 (B) spezifischen AK oder einer Coomassie Färbung statt (C). H – Homogenat (Lysat) von Sf9-Zellen, L - Load, W – Waschfraktion, 4-7 – Elutionfraktionen 4 bis 7.

p160 sehr ähnlich dem von sGC ist. Banden bei ca. 190 kDa, 110 kDa und 70 kDa, welche GST-p160, GST-sGC α_1 und sGC β_1 entsprechen, zeigen sich in Elutionsfraktionen 5 und 6 sowohl in der Coomassie Färbung (Abb.4.17C) als auch im Western Blot (Abb.4.17A und B). In der Coomassie Färbung wurden keine anderen Banden außer p160, sGC α_1 und sGC β_1 sichtbar, was für eine saubere Aufreinigung der GST-getagten Proteine spricht.

Die Identifizierung des p160 wurde mittels MALDI-TOF (Kap.3.3.15) in Zusammenarbeit mit Dr. Albert Sickmann (Rudolf-Virchow-Center, Würzburg) durchgeführt. Proteine aus der Elutionsfraktion 5 wurden auf einem 10% SDS-PAGE-Gel getrennt und dann mit Kolloidall Coomassie (Kap.3.3.11) gefärbt. Die Banden von sGC α_1 und sGC β_1 (als Positivkontrollen) und p160 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zur Identifizierung eingeschickt. Die Ergebnisse der Identifizierung bestätigten, dass p160 aus sGC α_1 und sGC β_1 Untereinheiten besteht und keine anderen Proteine in diesen Komplex integriert sind (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Effekt harter denaturierender Bedingungen auf p160

Da die oxidativen Modifikation von Proteinen zu kovalenten Bindungen zwischen Aminosäurenresten führen können, wurde untersucht, ob p160 ein kovalent gebundener Komplex von sGC-Untereinheiten ist. Hierfür wurde die Stabilität des aus Sf9-Zellen gereinigten p160 Proteins unter harten denaturierenden Bedingungen untersucht. Dazu wurden p160-haltige Elutionsfraktionen mit dem chaotropischen Reagenz Guanidinisothiocyanat (GnSCN) behandelt.

Die Behandlung mit GnSCN erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden

Proben mit 6 M GnSCN 2 Std. bei 37°C inkubiert. Um die SDS-PAGE-Gel Analyse zu ermöglichen, war es notwendig GnSCN aus der Lösung zu entfernen. Hierbei erfolgte eine Dialyse gegen Marletta Puffer (zusätzlich mit 2% SDS) für 30 Std. bei 55°C. Anschließend wurden die Proben gesammelt und im Rotiload Puffer aufgeköcht (10 min bei 95°C). Zum Proteinnachweis wurden Proben auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend im Western Blot mit anti-sGC α_1 und

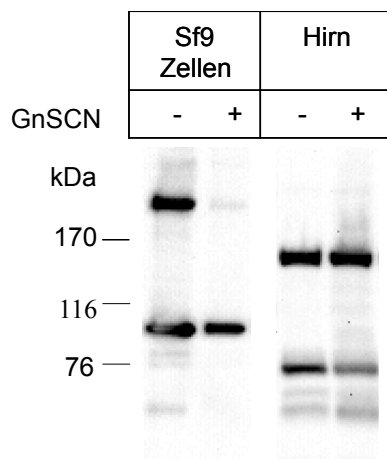


Abb.4.18 Wirkung GnSCN auf ODQ-induziertes p160. Aus Sf9-Zellen gereinigtes p160 und Homogenat von Schweinehirn wurden ohne (-) oder mit (+) 6 M GnSCN 2 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben gegen Puffer mit 2 % SDS 30 Std. bei 55°C dialysiert. Die Proteine wurden mit Hilfe anti-sGC α_1 spezifischer AK im Western Blot detektiert.

anti-sGC β_1 spezifischen AK detektiert. Als Negativkontrolle wurden die Proben ohne Inkubation mit GnSCN verwendet. Als eine zusätzliche Kontrolle wurde ein Homogenat vom Schweinehirn genommen, in dem ein endogenes sGC α_1 -immunreaktives Protein mit dem Molekulargewicht von 160 kDa vorkommt.

Die GnSCN-Behandlung führte zu einer deutlichen Abnahme des rekombinanten ODQ-induzierten p160 (Abb.4.18). Interessanterweise kam es dabei aber zu keinem Anstieg der sGC α_1 -Immunreaktivität. Die Stabilität des endogenen p160 aus Schweinehirn schien durch GnSCN-Behandlung nicht beeinflusst zu sein (Abb.4.18).

4.3.5 Rolle der prosthetischen Hämgruppe in der Induktion von p160

Da ODQ ein Hämoxidant ist und Oxidation des Häms sein primärer Effekt auf sGC darstellt, wurde die Rolle von Häm in der Bildung des p160 untersucht.

Das Ziel dieser Untersuchungen war es zu klären, ob p160 durch eine Behandlung der Häm-freien sGC mit ODQ auch in Abwesenheit von Häm induziert werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde eine sGC-Mutante verwendet, die kein Häm bindet (Wedel et al., 1994).

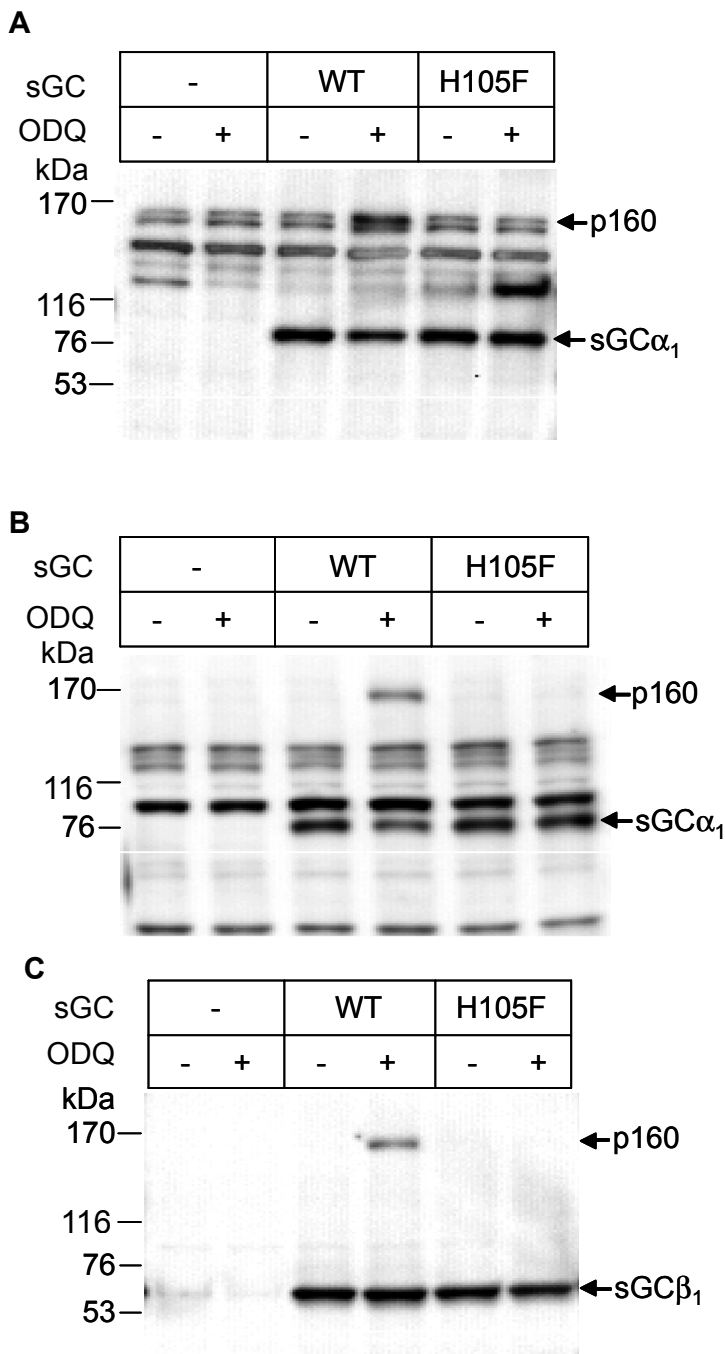


Abb.4.19 ODQ-induzierte Bildung des 160 in CHO-Zellen. Nicht transfizierte CHO-Zellen (-) und Zellen, die mit wildtypischer sGC α_1 und sGC β_1 (WT) oder mit wildtypischer sGC α_1 und sGC β_1 -H105F (H105F) transient kotransfiziert wurden, wurden ohne (-) oder mit 10 μ M ODQ 24 Std. inkubiert. Zum Nachweis der Proteine wurden spezifische AK verwendet: anti-sGC α_1 (Zabel et al., 1998) (A), kommerzieller anti-sGC α_1 von Sigma (B) und anti-sGC β_1 (Zabel et al., 1998) (C)

Wildtypische (WT) und His105-mutierte (H105F) sGC wurden in Eierstockzellen von chinesischem Hamster (CHO-Zellen) exprimiert (von Dr. Peter Schmidt durchgeführt). Für die Induktion des p160 wurden CHO-Zellen mit 10 μ M ODQ 24 Std. inkubiert. Der Proteinnachweis fand mit Hilfe der Immunfärbung mit anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifischen AK statt.

Wie in der Abb.4.19 zu sehen ist, wurden keine sGC-Untereinheiten in nativen CHO-Zellen exprimiert. Interessanterweise detektierte unser selbst gemachter anti-sGC α_1 AK mehrere Banden, vor allem im Bereich zwischen 120 und 170 kDa (Abb.4.19A), was eine Komplikation beim Detektieren von p160 darstellte. Um dies zu vermeiden, wurde ein kommerzieller anti-sGC α_1 AK (Sigma) verwendet (Abb.4.19B). Der AK detektierte einige Banden zwischen ca. 100 und 130 kDa aber keine in Bereich von p160. Alle diese Banden sind höchstwahrscheinlich unspezifisch detektierte Proteine.

In Zellen, die entweder wildtypische oder mutierte sGC exprimieren, wurden ungefähr die gleiche Mengen an sGC-Protein detektiert. Aber während die ODQ-Behandlung der Zellen mit wildtypischer sGC zur Bildung von p160 führte, blieb dies in Zellen mit mutierter sGC aus (Abb.4.19).

4.3.6 Effekt des BAY58-2667, ein hämunabhängigen Aktivator der sGC, auf die Bildung des p160

Im Kapitel 4.2 wurde gezeigt, dass das Hämoxidant ODQ den Proteinlevel von sGC in EZ senkt und dieser Effekt von ODQ durch den sGC-Aktivator BAY58-2667 komplett aufgehoben wird (Abb. 4.10). In folgenden Versuchen wurde untersucht,

welchen Effekt der Häm-unabhängige Aktivator der sGC auf die ODQ-induzierte Bildung des p160 in EZ und Sf9-Zellen hat.

Die Aufarbeitung der EZ erfolgte wie im Kap.3.3.1 beschrieben. Danach wurden die Zellen mit 10 μM ODQ oder mit 10 μM BAY58-2667 oder mit beiden diesen

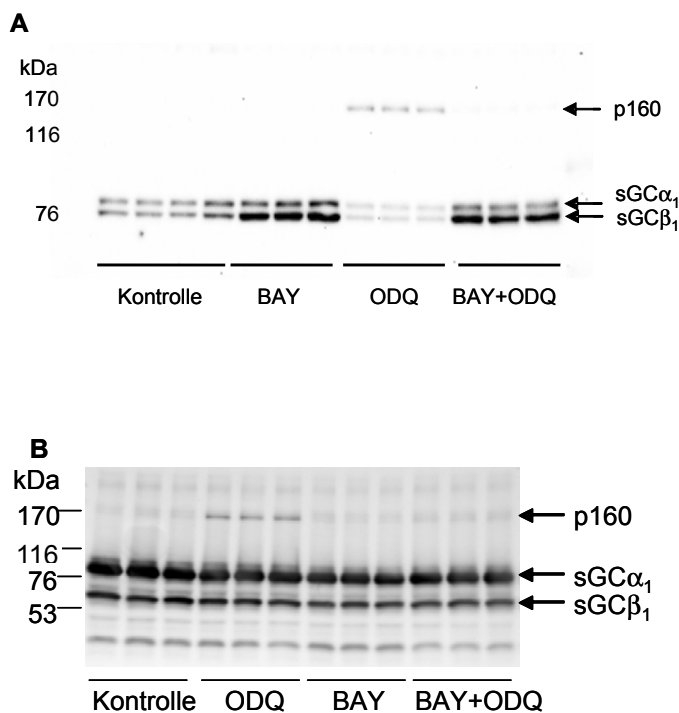


Abb.4.20 Effekt von BAY58-2667 auf ODQ-induzierte Bildung des p160 in EZ und Sf9-Zellen. (A) EZ wurden mit 10 μM ODQ oder mit 10 μM BAY58-2667 oder mit beiden Substanzen zusammen 24 Std. inkubiert. (B) Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die sGC α_1 und sGC β_1 kodieren, transfiziert und 48 Std. inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 100 μM ODQ oder mit 10 μM BAY58-2667 oder mit beiden Substanzen zusammen 24 Std. inkubiert. Zum Nachweis der Proteine wurden anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet.

Substanzen zusammen 24 Std. inkubiert. Als Negativkontrolle wurden jeweils EZ ohne ODQ- und BAY-Behandlung verwendet. Nach entsprechender Inkubation wurden die Zellen geerntet. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Proben und das Beladen des SDS-PAGE-Gels. Zum Nachweis von p160 wurden anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet.

Wie in Abb.4.20A dargestellt, konnte ODQ keine Bildung des p160 Proteins in EZ in Anwesenheit von BAY58-2667 induzieren. Dadurch wurde gezeigt, dass

BAY58-2667 nicht nur den sGC-Proteinlevel, der bei ODQ-Behandlung gesenkt wird, hoch steigert, sondern auch die Bildung des ODQ-induzierten p160 komplett verhindert.

Weiterhin wurde überprüft, ob BAY58-2667 auch eine Wirkung auf die Bildung des ODQ-induzierten p160 in Sf9-Zellen hat. Die Ergebnisse in Abb.4.20B zeigen, dass die ODQ-induzierte Bildung von p160 auch in Sf9-Zellen durch die Behandlung mit BAY58-2667 komplett blockierbar war. Es gab keinen Einfluss von ODQ und BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel in Sf9-Zellen.

4.4 BAY58-2667 als pharmakologisches Tool zur Korrektur von sGC-abhängigen Vasoparameter unter oxidativem Stress

4.4.1 Effekt von BAY58-2667 auf sGC-Aktivität und Proteinlevel in Anwesenheit von SIN-1 in EZ

Oxidation des sGC Häm resultiert aus einem Verlust der Stimulierbarkeit der sGC durch NO (Schrammel et al., 1996). Im Gegensatz dazu wird sGC unter diesen Bedingungen verstärkt durch BAY58-2667 aktiviert (Stasch et al., 2002). Es wäre interessant, ob sich das gleiche Szenarium unter pathologischen Bedingungen abspielen könnte. Da einerseits dem ONOO⁻ eine sehr wichtige Rolle bei zahlreichen Herzkreislauferkrankungen zugeschrieben wird und andererseits vermutet wird, dass ONOO⁻ das Häm der sGC oxidiert, wurden die Effekte von ONOO⁻ und BAY58-2667 auf sGC untersucht.

Die Zellen wurden mit SIN-1 (500 µM) für 24 Std. inkubiert. Als Negativkontrolle

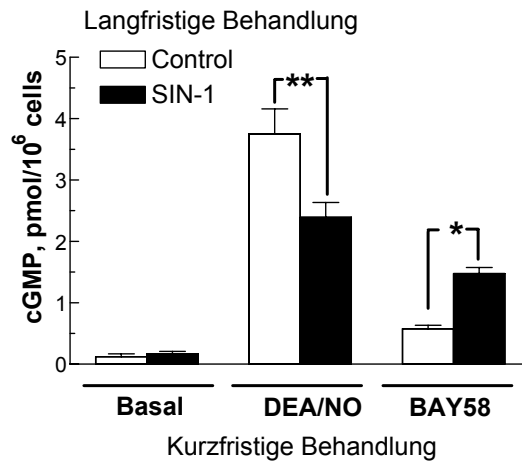


Abb.4.21 Effekt von SIN-1 auf BAY58-2667-induzierte cGMP-Akkumulation in EZ. Basale, 250 μ M DEA/NO- und 10 μ M BAY58-2667-stimulierte cGMP-Akkumulation wurde in unbehandelten EZ (weiße Säulen) oder in den mit 500 μ M SIN-1 behandelten Zellen, (schwarze Säulen)

gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (jedes durchgeführt in Triplikaten). *-p<0.05 und **-p<0.01 vs. Kontrolle (unbehandelte Zellen). Der basale cGMP-Level war 0.16 ± 0.04 pmol/10⁶ Zellen.

wurden jeweils EZ ohne SIN-1-Behandlung verwendet. Danach wurde die Wirkung von DEA/NO- oder BAY582667-Stimulation auf den cGMP-Level untersucht.

Eine Vorbehandlung der EZ mit SIN-1 hatte keinen signifikanten Effekt auf die basale sGC-Aktivität (Abb.4.21), während die NO-stimulierte Aktivität dagegen signifikant verringert wurde (Abb.4.21). BAY58-2667 verursachte nur eine moderate Stimulation der cGMP-Synthese unter basalen Bedingungen. Ähnlich wie es in Kapitel 4.1.2 für ODQ gezeigt wurde, führt eine Präinkubation der Zellen mit SIN-1 zu einer dramatischen Erhöhung der BAY58-2667-stimulierten sGC-Aktivität.

Diesen Daten zusammen mit publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Weber et al., 2001) lassen uns vermuten, dass ONOO⁻ tatsächlich sGC-Häm oxidiert und auf diese Weise das Enzym hemmt. Da im Kapitel 4.2 gezeigt wurde, dass die Oxidation des Häms nicht nur zu einem Aktivitäts- sondern auch zu einem Proteinverlust führt, ist es auch bei ONOO⁻ zu erwarten. Ähnlich wie bei ODQ oder MB, muss dieser Effekt durch BAY58-2667 aufhebbar sein. Es war das Ziel unserer

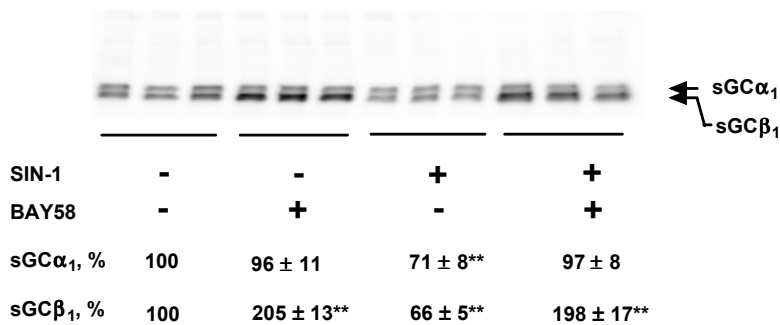


Abb.4.22 Effekt von BAY58-2667 auf sGC-Proteinlevel in EZ in Anwesenheit von SIN-1. EZ wurden mit 500 μ M SIN-1, 10 μ M BAY58-2667 oder mit einer Kombination von beiden Substanzen für 24 Std. inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot,

wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden. Die Daten wurden als Prozent von Kontrolle (Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten) dargestellt. * $-p < 0.05$ und ** $-p < 0.01$ vs. Kontrolle.

nächsten Versuche dies zu überprüfen.

Wie in der Abb.4.22 zu sehen, führte die Behandlung der EZ mit SIN-1 zu einer Abnahme beider sGC-Untereinheiten. Der Effekt von SIN-1 war aber deutlich schwächer als der Effekt von ODQ und MB. In Anwesenheit von BAY58-2667 konnte kein Effekt von SIN-1 auf den sGC-Proteinlevel beobachtet werden.

4.4.2 Wirkung von BAY58-2667 auf die Gefäßrelaxation unter oxidativen Bedingungen.

Unsere biochemischen Daten zeigen, dass der durch SIN-1 produzierte Verlust von sGC-Aktivität und Proteinlevel durch BAY58-2667 erfolgreich kompensiert werden. Es bleibt aber unklar, ob neben biochemischen auch funktionelle Parameter (z.B. Relaxation der Gefäße) verbessert werden können.

Aorten des Maus wurden präpariert und im Krebs Puffer (mit 2 % FKS) mit oder ohne 500 μM SIN-1 für 24 Std. bei 37°C behandelt. Danach wurden die Gefäße in ein Organbad montiert und Relaxation gemessen (Kap.3.3.14). Die Präparation der Aorten und die Organbad-Versuche wurden von Dr. Ashraf Taye durchgeführt.

Nach einer 24-stündigen Inkubation im Krebs Puffer kontrahierten sowohl unbehandelte als auch mit SIN-1-behandelte Gefäße in Antwort auf Phenylephrin gleich (Daten sind nicht gezeigt).

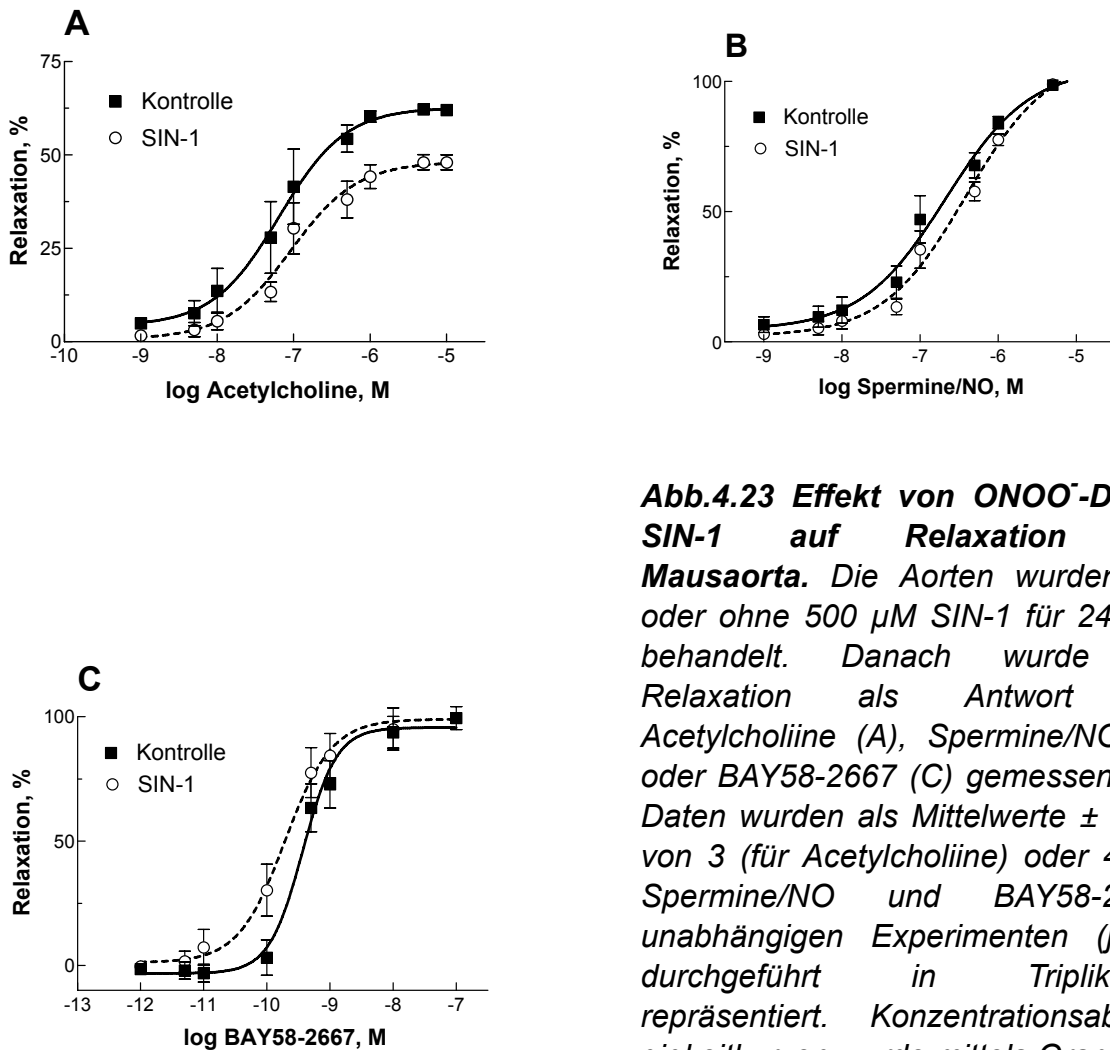


Abb.4.23 Effekt von ONOO⁻-Donor SIN-1 auf Relaxation der Mauseorta. Die Aorten wurden mit oder ohne 500 μM SIN-1 für 24 Std. behandelt. Danach wurde die Relaxation als Antwort auf Acetylcholine (A), Spermine/NO (B) oder BAY58-2667 (C) gemessen. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM von 3 (für Acetylcholine) oder 4 (für Spermine/NO und BAY58-2667) unabhängigen Experimenten (jedes durchgeführt in Triplikaten) repräsentiert. Konzentrationsabhängigkeitskurven wurde mittels GraphPad Prism 3.0 Software errechnet.

war aber beeinträchtigt im Vergleich zu unbehandelten Gefäßen (maximale Relaxation war 62.2 ± 1.1 % von der Kontraktion in Gegenwart von $0.2 \mu\text{M}$ Phenylephrin für unbehandelte und 48.1 ± 2.0 % SIN-1-behandelte Gefäße, $p < 0.05$) (Abb.4.23A). NO-Donor Spermin/NO induzierte komplette Relaxation in beiden Fällen, wobei der EC50-wert nach der Behandlung mit SIN-1 signifikant höher als in unbehandelten Gefäßen war (375 ± 89 nM und 219 ± 60 , $p < 0.05$) (Abb.4.23B). In Gegensatz dazu brauchte man eine geringere Konzentration von BAY58-2667 um die halbmaximale Relaxation der SIN-1-behandelten Gefäßen zu induzieren (EC50-Wert für BAY58-2667 war 0.40 ± 0.06 nM in unbehandelten Gefäßen und 0.19 ± 0.05 nM in SIN-1-behandelten, $p < 0.05$) (Abb.4.23C).

4.4.3 Effekt von BAY58-2667 auf sGC-Proteinlevel in SHR

Die Abnahme des sGC-Proteinlevels bei der Hypertonie wurde bereits gezeigt (Ruetten et al., 1999; Kloss et al., 2000). Die Ursachen dafür sind aber unklar. Aus unseren eigenen Ergebnissen und Arbeiten anderer Gruppen haben wir vermutet, dass Hämoxidation dabei eine Rolle spielen könnte. In diesem Fall könnte BAY58-2667 diese Proteinabnahme eventuell rückgängig machen. Um das zu untersuchen, haben wir SHR als ein Modell für eine solche Krankheit untersucht.

Mit diesen Versuchen wurde überprüft, ob es durch die chronische *in vivo* Applikation von BAY58-2667 bei 16-Wochen alten Ratten zu einer Wirkung auf sGC-Proteinlevel in verschiedenen Organen kommt. Die Ratten (männlich) wurden eine Woche lang 2 x täglich mit 10 mg/kg BAY58-2667 p.o behandelt. Die Kontrollratten erhielten entsprechend 2 ml/kg des Lösungsmittels (10 % Transcutol, 20 % Cremophor, 70 % H₂O) p.o 2 x täglich. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie im

Kap.3.3.13 beschrieben.

Wie in der Abb.4.24 dargestellt, war der Proteinlevel beider sGC-Untereinheiten in allen Organen von SHR nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrolle (Wistar Ratten), obwohl spontanhypertensive Tiere tendenziell eine Abnahme des sGC-Proteinlevels im Herzen und in der Aorta erkennen ließen.

Als nächstes wurde der sGC-Proteinlevel in BAY58-2667-behandelten Ratten bestimmt. Unerwartet kam es weder bei Wistar noch bei SHR zu einem Anstieg von sGC in Gegenwart von BAY58-2667 (Abb.4.25-4.30).

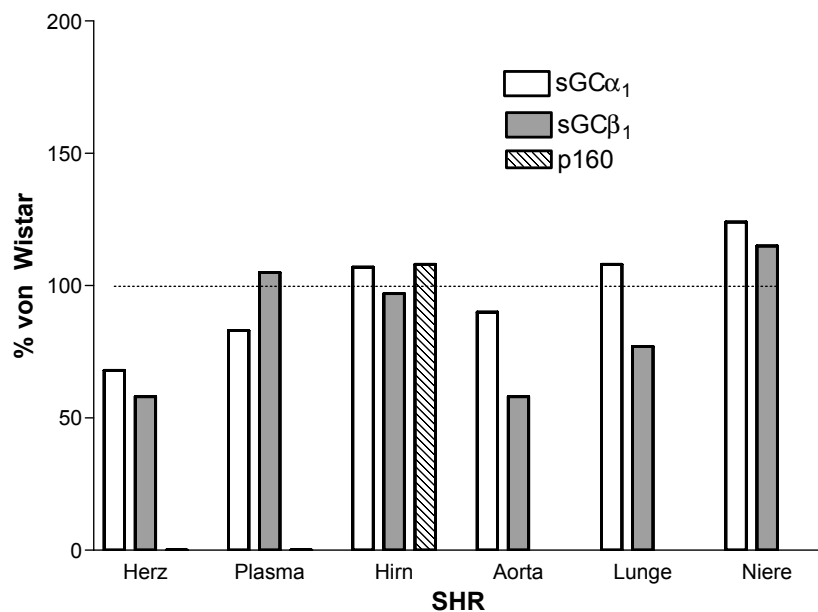


Abb.4.24 Vergleich des sGC-Proteinlevels von normalen (Wistar) Ratten und SHR. Verschiedene Organe von Wistar und SHR Tieren wurden entnommen, präpariert und homogenisiert. Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGCα₁ und anti-sGCβ₁ spezifische AK verwendet wurden. Die Daten wurden als Prozent von Kontrolle dargestellt.

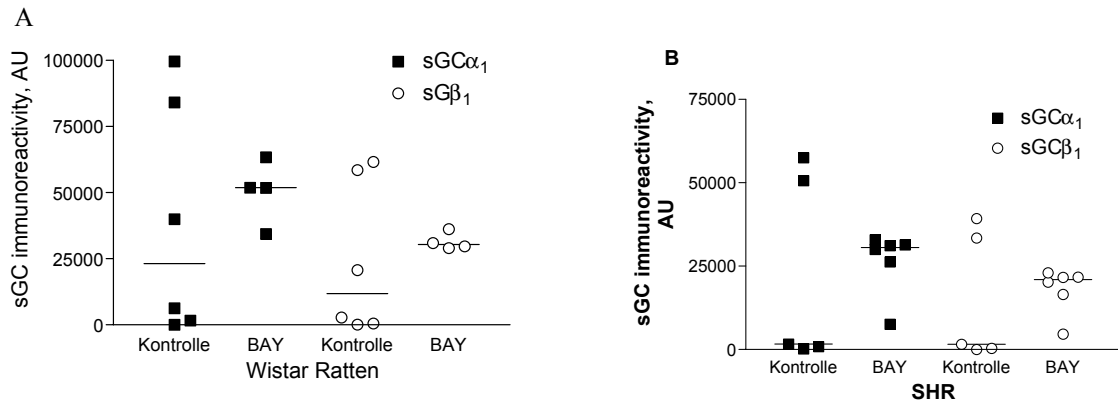


Abb.4.25 Effekt von BAY58-2667 auf densGC-Proteinlevel im Plasma von SHR. Trombozytenreiches Plasma von mit BAY58-2667 behandelten Wistar (A) und SHR (B) Tieren entnommen und präpariert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden.

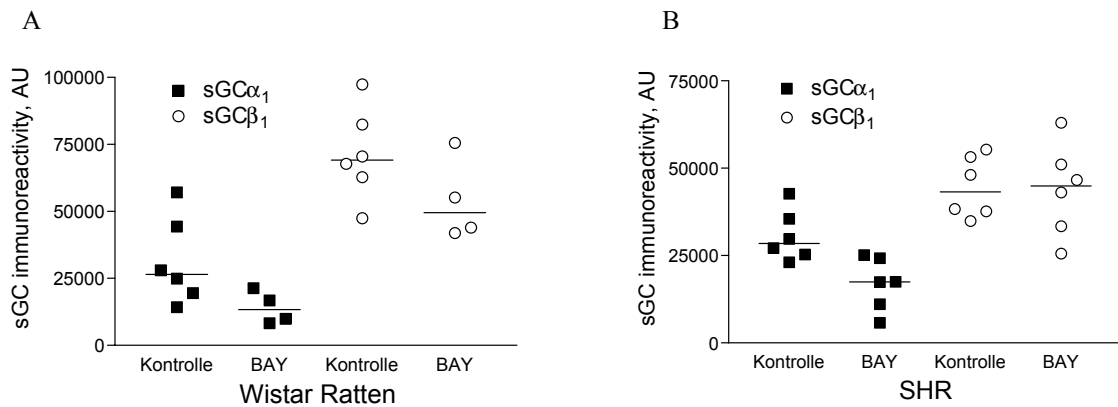


Abb.4.26 Effekt von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel in der Aorta von SHR. Die Aorta von mit BAY58-2667 behandelten Wistar (A) und SHR (B) Tieren entnommen, präpariert und homogenisiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden.

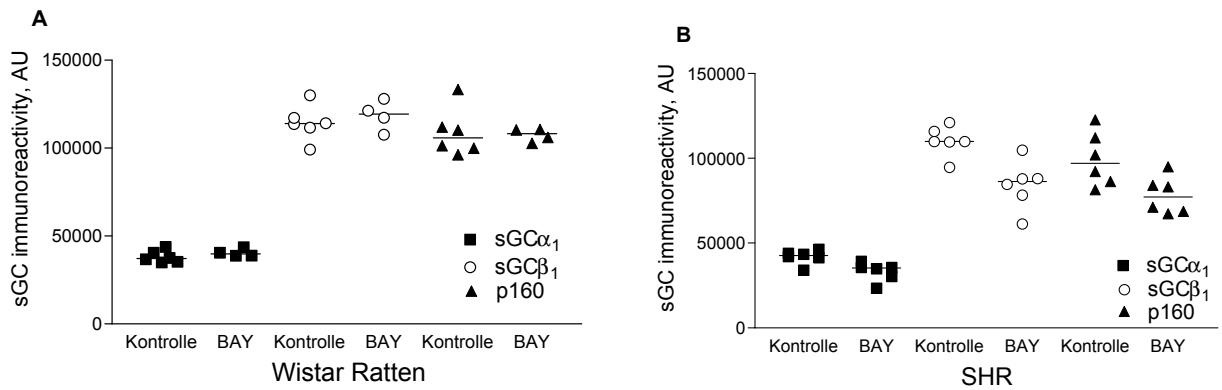


Abb.4.27 Effekt von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel im Hirn von SHR. Das Hirn von mit BAY58-2667 behandelten Wistar (A) und SHR (B) Tieren entnommen, präpariert und homogenisiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden.

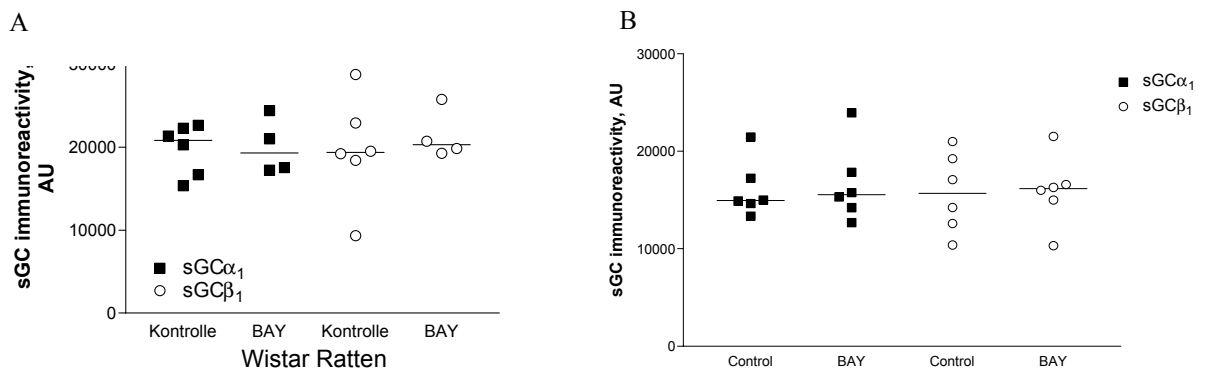


Abb.4.28 Effekt von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel im Herz von SHR. Herzen von mit BAY58-2667 behandelten Wistar (A) und SHR (B) Tieren entnommen, präpariert und homogenisiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden.

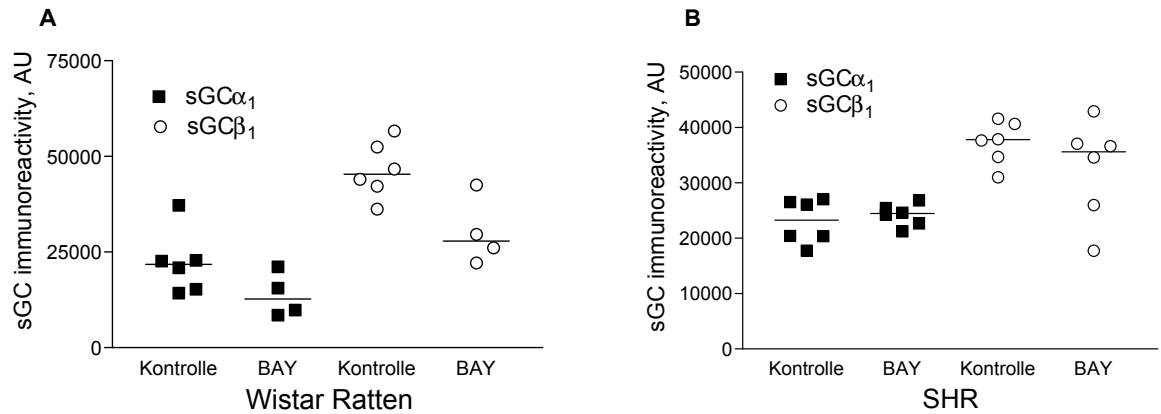


Abb.4.29. Effekt von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel in Lungen von SHR. Lungen von mit BAY58-2667 behandelten Wistar (A) und SHR (B) Tieren entnommen, präpariert und homogenisiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden.

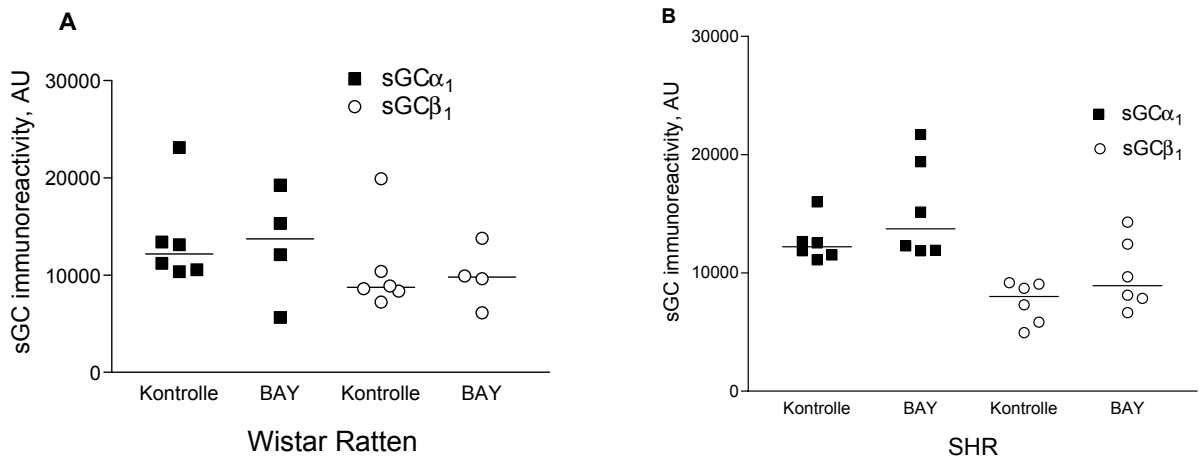


Abb.4.30 Effekt von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel in Nieren von SHR. Die Nieren von mit BAY58-2667 behandelten Wistar (A) und SHR (B) Tieren entnommen, präpariert und homogenisiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot, wobei anti-sGC α_1 und anti-sGC β_1 spezifische AK verwendet wurden.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Bedeutung der Hämbindung und der Hämoxydation in der Regulation des sGC-Proteinlevels zu klären. Es wurde bereits festgestellt, dass die prosthetische Hämgruppe eine zentrale Rolle in der Regulation der sGC-Aktivität spielt (Ignarro et al., 1982). Die pharmakologische Inhibition der sGC kann durch Oxidation ihrer Hämgruppe erreicht werden (Schrammel et al., 1996). So inhibiert ODQ die sGC durch Hämoxydation (Schrammel et al., 1996). Die Rolle des oxidativen Zustandes des Häms in der Regulation der sGC-Stabilität und des Proteinlevels ist unklar. Auch die Anwesenheit der oxidierten sGC bei physiologischen (pathophysiologischen) Zuständen ist fraglich.

Es ist sehr schwierig, die genaue Rolle von Redox- und Häm-Regulation zu untersuchen. Lange Zeit gab es keinen spezifischen Antikörper, der die sGC präzipitieren konnte. Mit solch einem Antikörper wäre es möglich, sGC zu isolieren und den Oxidationszustand des Hämes zu bestimmen. Aber auch bei der sGC-Aufreinigung bzw. Präzipitation treten prinzipielle Probleme auf. Würde die oxidierte sGC durch diese Methoden nachgewiesen, so könnte man nicht mit voller Gewissheit sagen, dass dies kein Artefakt der Aufreinigung gewesen ist.

Vor kurzem wurde eine neue Substanz BAY58-2667 beschrieben, die die sGC NO- und Häm-unabhängig aktiviert (Stasch et al., 2002). BAY58-2667 ist ein neuartiges Werkzeug zur Untersuchung der Rolle von Hämoxydation in der Regulation der sGC. Diese Substanz aktiviert die sGC stärker, wenn sie durch den sGC-Inhibitor und Hämoxydant ODQ oxidiert wurde (Stasch et al., 2002). Es war aber nicht klar, welche Form der sGC (reduzierte oder oxidierte) durch BAY58-2667

aktiviert wird. Stasch und Mitarbeiter haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass BAY58-2667 sowohl die native sGC als auch die oxidierte sGC aktivieren kann (Stasch et al., 2002). Unsere Vermutung war, dass durch BAY58-2667 nur die oxidierte Form der sGC, die auch in der Präparationen nativer sGC vorkommen könnte, aktiviert wird. Die Frage, welche Redox-Form der sGC durch BAY58-2667 aktiviert wird, hat nicht nur eine äußerst wichtige Bedeutung für unser Verständnis der Regulation dieses Enzyms sondern auch eine potentielle pharmakologische Relevanz.

1.

Sowohl NO-Donoren als auch die bis jetzt beschriebenen NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren wie z.B. YC-1 und BAY41-2272 stimulieren nur die reduzierte Häm-haltige sGC.

Es wurde aber bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass Porphyrine die sGC-Aktivität beeinflussen, indem sie mit dem Häm um die Bindungsstelle des Enzyms konkurrieren (Ignarro et al., 1982; Ignarro et al., 1984). So stimuliert PPIX die sGC, während Metalloporphyrine (wie z.B. ZnPPIX) sGC inhibieren (Ignarro et al., 1984). Es könnte vermutet werden, dass diese Substanzen auf Häm-freie und nicht auf Häm-haltige sGC wirken. Dies wurde indirekt in unseren Versuchen mit EZ bestätigt. So hat hier ZnPPIX keinen Effekt auf die Stimulation der Häm-haltigen sGC durch NO. Wir vermuteten, dass die vor kurzem beschriebene Substanz BAY58-2667, die oxidierte und Häm-freie sGC stimuliert, auch durch Besetzung der sGC Hämbindungstasche wirkt. Um das zu überprüfen, wurde die Effekten von PPIX und Metalloporphyrine mit den Effekten von BAY58-2667 verglichen. In einer sGC-Präparation, die sowohl Häm-freie als auch Häm-haltige sGC enthält, haben BAY58-2667 und PPIX keinen additiven Effekt auf die sGC-Aktivität ausgeübt. Das bedeutet,

dass beide Substanzen eher um eine Enzympopulation konkurrieren, als dass sie zwei verschiedene sGC-Pools stimulieren. Auch die Tatsache, dass die BAY58-2667 stimulierte sGC-Aktivität durch Zugabe von ZnPPIX oder MnPPIX komplett inhibiert wurde, deutet darauf hin, dass Protoporphyrine und BAY58-2667 auf die gleiche (Häm-freie) sGC-Population wirken. Effekte auf die oxidierte sGC lassen vermuten, dass das Häm nach seiner Oxidation rausfällt oder nicht mehr so stark an die sGC gebunden ist. Weshalb kann das Häm durch BAY58-2667 verdrängt werden.

Zusammengefasst aktiviert BAY58-2667 genau wie Protoporphyrin nur Häm-freie sGC durch eine direkte Interaktion mit der freien Hämbindungstasche des Enzyms oder durch Verdrängen des schwach gebundenen oxidierten Häms. Diese Eigenschaft der Substanz macht sie zu einem wichtigen Tool, um oxidierte sGC bzw. Häm-freie sGC zu identifizieren.

Nach den Experimenten mit gereinigter sGC stellte sich die Frage, ob auch in intakten Zellen Häm-freie sGC existiert und ob diese durch BAY58-2667 aktiviert werden könnte. BAY58-2667 ist in der Lage die cGMP-Synthese in intakten Zellen zu stimulieren. Diese Fähigkeit korreliert mit dem oxidativen Zustand der sGC. ZnPPIX blockiert den BAY58-2667-stimulierten cGMP-Anstieg. Aufgrund dieser Daten kann man schließen, dass BAY58-2667 den cGMP-Spiegel in intakten Zellen durch einen direkten Effekt auf die sGC beeinflusst und nicht durch andere Mechanismen, z.B. durch Hemmung der PDEs. Wenn wir annehmen, dass der Effekt von BAY58-2667 durch Hemmung der PDEs zustande kommt, dann könnte man die inhibitorische Wirkung von ZnPPIX nur durch eine Reaktivierung dieser Enzyme erklären. Das scheint aber ziemlich unwahrscheinlich zu sein.

2.

Bislang wurde der Einfluss von Hämoxidanzien nur auf die Aktivität der sGC und nicht auf den sGC-Proteinlevel untersucht. Es wurde aber bereits in einigen Arbeiten vermutet, dass Hämoxidation einen Einfluss auf sGC-Proteinlevel haben kann (Papapetropoulos et al., 1996a). In unseren Versuchen sollte diese Frage mit Hilfe des uns zur Verfügung stehenden Tools weiter aufgeklärt werden.

Unsere Daten demonstrieren, dass eine Behandlung der EZ mit ODQ zu einer raschen und starken Abnahme des sGC-Proteins führt. Diese Abnahme müsste durch eine verminderte sGC-Proteinstabilität und einen erhöhten Proteinabbau vermittelt werden, da Substanzen, die die Proteinsynthese hemmen (Cycloheximid oder Emetin) keinen so schnellen Effekt produzieren konnten. Ähnlich es wurde in einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit einer spanischen Gruppe gezeigt. Hier senkte ODQ den sGC-Proteinlevel in Nebennierenzellen (Ferrero and Torres, 2002). Andererseits stehen diese Daten im Widerspruch zu einer früheren Arbeit, in der ODQ die SNP-induzierte sGC-Proteinabnahme aufgehoben hat (Filippov et al., 1997). Diese Unterschiede können vielleicht dadurch erklärt werden, dass in der Arbeit von Ferrero und Torres ODQ für die gesamte Inkubationszeit den Zellen zugesetzt wurde, während Fillipov und Mitarbeiter die Zellen nur für 30 min mit ODQ vorinkubierten. ODQ vermittelt seine inhibitorische Wirkung auf die sGC durch Oxidation des Hämeisens (Schrammel et al., 1996). Die Wirkung von ODQ auf die sGC in intakten Zellen ist reversibel und eine kurzfristige Behandlung könnte vielleicht nicht ausreichend sein, um eine komplette Oxidation der sGC zu gewährleisten. Es könnte vermutet werden, dass das oxidierte Häm nicht nur eine geringere Affinität zu NO aufweist, sondern sich auch schwächer an die sGC bindet.

Unsere Vermutung war, dass der Verlust von Häm eine destabilisierende Wirkung auf die sGC haben könnte.

Es wurde beschrieben, dass sGC-aktivierende Substanzen z.B. NO-Donoren und YC-1 auch einen Effekt auf den sGC-Proteinlevel ausüben. Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um eine Abnahme des sGC-Proteinlevels oder mRNA-Levels (Filippov et al., 1997). Die Wirkung von BAY58-2667 auf den sGC-Proteinlevel war bis jetzt unbekannt. Unsere Daten zeigen, dass BAY58-2667 in Gegensatz zu anderen sGC-Aktivatoren eine dramatische Erhöhung des sGC β_1 -Proteinlevels verursacht. Warum nur sGC β_1 und nicht auch sGC α_1 in einem so großen Ausmaß reguliert wird bleibt unklar. Wir vermuten, dass BAY58-2667 seine Wirkung auf den sGC-Proteinlevel nicht über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels ausübt. Erstens wurde bis jetzt in der Literatur nur eine negative Wirkungen von cGMP auf sGC-Proteinlevel beschrieben (Papapetropoulos et al., 1996a; Filippov et al., 1997). Zweitens haben cGMP-Analoga keinen Effekt auf den sGC-Proteinlevel in EZ (beschrieben in der Dissertation von Cesar Ibarra, Würzburg). Obwohl wir aufgrund unserer Daten einen Effekt auf die sGC-Expression nicht ausschließen können, scheint aber ein stabilisierender Effekt auf das sGC-Protein wahrscheinlicher zu sein. Unserer Vermutung nach führt die Substitution der oxidierten Hämgruppe (oder Besetzung einer leeren Hämbindungstasche) durch BAY58-2667 zur Stabilisierung des Enzyms. Die Tatsache, dass BAY58-2667 ODQ-Effekte rückgängig macht, bestätigt diese Vermutung. Es konnte auch gezeigt werden, dass nicht nur BAY58-2667 sondern auch ZnPIX den sGC β_1 -Proteinlevel erhöht und die Effekte von ODQ rückgängig macht. Aufgrund dieser Daten kann man schließen, dass hämoxidierende Substanzen zur Destabilisierung der sGC über den Hämverlust führen und dass

Substanzen, die die Bindungstasche besetzen, das Enzym stabilisieren.

3.

In früheren Arbeiten aus unserem Labor wurde gezeigt, dass die Behandlung von EZ und Glattmuskelzellen mit der hämoxidierenden Substanz ODQ zur Bildung eines hochmolekularen anti-sGC α_1 -immunreaktiven Proteins (160 kDa) führt (Ibarra et al., 2001a,b). Besonders wichtig und interessant ist, dass dieses Protein nach der Oxidation des Häm, was zur Destabilisierung der sGC führt, entsteht. Nicht nur ODQ, sondern auch ein anderer Inhibitor der sGC, NS2028, induzierte die Bildung von p160 (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu, war MB, ein weiterer sGC-Inhibitor, der auch Häm oxidiert (Mayer et al., 1993; Luo et al., 1995) nicht in der Lage p160 zu induzieren. Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich, dass die Hämoxidation allein noch nicht ausreichend für die p160 Bildung ist. Es sollten auch weitere Mechanismen geben, die für die Entstehung des p160 verantwortlich sind.

Unsere immunologischen Daten zeigen, dass p160 Protein ein SDS-resistentes Heterodimer ist, welches aus sGC α_1 und sGC β_1 Untereinheiten besteht. Um dies durch eine alternative Methode zu bestätigen, wurde dieses Protein gereinigt. Da es sehr schwierig ist, dieses Protein aus EZ zu reinigen, wurde versucht ein rekombinantes p160 zu induzieren und zu reinigen. Dabei sollte auch eine andere wichtige Frage beantwortet werden: Kann man p160 in jedem Zellsystem, in dem sGC exprimiert wird, induzieren oder wird die Bildung dieses Proteins auf unbekannte Weise nur in bestimmten Zelltypen gesteuert? p160 konnte durch Behandlung mit ODQ auch in Sf9-Zellen induziert werden. Sowohl immunchemische Daten als auch Ergebnisse der Identifizierung mittels MALDI-TOF bestätigten, dass p160 ein Komplex ist, der aus den sGC α_1 - und sGC β_1 -Untereinheiten besteht.

Unsere Versuche zeigen, dass die Expression beider sGC-Untereinheiten dabei die minimale Anforderung ist. Zabel und Mitarbeiter haben gezeigt, dass bei der Expression der einzelnen sGC-Untereinheiten in Sf9-Zellen Homodimere entstehen (Zabel et al., 1999). Allerdings scheinen sGC-Homodimere kein Häm zu enthalten, da beide Untereinheiten für die Hämbindung notwendig sind (Wedel et al., 1995). So könnte die Abwesenheit des Häms dazu führen, dass sGC-Homodimere ODQ-unempfindlich sind. Um zu prüfen, ob der Hämverlust tatsächlich die Induktion des p160 durch ODQ verhindert, wurde wildtypische und mutierte sGC, die kein Häm bindet, in CHO-Zellen exprimiert. In Zellen, die wildtypische sGC exprimierten, konnte ODQ sehr wohl p160 induzieren, aber nicht in den Zellen mit der mutierten sGC. So bestätigen diese Ergebnisse, dass Hämoxidation für die Bildung von p160 notwendig, aber wohl nicht ausreichend ist, da nicht alle Substanzen, die Häm oxidieren, p160 induzieren.

Die oxidativen Modifikationen von Proteinen kann zur kovalenten Bindungen zwischen Aminosäureresten führen. Deswegen wurde als nächstes untersucht, ob das p160 Protein ein kovalent gebundener Komplex aus sGC-Untereinheiten ist. Unter harten denaturierenden Bedingungen (6 M GnSCN) war eine deutliche Abnahme des rekombinanten ODQ-induzierten p160 Protein zu sehen, was auf eine nichtkovalente Bindung zwischen den beiden Untereinheiten der sGC hindeutet. Interessanterweise konnte keine Zunahme des sGC-Proteins unter diesen Bedingungen festgestellt werden, was wir zur Zeit nicht erklären können.

Es könnte vermutet werden, dass die Oxidation des Häms und der Verlust der prosthetischen Gruppe zu einem instabilen Zustand des Apoenzyms und damit zur Aggregation der Untereinheiten führt. Dies scheint aber nicht ganz zutreffend zu sein.

Erstens führt die Expression der Häm-freien sGC (H105F Mutante) in CHO-Zellen nicht zu Bildung von p160. Zweitens waren nur ODQ und die verwandte Substanz NS2028 und nicht andere hämoxidierende Substanzen (MB, NO, ONOO⁻) in der Lage, das p160 Protein zu induzieren. Man könnte vermuten, dass alle diese Substanzen das sGC-Häm nicht so effizient oxidieren wie ODQ (oder NS2028). Es gibt aber auch weitere Daten, die dem vereinfachten Szenario der Bildung von p160 widersprechen. Zum einen ist es uns nicht gelungen, p160 aus gereinigter sGC *in vitro* durch eine Behandlung mit ODQ zu induzieren. Zum anderen auch wenn sGC durch ODQ oxidiert wird, verhindert eine gleichzeitige Behandlung mit BAY58-2667 die Bildung vom p160 Protein. Unserer Vermutung nach, macht ODQ mehr als nur die Hämoxidation. Vielleicht werden dabei auch Aminosäurereste modifiziert, was zu einer Bindung zwischen sGC-Untereinheiten führt. Wenn aber die Hämbindungstasche durch BAY58-2667 besetzt ist, verhindert dieses aus sterischen Gründen die Interaktion zwischen modifizierten Aminosäuren. Obwohl aus unserer Sicht dieser Ablauf am wahrscheinlichsten ist und am besten unseren Daten entspricht, gibt es auch hier eine Komplikation, die wir nicht erklären können. Warum verschwindet p160 unter harten denaturierenden Bedingungen? Handelt es sich tatsächlich um eine nicht-kovalente Bindung, die unter diesen Bedingungen auseinander fällt? Falls ja, warum konnte kein Anstieg der sGC-Untereinheiten detektiert werden? Diese Fragen können aufgrund der unserer Daten nicht beantwortet werden und erfordern weitere Untersuchungen.

4.

Dass sGC ein geeignetes Targetmolekül zur Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten ist, wurde durch die langjährige Verwendung von Nitroglyzerin und

anderen NO-generierender Substanzen bestätigt. Leider führen diese Substanzen zur Entwicklung der Nitrattoleranz, was ihre therapeutische Wirkung bei betroffenen Patienten beeinträchtigt. Ein weiteres Problem ist die Abnahme der sGC-Aktivität und des α -Proteinlevels, die bei verschiedenen pathologischen Zuständen beschrieben wurde (Ruetten et al., 1999; Kloss et al., 2000; Jacke et al., 2001). Diese Faktoren verlangen die Entwicklung neuartiger Pharmaka zur Regulation der sGC oder die Entwicklung von neuen therapeutischer Strategien, die die Nitrattoleranz und die Abnahme der sGC umgehen.

BAY58-2667 stimulierte die sGC nach ihrer Inhibierung durch ODQ sogar stärker, als im nicht-inhibiertem Zustand (Stasch et al., 2002). Die häm-freie sGC, die normalerweise nicht von klassischen sGC-Aktivatoren aktiviert wird, konnte auch stimuliert werden. Die Substanz war auch in der Lage, den Blutdruck bei Tieren zu senken (Stasch et al., 2002). Obwohl klar war, dass dieser sGC-Aktivator sich in vielen seiner Eigenschaften von den klassischen sGC-Regulatoren unterscheidet, waren die Grundlagen seiner pharmakologischen Wirkung noch nicht verstanden.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass BAY58-2667 ausschließlich Häm-freie oder oxidierte sGC stimuliert und dass seine pharmakologischen Effekte höchstwahrscheinlich auf der Aktivierung dieser sGC-Form beruhen.

Es konnte gezeigt werden, dass BAY58-2667 einen entscheidenden Vorteil gegenüber den klassischen sGC-Aktivatoren hat. Immer mehr Arbeiten zeigen, dass unter oxidativen Bedingungen, die auch bei Herz-Kreislaufkrankheiten eine wichtige Rolle spielen, das sGC-Protein und die α -Aktivität gesenkt wird. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Oxidation des sGC-Häms für diese Effekte verantwortlich sein

kann und dass BAY58-2667 (und auch andere Liganden der sGC-Hämbindungsstasche) in der Lage sind, diese Vorgänge rückgängig zu machen. Während klassische sGC-Aktivatoren immer weniger Target für ihre Wirkung haben, stabilisiert BAY58-2667 die oxidierte sGC (die ohne BAY58-2667 abgebaut würde) und stimuliert gleichzeitig das Enzym. Da die Daten dieser Arbeit auch zeigen, dass reduzierte Häm-haltige sGC von BAY58-2667 unbeeinträchtigt zu sein scheint, kann man vermuten, dass diese Substanz nur dort ihre pharmakologische Wirkung ausübt, wo es zu vermehrter Oxidation der sGC kommt. Das unterscheidet BAY58-2667 von den so genannten sGC-Sensibilisatoren (z.B. YC-1). Diese Substanzen vermögen zwar die Wirkung von NO zu verstärken, sind aber nicht in der Lage, oxidierte sGC zu aktivieren. Das heißt, in normalen vom oxidativen Stress nicht betroffenen Gefäßen verstärken Sensibilisatoren Wirkung von NO, in betroffenen Gefäßen sind sie genau so ineffizient wie die NO-Donoren selbst. sGC-Liganden, die die Hämbindungsstasche besetzen, sollten unter solchen Bedingungen besonders vorteilhaft sein. Es ist gelungen in dieser Arbeit zu zeigen, dass nicht nur biochemische Versuche mit BAY58-2667 dieser Hypothese entsprechen, sondern auch physiologische Versuche mit isolierten Gefäßen sie bestätigen. Weitere *in vivo* Versuche sollen zeigen, ob diese Überlegungen auch für Tiermodelle (und später vielleicht für Patienten) zutreffend sind.

Eine wichtige biochemische Frage muss aber noch beantwortet werden. Welche Rolle spielt die Oxidation des Häms unter normalen Bedingungen? Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass oxidierte sGC auch in unbehandelten Zellen vorkommt. Die pharmakologische Wirksamkeit von BAY58-2667 in Tieren lässt diese Form von sGC auch *in vivo* vermuten. Spielt vielleicht die Oxidation des Häms und der Abbau

der oxidierten sGC eine Rolle in der Regulation des sGC-Proteins, auch unter normalen physiologischen Bedingungen? In Zellversuchen führt eine Behandlung mit BAY58-2667 zur raschen und dramatischen Zunahme des sGC β_1 -Proteinlevels. Es konnte vermutet werden, dass auch die Behandlung eines Tieres zum Anstieg des sGC-Levels (auch in gesunden Organen) führt. Es könnte eine schwerwiegende Komplikation darstellen und muss unbedingt untersucht werden. Unsere Daten aus den Versuchen mit SHR bestätigen zwar diese Befürchtung nicht, führen aber zu einer weiteren Frage: Warum hatte BAY58-2667, das so stark ausgeprägte Effekte in unseren Zellversuchen aufwies, keinen Effekt auf den sGC-Proteinlevel in Tieren? Die einfachste Erklärung, die aber in weiteren Studien überprüft werden muss, ist, dass BAY58-2667 sehr schlechte pharmakokinetische Eigenschaften hat und es konnte in Tierversuchen keine ausreichende Konzentration erreicht werden, um einen Effekt auszuüben.

Es muss auch erwähnt werden, dass die vorliegende Arbeit einen möglichen Kandidaten, der unter pathologischen Bedingungen zur Oxidation des sGC-Häms führt, identifiziert hat. ONOO $^-$, der eine wichtige Rolle bei zahlreichen Herz-Kreislaufkrankheiten spielt, führt zur Oxidation des sGC-Häms. Es wurde bereits vermutet, dass ONOO $^-$ das Häm der sGC oxidiert (Weber et al., 2001). In dieser Arbeit wurden Effekte von ONOO $^-$ auf die sGC-Aktivität und den -Proteinlevel durch eine Behandlung mit BAY58-2667 aufgehoben. Diese Daten deuten darauf hin, dass ONOO $^-$ zumindest *in vitro* sGC-Häm oxidiert. Es muss weiter untersucht werden, ob diese Substanz auch *in vivo* dazu beiträgt und ob es auch andere Moleküle *in vivo* zu Oxidation des sGC-Häms führen.

Zusammenfassend sind die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit in der Abb. 5.1 dargestellt. Während die Regulation der reduzierten Häm-haltigen sGC bereits gut untersucht wurde, konnte die oxidierte sGC durch Anwendung spezifischer Aktivatoren identifiziert werden. Die oxidierte sGC scheint im Gegensatz zu der reduzierten Form schnell abgebaut zu werden, was durch ihre Stabilisierung mit Liganden der Hämbindungstasche verhindert werden kann. Die Oxidation der sGC kann unter bestimmten Bedingungen zur Bildung von SDS-resistenten Heterodimerkomplexen führen. Die Bedeutung dieser Komplexe für den Abbau der sGC und ihre Beziehung zu dem natürlich vorkommenden sGC α_1 -immunreaktiven Protein mit dem gleichen Molekulargewicht (Nedvetsky et al., 2002) müssen noch untersucht werden.

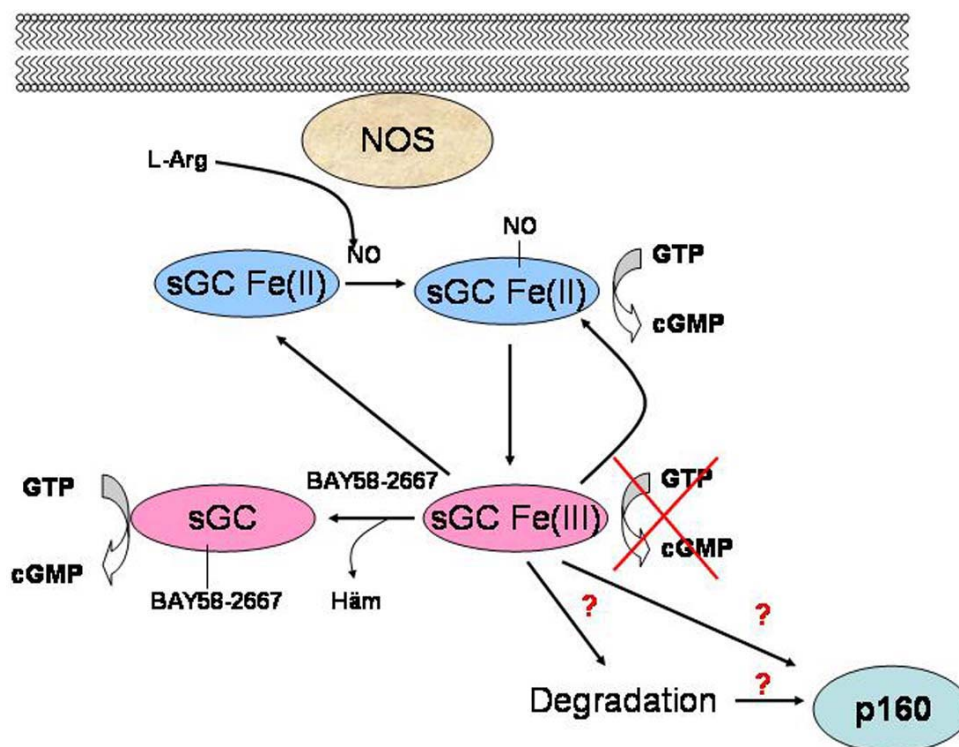


Abb. 5.1 Regulation der sGC-Aktivität und -Proteinlevel durch die Oxidation der prosthetischen Hämgruppe oder ihre Substitution durch pharmakologische Liganden.

6. Zusammenfassung

Aktivierung der sGC durch NO stellt die Grundlage des NO-cGMP-Signaltransduktionsweges dar. Es konnte bisher in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Substanzen mit reduzierendem oder mit oxidierendem Effekt einen Einfluss auf die sGC-Regulation haben können. Die prosthetische Hämgruppe spielt eine zentrale Rolle in der Regulation sGC-Aktivität. Die Rolle der oxidativen Zustände des Häms in der Regulation der sGC-Stabilität und -Proteinlevel ist unklar. Die Anwesenheit der oxidierten sGC bei physiologischen (pathophysiologischen) Zuständen ist fraglich. Oxidation des Hämseisens oder Entfernung des Häms führt zum Verlust der NO-stimulierten Aktivität der sGC. Aus diesem Grund wurde bis jetzt nur die reduzierte sGC als aktive Form der sGC und als pharmakologisches Target betrachtet. Vor kurzem aber wurde eine Substanz beschrieben (BAY58-2667), die sGC NO- und Häm-unabhängig aktiviert. Es war aber nicht klar, welche Form der sGC (reduzierte und oxidierte) durch BAY58-2667 aktiviert wird. Diese Frage hat nicht nur eine äußerst wichtige Bedeutung für unser Verständnis der Regulation dieses Enzyms, sondern auch eine potentielle pharmakologische Relevanz. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Aufklärung der verschiedenen Mechanismen der Redox-Regulation der sGC durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass BAY58-2667 nicht nur Häm-freie sGC aktiviert, sondern auch deren Abbau verhindert und so die sGC-Proteinmenge reguliert. sGC-Inhibitoren wie ODQ oder MB scheinen demgegenüber, ähnlich wie chronische NO-Exposition, das Häm der sGC zu oxidieren und diese so zu inaktivieren und ihren Proteinlevel zu reduzieren. Dabei entstehen interessanterweise höhermolekulare

Aggregate.

Die Hauptbefunde der vorliegenden Arbeit sind im Folgenden aufgeführt:

1. Ausschließlich oxidierte Häm-freie sGC ist für die pharmakologischen Effekte von BAY58-2667 verantwortlich.
2. Hämoxidierende Substanzen wie ODQ oder MB führen zur Destabilisierung der sGC. BAY58-2667 stabilisiert oxidierte und Häm-freie sGC und stimuliert auch ihre Aktivität.
3. Oxidation des sGC-Häms führt zur Bildung eines hochmolekularen SDS-resistenten Komplex von sGC₁ und sGC₁ (p160). Dabei spielt Hämoxidation eine wichtige Rolle. Andererseits, wenn sGC durch ODQ oxidiert wird, verhindert die gleichzeitige Behandlung mit BAY58-2667 die Bildung von p160.
4. Biochemischen Daten zeigen, dass der Verlust von sGC-Aktivität und -Proteinlevel, welcher durch SIN-1 bewirkt wird, durch BAY58-2667 erfolgreich kompensiert werden kann. Physiologische Versuche mit isolierten Gefäßen bestätigen, dass BAY58-2667 auch die Gefäßrelaxation unter oxidativen Bedingungen verbessern konnte.

7. Summary

Activation of soluble guanylyl cyclase (sGC) by nitric oxide represents the basis of NO-cGMP signalling pathway. Several studies have demonstrated that substances with reduce of oxidizing properties may affect regulation of sGC. The prosthetic heme group of sGC plays the central role in regulation of the enzyme activity. The role of oxidative state of heme in the regulation of sGC stability and protein level is unclear. It is also unclear whether oxidized or heme-deficient sGC is present in vivo under physiological or pathophysiological conditions. However, it is known that pharmacological oxidation of the heme iron of sGC results in a loss of NO-stimulated sGC activity. Therefore, only reduced heme-containing sGC has been considered so far as a target for pharmacological intervention. Recently, a substance (BAY58-2667) has been described which is able to activate sGC NO- and heme-independently. However, it has not been clarified by previous studies whether both reduced and oxidized, or only oxidized sGC is the activated by the drug. This question is extremely important for our understanding of the sGC regulation and also has a pharmacological relevance. In the present study, experiments were performed to clarify different aspects of redox-regulation of sGC. It has been demonstrated that BAY58-2667 does not only activate sGC heme-independently, but also attenuates sGC degradation and regulates sGC protein level. In contrast, sGC inhibitors such as ODQ or methylene blue as well as chronic exposure towards NO, appear to oxidize sGC heme inactivating the enzyme and down-regulate its expression level. This is accompanied by formation of SDS-resistant aggregates of sGC.

The main findings of the present study are:

1. Solely oxidized or heme-deficient sGC is responsible for pharmacological effects of BAY58-2667.
2. Heme-oxidizing compounds like ODQ or methylene blue destabilize sGC.

This could be prevented by BAY58-2667.

3. Oxidation of sGC by ODQ results in formation of high-molecular weight complexes of sGC1 and sGC1 (p160). Oxidation of sGC heme plays a key role in this process. Interestingly, BAY58-2667 presented during treatment prevents formation of p160.

4. Biochemical studies suggests that SIN-1-induced lost of sGC activity and protein level could be successfully prevented by BAY58-2667.

Experiments with isolated vessels supports that potency of BAY58-2667 to produce vasodilation increases under oxidative conditions.

8. Literaturverzeichnis

- Andrew, P. J. and B. Mayer (1999). "Enzymatic function of nitric oxide synthases."
Cardiovasc Res 43: 521-531.
- Arnold, W. P., C. K. Mittal, S. Katsuki and F. Murad (1977). "Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations." Proc Natl Acad Sci U S A 74(8): 3203-7.
- Ashman, D. F., R. Lipton, M. M. Melicow and T. D. Price (1963). "Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine." Biochem Biophys Res Commun 11: 330-334.
- Bauersachs, J., A. Bouloumie, D. Fraccarollo, K. Hu, R. Busse and G. Ertl (1999). "Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production [see comments]." Circulation 100(3): 292-8.
- Bauersachs, J., A. Bouloumie, A. Mulsch, G. Wiemer, I. Fleming and R. Busse (1998). "Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production." Cardiovasc Res 37(3): 772-9.
- Bellamy, T. C. and J. Garthwaite (2002). "Pharmacology of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in cerebellar cells." Br J Pharmacol 136(1): 95-103.
- Bellamy, T. C., J. Wood, D. A. Goodwin and J. Garthwaite (2000). "Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses." Proc Natl Acad Sci U S A 97(6): 2928-33.
- Benveniste, E. N. and D. J. Benos (1995). "TNF- α and INF- γ -mediated signal

- transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function." *FASEB J.* 9: 1577-1584.
- Boldyrev, A. A. (1998). "Carnosine." *Biolog. Significance and Possibility of Applic. in Medicine (Moscow)*: 252-269.
- Bon, C. L. and J. Garthwaite (2001). "Exogenous nitric oxide causes potentiation of hippocampal synaptic transmission during low-frequency stimulation via the endogenous nitric oxide-cGMP pathway." *Eur J Neurosci* 14(4): 585-94.
- Brandish, P. E., W. Buechler and M. A. Marletta (1998). "Regeneration of the ferrous heme of soluble guanylate cyclase from the nitric oxide complex: acceleration by thiols and oxyhemoglobin." *J Biol Chem* 273(48): 16898-16907.
- Braugler, J. M. (1983). "Soluble guanylate cyclase activation by nitric oxide and its reversal. Involvement of sulfhydryl group oxidation and reduction." *Biochem Pharmacol* 32(5): 811-8.
- Braugler, J. M., C. H. Mittal and F. Murrad (1979). "Effects of thiols, sugars, and proteins on nitric oxide activation of soluble guanylate cyclase." *J. Biol. Chemistry* 254(24): 12450-12454.
- Budworth, J., S. Meillerais, I. Charles and K. Powell (1999). "Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases." *Biochem Biophys Res Commun* 263(3): 696-701.
- Buechler, W. A., M. Nakane and F. Murad (1991). "Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits." *Biochem Biophys Res Commun* 174(1): 351-7.
- Burstyn, J. N., A. E. Yu, E. A. Dierks, B. K. Hawkins and J. H. Dawson (1995). "Studies of the heme coordination and ligand binding properties of soluble

- guanylyl cyclase (sGC): characterization of Fe(II)sGC and Fe(II)sGC(CO) by electronic absorption and magnetic circular dichroism spectroscopies and failure of CO to activate the enzyme." *Biochemistry* 34(17): 5896-903.
- Carvajal, J. A., A. M. Germain, J. P. Huidobro-Toro and C. P. Weiner (2000). "Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation." *J Cell Physiol* 184(3): 409-20.
- Cary, S. P. and M. A. Marletta (2001). "The case of CO signaling: why the jury is still out." *J Clin Invest* 107: 1071-1073.
- Cellek, S., L. Kasakov and S. Moncada (1996). "Inhibition of nitrgic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase." *Br J Pharmacol* 118(1): 137-40.
- Chrisman, T. D., D. L. Garbers, M. A. Parks and J. G. Hardman (1975). "Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung." *J Biol Chem* 250(2): 374-81.
- Craven, P. A. and F. R. DeRubertis (1978a). "Effects of thiol inhibitors on Hepatic guanylat cyclase activity." *Biochim Biophys Acta* 524: 231-244.
- Craven, P. A., DeRubertis, F.R. (1978b). "Restoration of the responsiveness of purified guanylat cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins." *J. Biolog.Chemistry* 253(23): 8433-8443.
- Dierks, E. A. and J. N. Burstyn (1996). "Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase." *Biochem Pharmacol* 51(12): 1593-600.
- Dierks, E. A. and J. N. Burstyn (1998). "The deactivation of soluble guanylyl cyclase by redox-active agents." *Arch Biochem Biophys* 351(1): 1-7.

Doni, M. G., A. Alexandre, E. Padoin, S. Bertoncetto and R. Deana (1991).

“Nitrovasodilators and cGMP inhibit human platelet activation.” 2(3): 161-165.

Draijer, R., D. E. Atsma, A. van der Laarse and V. W. van Hinsbergh (1995). “cGMP

and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation

via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells.” 76(2):

199-208.

Feelisch, M., P. Kotsonis, J. Siebe, B. Clement and H. H. H. W. Schmidt (1999). “The

soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is

a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other

cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation.” *Mol*

Pharmacol 56(2): 243-53.

Ferrero, R. and M. Torres (2002). “Prolonged exposure of chromatin cells to nitric

oxide down-regulates the activity of soluble guanylyl cyclase and corresponding

mRNA and protein levels.” *BMC Biochemistry* 3(26).

Filippov, G., D. B. Bloch and K. D. Bloch (1997). “Nitric oxide decreases stability of

mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery

smooth muscle cells.” *J Clin Invest* 100(4): 942-8.

Förstermann, U. and H. Kleinert (1995). “Nitric oxide synthase:expression and

expressional control of the three isoforms.” *Naunyn Schmiedebergs Arch*

Pharmacol 356: 351-364.

Friebe, A. and D. Koesling (1998). “Mechanism of YC-1-induced activation of soluble

guanylyl cyclase.” *Mol Pharmacol* 53(1): 123-7.

Friebe, A., F. Mullershausen, A. Smolenski, U. Walter, G. Schultz and D. Koesling

(1998). “YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP

- effects in human platelets." *Mol Pharmacol* 54(6): 962-7.
- Friebe, A., G. Schultz and D. Koesling (1996). "Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme." *Embo J* 15(24): 6863-8.
- Friebe, A., B. Wedel, C. Harteneck, J. Foerster, G. Schultz and D. Koesling (1997). "Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase." *Biochemistry* 36(6): 1194-8.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 288: 373-376.
- Galle, J., U. Zabel, U. Hubner, A. Hatzelmann, Wagner, B., , C. Wanner and S. HH (1999). "Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity." *Br J Pharmacol* 127: 195-203.
- Garbers, D. L. (1990). "Guanylate cyclase receptor family." *Recent Prog Horm Res* 46: 85-96.
- Garthwaite, J., E. Southam, C. L. Boulton, E. B. Nielsen, K. Schmidt and B. Mayer (1995). "Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one." *Mol Pharmacol* 48(2): 184-8.
- Gerzer, R., E. Böhme, F. Hofmann and G. Schultz (1981). "Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper." *FEBS Lett* 132: 71-74.
- Giulii, G., U. Scholl, F. Bulle and G. Guellaën (1992). "Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain." *FEBS Lett* 304: 83-88.
- Goldberg, N. D., R. F. O'Dea and M. K. Haddox (1973). "Cyclic GMP." *Adv Cycl Nucl Res* 3: 155-223.
- Harteneck, C., D. Koesling, A. Soling, G. Schultz and E. Bohme (1990). "Expression

- of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits.”
FEBS Lett 272(1-2): 221-3.
- Harteneck, C., B. Wedel, D. Koesling, J. Malkewitz, E. Bohme and G. Schultz (1991).
“Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl
cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme.” FEBS Lett
292(1-2): 217-22.
- Hecker, M., M. Cattaruzza and A. H. Wagner (1999). “Regulation of inducible nitric
oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells.” *Gen
Pharmacol* 32: 9-16.
- Hevel, J. M., K. A. White and M. A. Marletta (1991). “Purification of the inducible
murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein.” *J Biol
Chem* 266: 22789- 22791.
- Hibbs, J. B. J., R. R. Taintor, Z. Vavrin and E. M. Rachlin (1988). “Nitric oxide: a
cytotoxic activated macrophage effector molecule.” *Biochem Biophys Res
Commun* 157: 87-94.
- Hoenicka, M., E. M. Becker, H. Apeler, T. Sirichoke, H. Schroder, R. Gerzer and J. P.
Stasch (1999). “Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9
system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide.” *J Mol Med*
77(1): 14-23.
- Hoeper, M. M., H. Olschewski, H. A. Ghofrani, H. Wilkens, J. Winkler, M. M. Borst, J.
Niedermeyer, H. Fabel and W. Seeger (2000). “A comparison of the acute
hemodynamic effects of inhaled nitric oxide and aerosolized iloprost in primary
pulmonary hypertension. German PPH study group.” *35(1): 176-182.*
- Hofmann, F., A. Ammendola and J. Schlossmann (2000). “Rising behind NO: cGMP-

- dependent protein kinases." *J Cell Sci* 113 (Pt 10): 1671-6.
- Humbert, P., F. Niroomand, G. Fischer, B. Mayer, D. Koesling, K. D. Hinsch, H. Gausepohl, R. Frank, G. Schultz and E. Bohme (1990). "Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method." *Eur J Biochem* 190(2): 273-8.
- Hwang, T. L., C. C. Wu and C. M. Teng (1998). "Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea." *Br J Pharmacol* 125(6): 1158-63.
- Ibarra, C., H. Müller and H. H. H. W. Schmidt (2001). "NO down-regulates sGC expression in endothelial cells in a cGMP-independent manner." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl.* 363: R44.
- Ibarra, C., P. I. Nedvetsky, M. Gerlach, P. Riederer and H. H. H. W. Schmidt (2001). "Regional and age-dependent expression of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in the human brain." *Brain Res* 907(1-2): 54-60.
- Ignarro, L. J., J. B. Adams, P. M. Horwitz and K. S. Wood (1986). "Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO- heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms." *J Biol Chem* 261(11): 4997-5002.
- Ignarro, L. J., B. K. Barry, D. Y. Gruetter, J. C. Edwards, E. H. Ohlstein, C. A. Gruetter and W. H. Baricos (1980). "Guanylate cyclase activation of nitroprusside and nitrosoguanidine is related to formation of S-nitrosothiol intermediates." *Biochem Biophys Res Commun* 94(1): 93-100.
- Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga and K. S. Wood (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and

- chemical properties identical to those of nitric oxide radical." *Circ Res* 61(6): 866-79.
- Ignarro, L. J., J. N. Degnan, W. H. Baricos, P. J. Kadowitz and M. S. Wolin (1982). "Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung." *Biochim Biophys Acta* 718(1): 49-59.
- Ignarro, L. J. and C. A. Gruetter (1980). "Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols." *Biochim Biophys Acta* 631(2): 221-31.
- Ignarro, L. J., H. Lipton, J. C. Edwards, W. H. Baricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz and G. C.A. (1981). "Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates." *J. Pharmacol.Exp.Ther.* 218: 739-749.
- Ignarro, L. J., K. S. Wood and M. S. Wolin (1982). "Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX." *J. Biol. Chem.* 257(9): 2870-2873.
- Ignarro, L. J., K. S. Wood and M. S. Wolin (1984). "Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept." *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17: 267-74.
- Jacke, K., K. Witte and B. Lemmer (2001). "Mechanisms involved in the blunted nitric oxide-cGMP pathway in hypertensive TGR(mREN2)27 rats." *Eur J Pharmacol* 415(1): 27-30.
- Kamisaki, Y., S. Saheki, M. Nakane, J. A. Palmieri, T. Kuno, B. Y. Chang, S. A. Waldman and F. Murad (1986). "Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer." *J Biol Chem* 261(16): 7236-41.

- Kloss, S., A. Bouloumie and A. Mulsch (2000). "Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase." *Hypertension* 35(1 Pt 1): 43-7.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." *Biochem.J* 298: 249-258.
- Koesling, D. (1999). "Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase." *Methods* 19(4): 485-93.
- Koesling, D., C. Harteneck, P. Humbert, A. Bosserhoff, R. Frank, G. Schultz and E. Bohme (1990). "The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme." *FEBS Lett* 266(1-2): 128-32.
- Koesling, D., J. Herz, H. Gausepohl, F. Niroomand, K. D. Hinsch, A. Mulsch, E. Bohme, G. Schultz and R. Frank (1988). "The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase." *FEBS Lett* 239(1): 29-34.
- Koglin, M., K. Vehse, L. Budaeus, H. Scholz and S. Behrends (2001). "Nitric Oxide Activates the beta 2 Subunit of Soluble Guanylyl Cyclase in the Absence of a Second Subunit." *J Biol Chem* 276(33): 30737-43.
- Lee, Y. C., E. Martin and F. Murad (2000). "Human recombinant soluble guanylyl cyclase: expression, purification, and regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10763-8.
- Li, D., N. Zhou and R. A. Johns (1999). "Soluble guanylate cyclase gene expression and localization in rat lung after exposure to hypoxia." *Am J Physiol* 277(4 Pt 1): L841-7.
- Luo, D., S. Das and S. R. Vincent (1995). "Effects of methylene blue and LY83583 on

- neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase." *Eur J Pharmacol* 290(3): 247-51.
- Luo, D. and S. R. Vincent (1994). "Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation in vivo." *Eur J Pharmacol* 267(3): 263-7.
- Marczin, N., U. S. Ryan and J. D. Catravas (1992). "Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion." *J Pharmacol Exp Ther* 263(1): 170-9.
- Mayer, B., F. Brunner and K. Schmidt (1993). "Novel actions of methylene blue." *Eur Heart J* 14 Suppl I: 22-6.
- Mayer, B., A. Schrammel, P. Klatt, D. Koesling and K. Schmidt (1995). "Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation." *J Biol Chem* 270(29): 17355-60.
- McDonald, L. J. and F. Murad (1995). "Nitric oxide and cGMP signaling." *Adv Pharmacol* 34: 263-75.
- Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1988). "The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator." *Hypertension* 12(4): 365-72.
- Moro, M. A., R. J. Russel, S. Cellek, I. Lizasoain, Y. Su, V. M. Darley-USmar, M. W. Radomski and S. Moncada (1996). "cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4): 1480-5.
- Mullershausen, F., M. Russwurm, A. Friebe and D. Koesling (2004). "Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl

- cyclase BAY 41-2272." 109(14): 1711-1713.
- Mulsch, A., J. Bauersachs, A. Schafer, J. P. Stasch, R. Kast and R. Busse (1997). "Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators." *Br J Pharmacol* 120(4): 681-9.
- Mulsch, A., R. Busse and E. Bassenge (1988). "Desensitization of guanylate cyclase in nitrate tolerance does not impair endothelium-dependent responses." *Eur J Pharmacol* 158(3): 191-8.
- Nakane, M., S. Saheki, T. Kuno, K. Ishii and F. Murad (1988). "Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung." *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1139-1147.
- Ndisang, J. F. and R. Wang (2003). "Age-related alterations in soluble guanylyl cyclase and cGMP pathway in spontaneously hypertensive rats." *J. Hypertension* 21: 1117-1124.
- Nedvetsky, P. I., C. Kleinschnitz and H. H. W. Schmidt (2002). "Regional distribution of protein and activity of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in rat brain suggests multiple mechanisms of regulation." *Brain Res* 950: 148-154.
- Nedvetsky, P. I., T. Y. Nedvetskaya, H. Müller, P. Schmidt, J. P. Stasch and H. H. W. Schmidt (2003). "Redox-dependent regulation of sGC protein and activity." *BMC Meeting Abstracts: 1st international Conference on NO/sGC Interaction and Therapeutic Implications* 1: 27.
- Niroomand, F., R. Rossle, A. Mulsch and E. Bohme (1989). "Under anaerobic conditions, soluble guanylate cyclase is specifically stimulated by glutathione." *Biochem Biophys Res Commun* 161(1): 75-80.

- Ohlstein, E. H., K. S. Wood and L. J. Ignarro (1982). "Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX." *Arch Biochem Biophys* 218(1): 187-98.
- Olesen, S. P., J. Drejer, O. Axelsson, P. Moldt, L. Bang, J. E. Nielsen-Kudsk, R. Busse and A. Mulsch (1998). "Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase." *Br J Pharmacol* 123(2): 299-309.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* 327(6122): 524-6.
- Papapetropoulos, A., G. Abou-Mohamed, N. Marczin, F. Murad, R. W. Caldwell and J. D. Catravas (1996a). "Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta." *Br J Pharmacol* 118(6): 1359-66.
- Papapetropoulos, A., C. Y. Go, F. Murad and J. D. Catravas (1996b). "Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* 117(1): 147-55.
- Papapetropoulos, A., N. Marczin, M. D. Snead, C. Cheng, A. Milici and J. D. Catravas (1994). "Smooth muscle cell responsiveness to nitrovasodilators in hypertensive and normotensive rats." *Hypertension* 23(4): 476-84.
- Pedraza, C. E., M. A. Baltrons, M. T. Heneka and A. Garcia (2003). "Interleukin-1b and lipopolysaccharide decrease soluble guanylyl cyclase in brain cells: NO-independent destabilization of protein and NO-dependent decrease of mRNA." *J. Neuroimmunol.* 144: 80-90.

- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." *Anal. Biochem* 83: 346-356.
- Rothermund, L., A. Friebe, M. Paul, D. Koesling and R. Kreutz (2000). "Acute blood pressure effects of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase in normotensive and hypertensive rats." *Br J Pharmacol* 130: 205-208.
- Rothwell, N. J. and G. N. Luheshi (2000). "Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target." *Trends Neurosci.* 23: 618-625.
- Ruetten, H., U. Zabel, W. Linz and H. H. Schmidt (1999). "Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats." *Circ Res* 85(6): 534-41.
- Russwurm, M., S. Behrends, C. Harteneck and D. Koesling (1998). "Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase." *Biochem J* 335(Pt 1): 125-30.
- Russwurm, M., K. Reimers, N. Wittau and D. Koesling (2001). "Guanylyl cyclase/ PSD-95 interaction: membrane-association of the alpha2/beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl.* 363(4): 162.
- Schelvis, J. P., Y. Zhao, M. A. Marletta and G. T. Babcock (1998). "Resonance raman characterization of the heme domain of soluble guanylate cyclase." *Biochemistry* 37(46): 16289-97.
- Schindler, U., H. Strobel, K. Schönafinger, H. Rütten, W. Linz, M. Just, S. Schäfer, P. Schindler, A. E. Busch and A. Mülsch (2003). "Pharmacology and biochemistry of novel compound activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase." *BMC Meeting Abstracts: 1st international Conference on NO/sGC Interaction and its*

Therapeutic Implications 1: op038.

Schmidt, H. H. H. W., G. D. Gagne, M. Nakane, J. S. Pollock, M. F. Miller and F.

Murad (1992). "Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction." *J Histochem Cytochem* 40(10): 1439-56.

Schrammel, A., S. Behrends, K. Schmidt, D. Koesling and B. Mayer (1996).

"Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." *Mol Pharmacol* 50(1): 1-5.

Serfass, L. and J. N. Burstyn (1998). "Effect of heme oxygenase inhibitors on soluble guanylyl cyclase activity." *Arch Biochem Biophys* 359(1): 8-16.

Severina, I. S., O. G. Bussygina and N. V. Pyatakova (2000). "Carnosine as a regulator of soluble guanylat cyclase." *Biochemistry (Moscow)* 65(7): 921-927.

Sharma, V. S. and D. Magde (1999). "Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: a mechanistic model." *Methods* 19(4): 494-505.

Sidhu, J., S., and C. J. Omiecinski (1998). "Protein Synthesis Inhibitors Exhibit a Nonspecific Effect on Phenobarbital-inducible Cytochrome P450 Gene Expression in Primary Rat Hepatocytes." *J. Biol. Chem.* 273(8): 4769-4775.

Sogo, N., C. Campanella, D. J. Webb and I. L. Megson (2000). "S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery." *131(6): 1236-1244.*

Stamler, J. S., D. I. Simon, J. A. Osborne, M. E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D. J.

Singel and J. Loscalzo (1992). "S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds." *Proc Natl Acad*

Sci U S A 89(1): 444-8.

Stasch, J. P., E. M. Becker, C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowski, A. Feurer, R.

Gerzer, T. Minuth, E. Perzborn, U. Pleiß, H. Schröder, W. Schroeder, E. Stahl, W.

Steinke, A. Straub and M. Schramm (2001). "NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase." *Nature* 410: 212-215.

Stasch, J. P., P. Schmidt, C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowski, M. Haerter, M.

Heil, Minuth T., E. Perzborn, U. Pleiss, M. Schramm, W. Schröder, E. Stahl, W.

Steinke and F. Wunder (2002). "NO- and haem-independent activator of soluble guanylyl cyclase : molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle." *Br J Pharmacol* 136: 773-783.

Stone, J. R. and M. A. Marletta (1994). "Soluble guanylate cyclase from bovine lung:

activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states." *Biochemistry* 33(18): 5636-40.

Stone, J. R. and M. A. Marletta (1995). "The ferrous heme of soluble guanylate

cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane." *Biochemistry* 34(50): 16397-403.

Stone, J. R. and M. A. Marletta (1998). "Synergistic activation of soluble guanylate

cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide." *Chem Biol* 5(5): 255-61.

Sutherland, E. W. and T. W. Rall (1957). "The properties of an adenine ribonucleotide

produced with cellular particles, ATP, Mg²⁺, and epinephrine or glucagon." *J Am Chem Soc* 79: 3608-3611.

Takata, M., G. Filippov, H. Liu, F. Ichinose, S. Janssens, D. B. Bloch and K. D. Bloch

(2001). "Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via

- NO- dependent and NO-independent mechanisms." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(2): L272-8.
- Theilig, F., M. Bostanjoglo, H. Pavenstadt, C. Grupp, G. Holland, I. Slosarek, A. M. Gressner, M. Russwurm, D. Koesling and S. Bachmann (2001). "Cellular distribution and function of soluble guanylyl cyclase in rat kidney and liver." *J Am Soc Nephrol* 12(11): 2209-20.
- Ujiiie, K., L. Hogarth, R. Danziger, J. G. Drewett, P. S. Yuen, I. H. Pang and R. A. Star (1994). "Homologous and heterologous desensitization of a guanylyl cyclase-linked nitric oxide receptor in cultured rat medullary interstitial cells." *J Pharmacol Exp Ther* 270(2): 761-7.
- Vladimirov, Y. A. (1996). *Proc.Int.Symp.Natural Antioxidants. Molecular mechanisms and Health Effects*. AOCS Press.Champaign, Illinois: 125-144.
- Weber, M., N. Lauer, A. Mülsch and K. G. (2001). "The effect of peroxynitrit on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase." *Free Radical Biology and Medicine* 31(11): 1360-1367.
- Wedel, B., C. Harteneck, J. Foerster, A. Friebe, G. Schultz and D. Koesling (1995). "Functional domains of soluble guanylyl cyclase." *J Biol Chem* 270(42): 24871-5.
- Wedel, B., P. Humbert, C. Harteneck, J. Foerster, J. Malkewitz, E. Bohme, G. Schultz and D. Koesling (1994). "Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide- insensitive form of soluble guanylyl cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2592-6.
- Wolin, M. S., K. S. Wood and L. J. Ignarro (1982). "Guanylate cyclase from bovine lung." *J Biol Chem* 257: 13312-13320.
- Wu, C. C., F. N. Ko, S. C. Kuo, F. Y. Lee and C. M. Teng (1995). "YC-1 inhibited

- human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase." *Br J Pharmacol* 116: 1973-1978.
- Wu, X. B., B. Brune, F. von Appen and V. Ullrich (1992). "Reversible activation of soluble guanylate cyclase by oxidizing agents." *Arch Biochem Biophys* 294(1): 75-82.
- Yuen, P. S., L. R. Potter and D. L. Garbers (1990). "A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney." *Biochemistry* 29(49): 10872-8.
- Zabel, U., C. Hausler, M. Weeger and H. H. H. W. Schmidt (1999). "Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag." *J Biol Chem* 274(26): 18149-52.
- Zabel, U., M. Weeger, M. La and H. H. H. W. Schmidt (1998). "Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family." *Biochem J* 335(Pt 1): 51-7.
- Ziche, M., L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H. J. Granger, C. A. Maggi, P. Geppetti and F. Ledda (1994). "Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P." 94

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis Mai 2005 am Rudolf-Buchheim Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Giessen angefertigt.

An erster Stelle möchte ich der Leitung des Rudolf-Buchheim Institut für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Gelegenheit am Pharmakologischen Institut diese Dissertation anfertigen zu dürfen, danken.

Herrn Prof. Alfred Pingoud möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Klaus Preissner möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und sorgfältiges Durchlesen des Manuskripts und hilfreiche Kommentare herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Pavel Nedvetsky, meinen Ehemann, für die ausgezeichnete Betreuung, für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, für mühevollen Stunden beim Durchlesen und für die ständige Motivierung und die moralische Unterstützung.

Für die hilfreiche hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen und für die Geduld und die große Hilfsbereitschaft bei allen labortechnischen Fragestellungen möchte ich mich bei Herrn Helmut Müller und Frau Petra Kronich herzlich bedanken.

Herrn Dr. Detlef Thönges möchte ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und für seine Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Dr. Stasch und Dr. Peter Schmidt von der Bayer AG danke ich für die Überlassung der Substanz BAY58-2667, für die Durchführung der Versuche mit SHR Tieren und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Ashraf Taye danke ich für die Durchführung der Organbad-Versuche.

Herrn Dr. A. Sickmann danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-MS.

Frau Dr. Claudia Rutz danke ich für ihre Hilfe beim Durchlesen und Korrigieren des Manuskripts.

Alle Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe möchte ich sehr herzlich für die tolle Zusammenarbeit, ständige Hilfsbereitschaft und ihre Freundschaft danken.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des ganzen Rudolf-Buchheim-Instituts gilt mein Dank für das freundschaftliche Arbeitsklima, das mir ein optimales

und motiviertes Arbeiten ermöglichte.

Außerdem möchte ich mich bei dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und dem SFB/547/C10 für Ihre finanzielle Unterstützung meiner Tätigkeit in Deutschland bedanken.

Als letztes möchte ich herzlich meiner ganzen Familie danken, die mich über die gesamte Zeit unterstützt und motiviert hat.

LEBENS LAUF

TATIANA Y. NEDVETSKAYA (geb. NEWEROWITCH)

GEBOREN: Januar 7, 1975, Minsk, Belarus (Weißrussland)

FAMILIENZUSTAND: verheiratet

KINDER Tochter Alesia

PRIVAT ADRESSE: Bornholmer Str. 72A
10439 Berlin
Tel: 030-44674696
E-mail: ned.tatiana@web.de

AUSBILDUNG:

1982-1992 Schulausbildung in der Schule Nr.155, Minsk; Abitur

1992-1997 Studium an der biologischen Fakultät der Weißrussischen
Staatsuniversität, Lehrstuhl für Biochemie.

ABSCHLÜSSE:

1997 Diplom der Biologie

ARBEIT:

1997–1998 als Biochemikerin im pharmazeutischen Betrieb „Dialek“, Minsk,
Belarus tätig

1998–2000 als Chemikerin im Forschungszentrum des Pharmazeutischen
Betriebs „Belmedpreparaty“ Minsk, Belarus tätig

2000-2002 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Forschungsinstitut der
Fischzuchtindustrie der Akademie der Agrarwissenschaft Belarus

STIPENDIUM:

2001-2002 Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes
(DAAD) am Rudolf-Buchheim-Institut, Justus-Liebig Universität
Giessen (Betreuer Prof. Dr. Harald H.H.W. Schmidt)

2002-2004 Stipendiatin am Rudolf-Buchheim-Institut, Justus-Liebig
Universität Giessen (Betreuer Prof. Dr. Harald H.H.W. Schmidt)

PUBLIKATIONSLISTE

Experimentale Arbeiten:

1. Stasch J-P., Nedvetsky P.I., Schmidt P.M., Kumar A., **Nedvetskaya T.Y.**, Deile M., Taye A., Müller H., Rothkegel C., Schmidt H.H.W. „Targeting heme-oxidized soluble guanylyl cyclase for selective vasodilation of diseased blood vessels“. *In Revision.*

2. **Nedvetskaya T.Y.**, Nedvetsky P.I., Müller H., Sickmann A., Schmidt P.M., Stasch J-P., Schmidt H.H.W. “Formation of SDS-resistant heterodimers of soluble guanylyl cyclase by heme-oxidizing enzyme inhibitors“. *Manuskript in Vorbereitung.*

Reviews:

Karpovitsch A.V., **Nedvetskaya T.Y.**, Fridberg M.E., Aksenevitsch M.N., Bosenko A.M., Petrov P.T., und Zarenkov V.M. (1999). „Enzymatische Nahrungsergänzungen fürs Fütterindustrie, - *Nachrichten der weißrussischen Ingenieurakademie.*“, 2 (8), S. 23-27.

Abstrakts:

1. Tönges D., Ibarra C., **Nedvetskaya T.Y.**, Freeman B., Schmidt H. (2002). „Identification of lactate dehydrogenase as a nitrotyrosine-immunopositive, but tryptophan-nitrated 38 kDa protein in rat and porcine heart.“ *Free Radical Biology and Medicine.* Volume 33 (2002) USA

2. Nedvetsky P.I., **Nedvetskaya T.Y.**, Müller H., Schmidt P., Stasch J.-P., Schmidt H. (2003) „Redox-dependent regulation of sGC protein and activity.“ *BMC Meeting Abstracts: 1st international Conference on NO/sGC Interaction and ist Therapeutic Implications* Leipzig 2003, 1:op027

3. **Nedvetskaya T.Y.**, Nedvetsky P.I., Müller H., Sickmann A., Schmidt P., Stasch J-P., Schmidt H.H.W. “Characterisation of an SDS-resistant heterodimer of soluble guanylyl cyclase“. *1st Joint french-German NO Meeting* 2003, Strasbourg, France

4. Nedvetsky P.I., Schmidt P.M., **Nedvetskaya T.Y.**, Taye A., Müller H., Stasch J-P., Schmidt H.H.W. “ Role of the heme binding site of soluble guanylyl cyclase and protoporphyrin agonists in the regulation of enzyme stability“. *1st Joint french-German NO Meeting* 2003, Strasbourg, France

5. **Nedvetskaya T.Y.**, Nedvetsky P.I., Müller H., Sickmann A., Schmidt P., Stasch J-P., Schmidt H.H.W. “Inhibition of soluble guanylyl cyclase by ODQ results in SDS-resistant heterodimers“. *45. Frühjahrtagung der DGPT Mainz* 2004

6. **Nedvetskaya T.Y.**, Nedvetsky P.I., Sonar S.S., Müller H., Sickmann A., Schmidt P.M., Kronich P., Stasch J-P., Schmidt H.H.W. (2005) "Formation of quasi-covalent sGC α_1/β_1 -heterodimers by ODQ-induced oxidation of the prosthetic heme moiety". *BMC Pharmacology*, **5**(Suppl. 1): P40.