
**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen
zur NO-unabhängigen Aktivierung der
löslichen Guanylatcyclase**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Peter Schmidt

geboren am 22. Juli 1972 in Nordenham

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Henning Schröder
2. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Schramm
3. PD. Dr. rer. nat. Johannes-Peter Stasch

Halle (Saale), 3. Dezember 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005916

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005916>]

Meinen Eltern

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Historische Perspektive	7
1.2 Guanylatcyclasen	8
1.2.1 Membranständige Guanylatcyclasen	9
1.2.2 Lösliche Guanylatcyclasen	10
1.3 Aktivatoren und Inhibitoren der sGC	12
1.3.1 Stickstoffmonoxid	12
1.3.2 Kohlenstoffmonoxid	12
1.3.3 Protoporphyrin IX	13
1.3.4 NO-unabhängige, aber Häm-abhängige sGC-Stimulatoren	13
1.3.5 NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren	14
1.3.6 Zink- und Mangan-Porphyrin	15
1.3.7 ODQ	15
1.4 cGMP-Effektorsysteme	16
1.4.1 Phosphodiesterasen	16
1.4.2 cGMP-abhängige Proteinkinasen	16
1.4.3 cGMP-gesteuerte Ionenkanäle	17
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	20
2.1 Verwendete Substanzen	20
2.2 Geräte	22
2.3 Materialien und Chemikalien	23
2.4 Lösungen und Medien	25
2.5 Molekularbiologische Methoden	32
2.6 Proteinbiochemische Methoden	38
2.7 Zellkultur	53
3. Ergebnisse	54
3.1 UV/Vis-Spektroskopische Untersuchungen	54
3.1.1 Interaktion von BAY 41-8543 bzw. BAY 58-2667 mit dem zentralen Hämeisen der sGC	54
3.1.2 Konkurrenz zwischen BAY 58-2667 und der Hämgruppe der sGC	55
3.2 sGC-Aktivierung durch NO, BAY 41-8543 und BAY 58-2667	56
3.2.1 Aktivitätsprofile von BAY 41-8543 und BAY 58-2667	56
3.2.2 Kinetische Parameter der BAY 41-8543 und BAY 58-2667 aktivierten sGC	58
3.2.3 Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes	60

3.3 Rezeptorbindungsstudien an der gereinigten sGC	62
3.3.1 Etablierung eines sGC-Radiorezeptorassays	62
3.3.2 Bindungskonstante K_D für BAY 58-2667	63
3.3.3 Homologe und heterologe Verdrängungsuntersuchungen	64
3.4 Photoaffinitätslabel-Untersuchungen an der gereinigten sGC	66
3.4.1 Charakterisierung des Photoaffinitätslabels BAY 61-2573	66
3.4.2 Photoaffinitätslabeling der sGC (SDS-PAGE)	67
3.4.3 Identifizierung der Bindungsstelle des Photoaffinitätslabels (2D-PAGE)	68
3.4.4 Enzymatische Spaltung der gelabelten sGC	70
3.5 Expression des N-terminalen Fragments der β-Untereinheit der sGC	72
3.6 Untersuchungen zur Häm-ODQ Wechselwirkung	73
3.6.1 Entfernung bzw. Rekonstitution des prosthetischen Häms der sGC	73
3.6.2 Vergleich der ODQ-Wirkung an hämhaltiger und hämfreier sGC	74
3.6.3 Einfluss der Häm-Oxidation auf die Bindung von BAY 58-2667	77
3.7 Charakterisierung der Hämbindungsstelle der sGC	77
3.7.1 Identifizierung von an der Hämbindung beteiligter Aminosäuren	77
3.7.2 Konstruktion und Screening der sGC-Mutanten	79
3.7.3 PPIX-Rekonstitution an exprimierten $\beta Y_{135}F$ - und $\beta R_{139}L$ -Mutanten	84
3.7.4 Aktivierung der nativen und oxidierten sGC durch hohe Konzentrationen BAY 58-2667	85
4. Diskussion	86
4.1 UV/Vis-Spektroskopie	86
4.2 Aktivierung der isolierten sGC durch BAY 41-8543 und BAY 58-2667	87
4.3 Rezeptorbindungsstudien mit BAY 58-2667	89
4.4 Photoaffinitätslabeling der sGC	90
4.5 Expression des N-terminalen Fragments der sGC β -Untereinheit	93
4.6 Wechselwirkung zwischen ODQ, Häm und BAY 58-2667 an der sGC	93
4.7 Identifizierung der Hämbindungsstelle	95
4.8 Neues Modell der sGC-Aktivierung	102
5. Zusammenfassung	104
6. Literatur	107
7. Eigene Publikationen	114
Anhang	116
Danksagung	117

Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase
ACN	Acetonitril
ANP, BNP, CNP	Natriuretische Peptide
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BIS-TRIS	Bis[2-hydroxyethyl]iminotris[hydroxymethyl]-methan
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO-Zelle	Chinesische Hamster Ovarien Zelle
Ci	Curie
cpm	Zählereignisse pro Minute
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EDRF	Endothelialer relaxierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FCS	Fötales Kälberserum
GC	Guanylatcyclase(n)
GTP	Guanosintriphosphat
HO	Hämoxigenase
HRP	Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IEF	Isoelektrofokussierung
IgG	Immunglobulin G

Abkürzungen

iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IPTG	Isopropylthiogalactosid
MnPP	Mangan-Protoporphyrin IX
MTP	Mikrotiterplatte
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDE	Phosphodiesterase
pGC	Membrangebundene (partikuläre) Guanylatcyclase(n)
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIX	Protoporphyrin IX
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
sGC	Lösliche Guanylatcyclase(n)
TCA	Trichloressigsäure
TEA-HCl	Triethanolaminhydrochlorid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween	Polyoxyethylensorbidanmonolaurat
U	Enzymeinheit
ZnPP	Zink-Protoporphyrin IX

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind in den westlichen Industrienationen nach wie vor die häufigste Todesursache. Eines der ältesten Herz-Kreislauf-Präparate, das seit fast 130 Jahren angewandte Nitroglycerin, gehört zur Wirkstoffklasse der organischen Nitrate. Diese Substanzen setzen nach enzymatischer Konversion das Gas Stickstoffmonoxid (NO) frei. NO führt über die Aktivierung seines Zielenzym, der löslichen Guanylatcyclase (sGC), zur Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), das letztendlich zu der erwünschten Gefäßerweiterung führt. Für die Aufklärung dieses Signalweges und dessen essenzieller Bedeutung für das Herz-Kreislauf-System wurde den drei US-Amerikanern Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis Ignarro 1998 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen. Trotz der positiven Effekte des „Kardiovaskulären Sprengstoffs“ Nitroglycerin blieben einige unerwünschte Eigenschaften der organischen Nitrate bestehen. Dazu zählen in erster Linie der Nitratkopfschmerz sowie die schnelle Toleranzentwicklung nach wiederholter Gabe. Trotz dieser Nachteile sind die organischen Nitrate, aufgrund ihres vorteilhaften hämodynamischen Profils, nach wie vor wichtige Pharmaka zur symptomatischen Behandlung der Angina pectoris bzw. der koronaren Herzkrankheit. Mit der Entdeckung des NO-unabhängigen sGC-Aktivators BAY 58-2667 konnte erstmalig ein Vertreter einer neuen Wirkstoffklasse identifiziert werden, die ein den organischen Nitraten vergleichbares hämodynamisches Profil zeigt. Darüber hinaus führte die Substanz, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zu einer Thrombozytenaggregationshemmung und induzierte auch nach wiederholter Gabe keine Toleranz. Damit besitzt dieses Wirkprinzip das Potential, die seit 130 Jahren etablierte Nitrattherapie zu ergänzen. In der hier vorliegenden Arbeit sollte der genaue Wirkmechanismus dieser Wirkstoffklasse an der sGC geklärt werden, um zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise dieses neuen potenziellen Pharmakons zu kommen.

1.1 Historische Perspektive

Die Geschichte der cyclischen Nukleotide, des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) sowie des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP), begann 1958 mit der Entdeckung des cAMP durch Rall und Sutherland. Nach der anfänglichen Beschreibung der Wirkung des cAMP wurde nach weiteren cyclischen Nukleotiden gesucht, und schließlich konnte 1963 das cGMP erst in Rattenurin (Ashman *et al.*, 1963) und später in fast allen Geweben nachgewiesen werden (Goldberg *et al.*, 1969). Die für die Cyclisierung des GTP zu cGMP verantwortlichen Enzyme, die Guanylatcyclasen (GC), konnten in den

folgenden Jahren identifiziert werden. Nach ihrer Verteilung in aufgetrennten Gewebefractionen, wurden die GC in zwei Klassen eingeteilt, die partikulären membranständigen sowie die cytosolischen löslichen Guanylatcyclasen (Hardman und Sutherland, 1969; White *et al.*, 1969; Schultz *et al.*, 1969; Ishikawa *et al.*, 1969). Im Jahre 1977 konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid (NO) bzw. organische Nitrate, wie z.B. Nitroglycerin, zu einer Aktivierung der sGC führten (Katsuki *et al.*, 1977; Arnold *et al.*, 1977; Schultz *et al.*, 1977). Da zu dieser Zeit jedoch kein physiologischer Mechanismus bekannt war, über den das bis dahin nur als Umweltgift bekannte NO gebildet werden konnte, blieben diese Befunde lange Zeit unbeachtet. 1980 konnten Furchgott und Mitarbeiter nachweisen, dass das Endothel der Blutgefäße fähig war, eine Substanz freizusetzen, welche zu einer Relaxation der Gefäße führte und daraufhin „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) genannt wurde (Furchgott *et al.*, 1980). Sechs Jahre später stellten schließlich Furchgott und Ignarro unabhängig voneinander die Hypothese auf, dass es sich bei dem EDRF um NO handelte, eine Theorie, die ein Jahr später ihre Bestätigung fand (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Parallel zu dieser Entwicklung konnte von Tannenbaum und Mitarbeitern erstmalig die Produktion von Nitrat in immunstimulierten Makrophagen nachgewiesen werden (Wagner *et al.*, 1983; Green *et al.*, 1981). Diese Befunde führten schließlich zur Entdeckung einer Klasse von NO produzierenden Enzymen, den NO-Synthasen (NOS), womit die letzte fehlende Komponente des NO-sGC-cGMP Signalweges identifiziert war (Marletta *et al.*, 1988; Hevel *et al.*, 1991). Von den NO-Synthasen konnten mittlerweile vier Isoformen identifiziert werden. Die neuronale NOS (nNOS, NOS I), die für die Signalübertragung nitrinergischer Neurone sowie für die Modulation neuronaler Signalübertragung verantwortlich ist, die induzierbare NOS (iNOS, NOS II), welche vor allem in der Immunantwort eine Rolle spielt und die endotheliale NOS (eNOS, NOS III), die für die oben beschriebene endothelabhängige Relaxation verantwortlich ist. Darüber hinaus wurde kürzlich eine mitochondriale NO-Synthase identifiziert (mtNOS), der ein Einfluss auf die Biogenese der Mitochondrien zugeschrieben wird (Ghafourifar und Richter, 1997; Elfering *et al.*, 2002; Nisoli *et al.*, 2003).

1.2 Guanylatcyclasen

Die Guanylatcyclasen bilden zusammen mit den Adenylatcyclasen (AC) die Familie der Nukleotidcyclasen, welche die Umwandlung ihres jeweiligen Substrats ATP bzw. GTP zum entsprechenden cyclisierten Nukleotid cAMP und cGMP katalysieren (Tesmer *et al.*, 1998). Allen Nukleotidcyclasen gemein ist eine stark konservierte katalytische Domäne, welche sich aus zwei identischen bzw. stark homologen in Kopf-Schwanz-Formation gegenüberliegenden Untereinheiten

zusammensetzt (Tesmer *et al.*, 1997; Denninger und Marletta, 1999). Die Bildung einer katalytischen Domäne aus zwei Untereinheiten scheint ein Merkmal aller Nukleotidcyclasen zu sein und deutet auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hin. Die Homologie der katalytischen Domänen ist so hoch, dass durch den Austausch von drei Aminosäuren die Substratspezifität zwischen ATP und GTP ausgetauscht werden kann (Sunahara *et al.*, 1998). Beide katalytischen Untereinheiten können, wie im Fall der AC, in einem Protein vorliegen (C_1 und C_2), welches damit bereits als Monomer katalytische Aktivität besitzt. Aufgrund dieses Aufbaus wird die AC auch als „Pseudo-Heterodimer“ bezeichnet (Denninger und Marletta, 1999). Im Gegensatz dazu besitzen die Monomere der GC nur eine der zwei erforderlichen katalytischen Untereinheiten. Aus der Familie der GC sind zwei Klassen bekannt, welche nach ihrer Lokalisation in der Zelle als membranständige (pGC) bzw. lösliche Guanylatcyclasen (sGC) bezeichnet werden (Zur Übersicht: Lucas *et al.*, 2000).

1.2.1 Membranständige Guanylatcyclasen

Die membranständigen Guanylatcyclasen (pGC) liegen in ihrer katalytisch aktiven Form als Homodimer bzw. Oligomer vor. Bisher konnten insgesamt sieben verschiedene pGC identifiziert werden (GC-A bis GC-G), von denen nur z.T. die Peptidliganden bekannt sind (Mehats *et al.*, 2002). Die pGC besitzen N-terminal eine extrazelluläre Domäne, welche für die Bindung des jeweiligen Liganden verantwortlich und zwischen den einzelnen pGC-Familien nur mäßig konserviert ist. Ihr folgt eine Transmembrandomäne, bestehend aus einer einzelnen hydrophoben α -Helix, welche für die Verankerung des Rezeptors in der Membran verantwortlich ist. Auf der cytoplasmatischen Seite folgt eine ca. 250 AS große sogenannte Kinase-Homologie-Domäne (KHD). Diese Domäne scheint in der Lage zu sein, ATP zu binden und durch andere Kinasen phosphoryliert zu werden, wodurch die KHD die Aktivität der pGC moduliert (Lucas *et al.*, 2000). Zwischen der KHD und der katalytischen Domäne liegt noch eine kurze, als „Hinge“-Region bezeichnete Sequenz, welche die Struktur einer amphipatischen α -Helix besitzt und an der Dimerisierung der pGC beteiligt zu sein scheint. Am C-terminalen Ende des Proteins liegt die eigentliche Cyclasedomäne, welche die Cyclisierung des GTP zu cGMP in einer Ein-Schritt-Austauschreaktion katalysiert. Die am besten charakterisierten pGC-Liganden sind die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP, welche an GC-A bzw. GC-B binden und dadurch Natriurese, eine Vasodilatation sowie eine Supprimierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems induzieren. Die GC-C, die hauptsächlich im Darmepithel exprimiert wird, ist über ihren Liganden Guanylin hauptsächlich an der Flüssigkeitsregulation im Darm beteiligt. Daneben wird vermutet, dass die GC-C eine antiproliferative Wirkung auf das Darmepithel besitzt (Pitari *et al.*, 2003). Für die Rezeptoren GC-D bis GC-G konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Liganden identifiziert werden. Neben der Synthese des cGMP, die

durch Nukleotide, Pyrophosphate, Ca^{2+} und assoziierte Proteine moduliert werden kann, scheinen pGC (analog zu den AC) auch in der Lage zu sein, G-Proteine zu aktivieren. Dieses Netz an Wechselwirkungen führt zu einer außerordentlichen Komplexität der auf die pGC folgenden Signalkaskaden (Zur Übersicht: Lucas *et al.*, 2000).

1.2.2 Lösliche Guanylatcyclasen

Die löslichen Guanylatcyclasen (sGC) liegen in ihrer katalytisch aktiven Form als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit vor. Insgesamt konnten vier sGC-Gene identifiziert werden (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) (Zur Übersicht: Hobbs, 2000; Friebe und Kösling, 2003), die in ihrem Molekulargewicht je nach Spezies und Isoform zwischen 73 und 82 kDa für die α - und 70 bis 76 kDa für die β -Untereinheit variieren. Dabei ist die α -Untereinheit generell größer als die β -Untereinheit. Beide α -Untereinheiten können mit der β_1 -Untereinheit zu funktionell nicht unterscheidbaren Isoformen der sGC dimerisieren, die beide im Gewebe nachgewiesen werden konnten (Harteneck *et al.*, 1990; Russwurm *et al.*, 1998). Für die Bildung eines funktionstüchtigen Heterodimers mit katalytischen Eigenschaften ist eine Co-Expression beider Untereinheiten zwingend erforderlich (Harteneck *et al.*, 1990). Die $\alpha_1\beta_1$ -sGC kommt ubiquitär vor, wird aber vor allem in Lunge, Gehirn und Thrombozyten stark exprimiert, während die $\alpha_2\beta_1$ -sGC hauptsächlich im Gehirn und der Plazenta gebildet wird (Mergia *et al.*, 2003). Die α_2 -Untereinheit zeigt im Gegensatz zu α_1 eine Konsensussequenz für eine Interaktion mit PDZ-Domänen (Hoffmüller *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die $\alpha_2\beta_1$ -sGC an synaptischen Membranen über diese Domäne an einem Komplex aus nNOS, NMDA-Kanal und PSD95 bindet und damit an der Modulation der synaptischer Übertragung beteiligt sein könnte (Russwurm *et al.*, 2001).

Die sGC besteht aus einer N-terminalen hämbindenden Domäne, einer Dimerisierungsdomäne und der C-terminalen katalytischen Cyclasedomäne (Zur Übersicht: Hobbs, 2000; Lucas *et al.*, 2000). Die katalytische Domäne zeigt eine große Homologie zu den entsprechenden Domänen der pGC und AC, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hindeutet. Die Dimerisierungsdomäne weist eine gewisse Homologie zu der „Hinge“-Region der pGC auf und besitzt vermutlich eine ähnliche Sekundärstruktur. Es konnte gezeigt werden, dass C-terminale Deletionsmutanten, welche diese Domäne beinhalten, zur Dimerisierung fähig waren (Zhao *et al.*, 1997). Die sGC besitzen im Gegensatz zu den pGC und AC eine prosthetische Hämgruppe, welche für die Aktivierung des Enzyms durch NO verantwortlich ist und zu einem charakteristischem Peak bei 431 nm im UV/Vis-Spektrum führt (Soret-Bande).

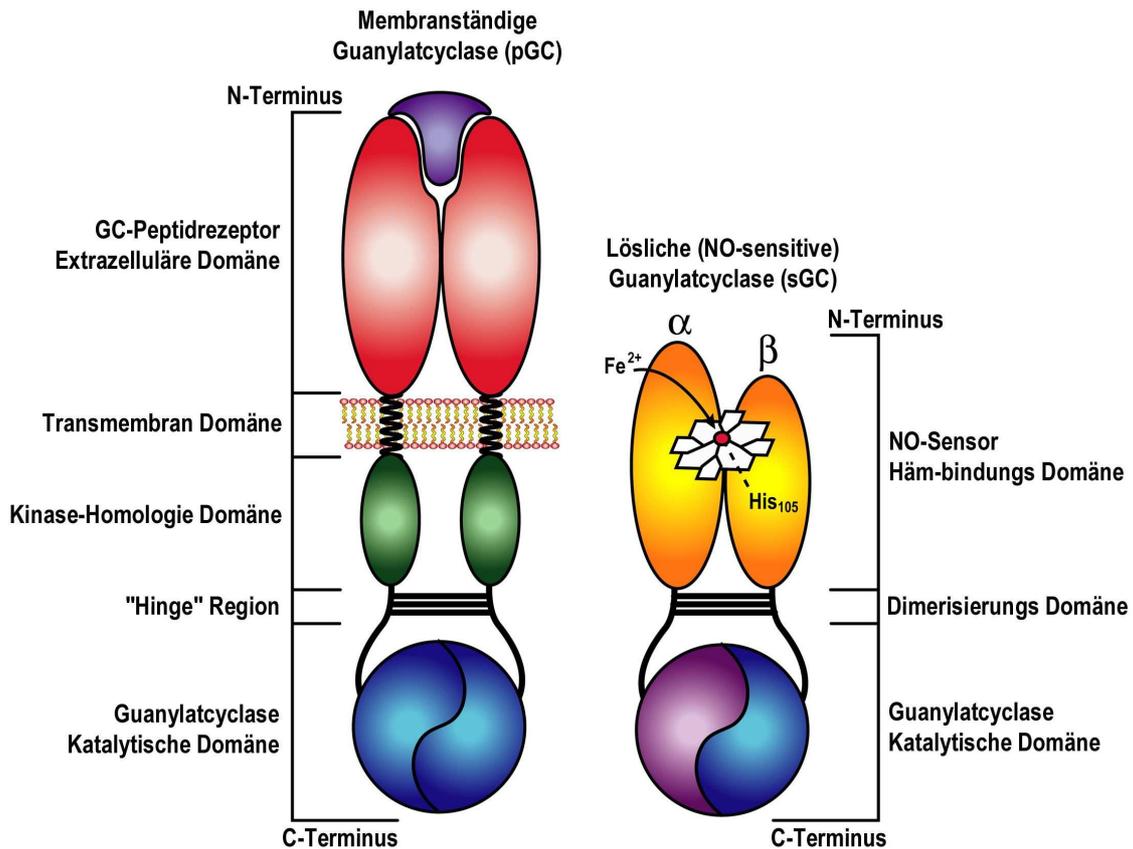


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der membranständigen und der löslichen Guanylatcyclyasen.

Die Sequenz dieser Domäne ist mit keinem anderen Hämbindungsmotiv vergleichbar, so dass keinerlei Modelle aufgrund von Strukturähnlichkeiten zu anderen Hämproteinen vorhergesagt werden können. Durch verschiedene spektroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Häm über das Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit am zentralen Eisenatom komplexiert ist und somit als pentakoordinierter Komplex vorliegt (Wedel *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1998). Ein Austausch dieser AS führte zur Expression hämfreier sGC (Wedel *et al.*, 1994; Förster *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2001). Dieses Enzym ließ sich zwar nachträglich mit Häm rekonstituieren, die NO-Aktivierbarkeit dieses Mutanten konnte jedoch nicht wieder hergestellt werden (Förster *et al.*, 1996). Später wurde gezeigt, dass ein ca. 200 AS langes N-terminales Fragment der β -Untereinheit das Häm mit den gleichen spektroskopischen Eigenschaften zu binden vermag wie das native Enzym (Schelvis *et al.*, 1998; Marletta *et al.*, 2003). Diese Befunde belegen, dass die N-terminale Domäne der β -Untereinheit ausreicht, um die Hämgruppe zu binden. Die α -Untereinheit scheint für die Bindung des Häms von untergeordneter Bedeutung zu sein, könnte jedoch an der Bindung der NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren beteiligt sein (Stasch *et al.*, 2001; Koglin *et al.*, 2003).

1.3 Aktivatoren und Inhibitoren der sGC

1.3.1 Stickstoffmonoxid

Der physiologische Aktivator der sGC ist das Stickstoffmonoxid (NO). Es wird im Organismus von insgesamt drei Isoformen der NO-Synthasen (nNOS, iNOS, eNOS) als Produkt der enzymatischen Konversion von L-Arginin zu Citrullin gebildet (Mayer und Andrew, 1998). Als Gas kann es leicht durch Membranen diffundieren und somit sowohl autokrin als auch parakrin wirken. Auch eine endokrine Wirkung über eine reversible Bindung an Hämoglobin wird zur Zeit diskutiert (Luchsinger *et al.*, 2003).

Der Mechanismus der sGC-Aktivierung durch NO ist bis heute nicht abschließend geklärt. Sicher ist jedoch, dass NO direkt am zentralen Eisenatom der prosthetischen Häm-Gruppe bindet, wodurch es schließlich zur Lösung der Bindung des Häms an das Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit der sGC kommt. Dieser Übergang vom pentakoordinierten Histidyl-Häm-Komplex zum ebenfalls pentakoordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex hat eine Verschiebung der Soret-Bande im UV/Vis-Spektrum von 431 nm zu 398 nm zur Folge. Während dieses Übergangs bildet sich ein kurzlebiger sechsbindiger Zustand, welcher jedoch nahezu keine aktivierenden Eigenschaften besitzt (Stone und Marletta, 1996; Zhao *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die Geschwindigkeit der Umwandlung dieses Intermediates zum fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex abhängig von der NO-Konzentration ist, was ein mechanistisches Modell mit einer zweiten NO-Bindungsstelle voraussetzt (Lawson *et al.*, 2003). Diese Hypothese ist momentan Gegenstand kontroverser Diskussionen (Zhao *et al.*, 1999; Bellamy *et al.*, 2002; Ballou *et al.*, 2002). Die letztendliche Ausbildung des Nitrosyl-Häm-Komplexes und das damit verbundene Lösen der Histidyl-Häm-Bindung führt zu der in der Literatur beschriebenen 200- bis 400-fachen Aktivierung der sGC (Humbert *et al.*, 1990; Stone und Marletta, 1996; Hönicka *et al.*, 1999).

1.3.2 Kohlenstoffmonoxid

Kohlenstoffmonoxid (CO) ist ebenfalls ein gasförmiger sGC-Aktivator, der das Enzym über die Bindung an der prosthetischen Hämgruppe aktiviert. Im Gegensatz zu NO führt die Bindung von CO jedoch nur zu einer maximalen sGC-Aktivierung um ca. Faktor fünf (Friebe *et al.*, 1996; Hönicka *et al.*, 1999; Denninger *et al.*, 2000). CO wird im Organismus durch den Abbau von Häm zu Billiverdin durch die Hämoxygenasen (HO-1, HO-2 und HO-3) freigesetzt (Zur Übersicht: Ryter *et al.*, 2002). Aufgrund der schwachen sGC-Aktivierung und in Ermangelung anderer bekannter Effektorsysteme für CO ist dessen physiologische Rolle jedoch noch ungeklärt. Nichtsdestotrotz gibt es einige Veröffentlichungen, die eine

physiologische Bedeutung von CO postulieren (Morita *et al.*, 1995; Bainbridge *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2003).

1.3.3 Protoporphyrin IX

Um die Rolle des zentralen Eisenatoms des Häms für die sGC-Aktivierung näher zu charakterisieren, wurden bereits frühzeitig Experimente zur sGC-Rekonstitution mit der eisenfreien Häm-Vorstufe Protoporphyrin IX (PPIX) durchgeführt (Ignarro *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1984). Aufgrund des Fehlens des zentralen Eisenatoms kann PPIX keine Bindung mit dem His₁₀₅ der β -Untereinheit eingehen. Dadurch imitiert es den Nitrosyl-Häm-Komplex, wodurch es zu einer Aktivierung der sGC kommt (Ignarro *et al.*, 1984; Friebe *et al.*, 1997; Friebe und Kösling, 1998).

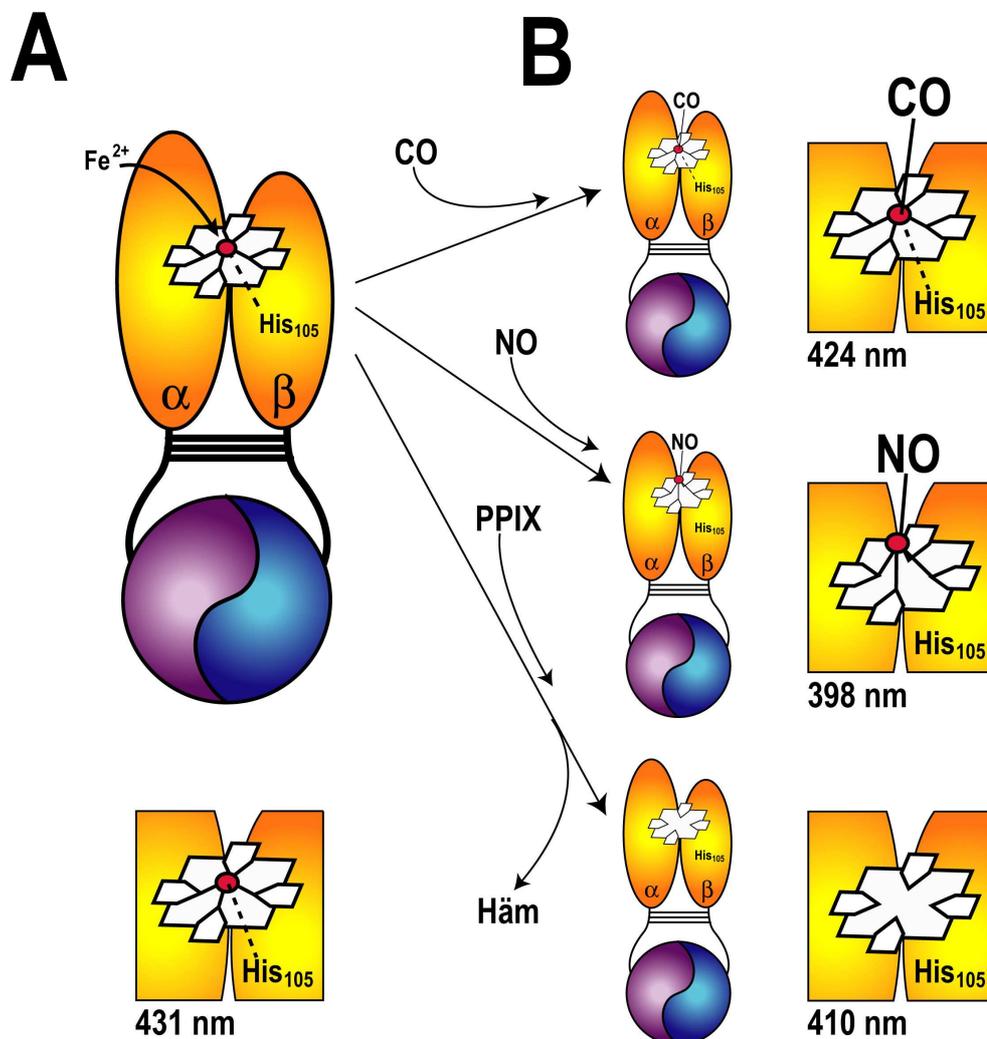


Abbildung 1.2: Gezeigt ist der Status der prosthetischen Hämgruppe der sGC im nicht aktivierten Zustand (A) sowie in Anwesenheit der sGC-Aktivatoren CO, NO und Protoporphyrin IX (B). Die Auswirkung des jeweiligen Aktivators auf die Histidyl-Häm-Bindung an das Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit sowie das Absorptionsmaximum der jeweiligen Soretbande ist in B dargestellt.

1.3.4 NO-unabhängige, aber Häm-abhängige sGC-Stimulatoren

1994 wurde in einer Veröffentlichung von Ko und Mitarbeitern erstmalig ein Indazolderivat, YC-1, beschrieben, das zu einer cGMP-vermittelten Hemmung der Thrombozytenaggregation führte (Ko *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995). Später konnte gezeigt werden, dass diese antiaggregatorische Wirkung von YC-1 auf einer direkten und NO-unabhängigen Aktivierung der sGC beruht (Friebe *et al.*, 1996; Mülsch *et al.*, 1997; Hönicka *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NO und YC-1 stark synergistisch auf die Enzymaktivierung wirkten, so dass NO-Konzentrationen, die nur zu einer schwachen sGC-Aktivierung führten, in Gegenwart von YC-1 in ihrer Wirkung potenziert wurden (Friebe *et al.*, 1996; Friebe *et al.*, 1998; Hönicka *et al.*, 1999). Die Verflechtung der Aktivierungsmechanismen von NO und YC-1 zeigt sich auch daran, dass beide Aktivatoren die Anwesenheit der reduzierten Hämgruppe für eine sGC-Aktivierung benötigen (Friebe *et al.*, 1997; Friebe *et al.*, 1998). Des Weiteren wird durch YC-1 die schwache CO-induzierte sGC-Aktivierung stark potenziert (Stone und Marletta, 1995, 1996; Friebe *et al.*, 1996; Hönicka *et al.*, 1999; Denninger *et al.*, 2000). Dieser Befund belebte die Diskussion um eine mögliche physiologische Wirkung von CO in Gegenwart einer endogenen YC-1 ähnlichen Substanz, die jedoch bis heute nicht gefunden werden konnte (Cary und Marletta, 2001; Mayer und Kösling, 2001). Die beschriebenen Charakteristika machten YC-1 zu einer interessanten Leitstruktur für direkte NO-unabhängige sGC-Stimulatoren. In den folgenden Jahren wurden auf Basis dieser Struktur Derivate synthetisiert, welche zwar die gleichen Charakteristika aufwiesen wie YC-1 jedoch bis z.T. Faktor 1000 wirkstärker waren (Straub *et al.*, 2001, 2002). Das pharmakologische *In-vivo*- und *In-vitro*-Profil der wirkstärksten Vertreter dieser Substanzklasse, BAY 41-2272 und BAY 41-8543, wurde kürzlich beschrieben (Becker *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2001, 2002a, b).

1.3.5 NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren

Neben den oben beschriebenen NO-unabhängigen aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren konnte in einem „High-Throughput-Screen“ (HTS) eine weitere Strukturklasse identifiziert werden, welche die sGC konzentrationsabhängig aktiviert, jedoch komplett andere Charakteristika aufweist, wie die unter 1.3.4 beschriebenen Substanzen. Der in dieser Arbeit untersuchte Vertreter dieser Substanzklasse, BAY 58-2667, aktiviert die sGC bereits in subnanomolaren Konzentrationen und zeigte in Kombination mit NO eine nur additive Wirkung auf die Aktivierung des Enzyms (Stasch *et al.*, 2002c). Darüber hinaus zeigten Substanzen dieser Wirkstoffklasse auch am hämfreien oder oxidierten Enzym eine stark aktivierende Wirkung im Gegensatz zu den Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren wie YC-1, BAY 41-2272 oder BAY 41-8543 (Stasch *et al.*, 2002c). Dieses Aktivierungsprofil deutet darauf hin, dass diese

Substanzen einen komplett neuen und bis dato unbekanntem Wirkmechanismus besitzen (Stasch *et al.*, 2002c; Hobbs, 2002).

Aktivatorklasse	Wirkung an der sGC		
	± Hämgruppe	+ ODQ	+ NO
sGC-Stimulator BAY 41-2272 BAY 41-8543	Häm-abhängig	Inhibition	Potenzierung
sGC-Aktivator BAY 58-2667	Häm-unabhängig	Verstärkung	Addition

Tabelle 1.1: Charakteristika der sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren auf molekularer Ebene.

1.3.6 Zink- und Mangan-Porphyrin

Neben dem bereits beschriebenen PPIX wurde die sGC auch mit anderen Metalloporphyrinen rekonstituiert (Ignarro *et al.*, 1982, 1984; Serfass *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten Zink- und Mangan-Porphyrine (ZnPP, MnPP) binden mit hoher Affinität an die sGC, führen jedoch weder in An- noch in Abwesenheit von NO zu einer Aktivierung des Enzyms. Sowohl ZnPP als auch MnPP bilden an der sGC einen stabilen sechsbindigen Zustand aus. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass Zinn-Protoporphyrin IX trotz Ausbildung eines hexakoordinierten Komplexes zu einer sGC-Aktivierung führt (Serfass *et al.*, 1998). Diese Befunde zeigen, dass bis auf das relativ einfache Modell der sGC-Aktivierung durch PPIX (siehe 1.3.3), die Interaktion der sGC mit Metalloporphyrinen nicht gänzlich verstanden ist (Carr *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurden ZnPP und MnPP eingesetzt, um eine Interaktion zwischen BAY 58-2667 und Porphyrinen, ohne eine sGC-Aktivierung durch das jeweilige Porphyrin als solches, zu untersuchen.

1.3.7 ODQ

ODQ ist ein häufig verwendeter, relativ spezifischer Inhibitor der sGC und wirkt über eine Oxidation des zentralen Eisenatoms der Hämgruppe (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996, Olesen *et al.*, 1998). In hohen Konzentrationen führt ODQ ebenfalls zu einer unspezifischen Oxidation anderer Hämproteine (Feelisch *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000), wobei die Oxidation der sGC jedoch schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen einsetzt. Diese relative Spezifität von ODQ macht es zu einem wertvollen biochemischen Hilfsmittel, um die pGC- und sGC-vermittelten Wirkungen im Gewebe zu unterscheiden.

1.4 cGMP-Effektorsysteme

Der in den Zellen durch die verschiedenen GC gebildete „second messenger“ cGMP ist, je nach Gewebe, an der Regulation einer Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Prozesse beteiligt (Zur Übersicht: Denninger und Marletta, 1999; Lucas *et al.*, 2000). Diese Vielzahl von Funktionen durch einen Botenstoff wird durch die unterschiedliche Ausstattung der Gewebe mit verschiedenen cGMP-Effektorsystemen möglich. Die Effektorsysteme, die maßgeblich durch den zellulären cGMP-Spiegel beeinflusst werden, lassen sich in drei Klassen einteilen: Die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen (PDE), die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) und die durch cGMP gesteuerten Ionenkanäle (CNG-Kanäle).

1.4.1 Phosphodiesterasen

Die Phosphodiesterasen (PDE) sind in den Zellen die natürlichen Gegenspieler der verschiedenen AC und GC und sorgen für einen stetigen Abbau der gebildeten cyclischen Nukleotide. Die Superfamilie der PDE ist recht divers. Nach der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms (Venter *et al.*, 2001) sind 25 PDE-Gene bekannt, die sich in 11 Familien hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung, Regulation, Pharmakologie und Substratspezifität einteilen lassen. Die beiden maßgeblich am cGMP-Abbau beteiligten PDE sind die für cGMP spezifischen PDE 5 und PDE 9, während die PDE 1, 2, 3, 10 und 11 sowohl cGMP als auch cAMP als Substrat akzeptieren (Zur Übersicht: Mehats *et al.*, 2002). Ihr z.T. diskretes Expressionsmuster und ihre Substratspezifität machen die PDE zu vielversprechenden Angriffspunkten für Wirkstoffe, die den cAMP bzw. cGMP-Spiegel verschiedener Gewebe beeinflussen sollen. Als bekannteste Vertreter solcher Wirkstoffe sind hier PDE5-Inhibitoren wie Viagra®, Levitra® und Cilialis® zu nennen, die zur Behandlung der erektilen Dysfunktion auf dem Markt sind sowie in ersten klinischen Untersuchungen auch bei der pulmonalen Hypertonie eingesetzt werden (Ghofrani *et al.*, 2003).

1.4.2 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG), von denen sieben Gene bekannt sind, gehören zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen und werden in zwei Gruppen eingeteilt (Mehats *et al.*, 2002). Die erste Gruppe wird gebildet durch die im Cytosol löslich vorliegenden PKGI α und PKGI β , die vermehrt in Thrombozyten, Glattmuskelzellen, Herzmuskelzellen und verschiedenen Hirnarealen exprimiert werden. So ist die PKGI β z.B. über die Phosphorylierung des IP₃-Rezeptors an den Membranen intrazellulärer Ca²⁺-Speicher essenziell an der cGMP-vermittelten Relaxation der glatten Muskulatur beteiligt

(Schlossmann *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2000). Die membranständige PKGII, findet sich hauptsächlich in Knochen, Hirn, Niere und im Darmepithel. Ihre physiologische Bedeutung ist jedoch nicht abschließend geklärt (Zur Übersicht: Smolenski *et al.*, 1998; Lohmann *et al.*, 1997).

1.4.3 cGMP-gesteuerte Ionenkanäle

Von der dritten Gruppe, den cyclischen Nukleotid abhängigen Ionenkanälen, sind z.Z. fünf Gene bekannt (Broillet *et al.*, 1999). Diese Kanäle sind größtenteils an der Signaltransduktion von Umweltreizen an den primären Sinnesneuronen des Riech- und Geschmacksepithels sowie der Retina beteiligt (Zur Übersicht: Biel *et al.*, 1998), wurden jedoch auch in anderen Geweben, wie z.B. dem Darmepithel, gefunden (Pitari *et al.*, 2003). Nach ihrer Aktivierung durch intrazelluläres cAMP bzw. cGMP ermöglichen diese Ionenkanäle einen Einstrom von Na⁺ und vor allem Ca²⁺ in die Zelle, das wiederum als „third messenger“ weitere Signalkaskaden in Gang setzt (Biel *et al.*, 1998).

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Anfang der 90er Jahre wurde mit YC-1 ein Indazolderivat entdeckt und charakterisiert, welches das Zielenzym für Stickstoffmonoxid (NO), die lösliche Guanylatcyclase (sGC), NO-unabhängig aktivierte. Damit wurde die sGC schlagartig zu einem potenziellen Ziel neuer Pharmaka. Aus dieser Entwicklung sind in der Zwischenzeit mit BAY 41-2272 und BAY 41-8543 Derivate des YC-1 entstanden, die die ursprüngliche Leitstruktur um ein Vielfaches in Wirkung und Spezifität übertreffen und die sich bereits in ersten klinischen Studien befinden.

Neben dieser in der Literatur gut charakterisierten Wirkstoffklasse wurde durch ein „High-Throughput-Screening“ eine weitere Leitstruktur identifiziert, die zur Entwicklung einer neuen Klasse NO-unabhängiger sGC-Aktivatoren geführt hat. Der potenteste Vertreter dieser zweiten Wirkstoffklasse, BAY 58-2667, aktiviert die sGC bereits in subnanomolaren Konzentrationen. BAY 58-2667 ist darüber hinaus, im Gegensatz zu den sGC-Stimulatoren wie BAY 41-2272, die erste Substanz, die ein den organischen Nitraten vergleichbares hämodynamischen Profil zeigt. Damit könnte eine Wirkstoffklasse identifiziert worden sein, die das Potential besitzt, die seit fast 130 Jahren angewandte Nitrattherapie zu ergänzen. Im Gegensatz zu den organischen Nitraten zeigt BAY 58-2667 keine Toleranzentwicklung nach wiederholter Gabe und führt darüber hinaus zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Es konnte gezeigt werden, dass BAY 58-2667 die sGC konzentrationsabhängig aktiviert, einen additiven Effekt mit NO auf die Enzymaktivierung besitzt und durch den sGC-Inhibitor ODQ in seiner Wirkung potenziert wird. Diese Charakteristika machten deutlich, dass BAY 58-2667 die sGC über einen völlig neuen Wirkmechanismus aktiviert, der von allen bekannten sGC-Stimulatoren, wie NO oder BAY 41-2272, abzugrenzen ist. Die möglichst vollständige Klärung dieses neuen Mechanismus der sGC-Aktivierung war Ziel dieser Arbeit.

Die in den Aktivitätsprofilen beobachteten Charakteristika von BAY 58-2667 sollten genauer untersucht werden. Dazu wurde die Interaktion beider Substanzklassen mit der prosthetischen Hämgruppe der sGC spektroskopisch untersucht und die kinetischen Parameter K_m und V_{max} der sGC nach Inkubation mit BAY 41-8543 oder BAY 58-2667 bestimmt und verglichen. Des Weiteren sollte der beobachtete Synergismus zwischen den Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren, wie BAY 41-8543 und NO bzw. dessen Fehlen bei BAY 58-2667 und NO, durch Bestimmung der Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes untersucht werden. Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von BAY 58-2667 an die sGC sollte ein Rezeptorbindungsassay etabliert und anschließend die Einflüsse verschiedener Verbindungen, wie z.B. BAY 41-2272 und ODQ, auf die Bindung von BAY 58-2667 an das Enzym untersucht werden. Für die nähere Lokalisierung der Bindungsstelle von BAY 58-2667 sollte unter anderem auch ein Photoaffinitätslabeling durchgeführt werden. Dazu wurde ein Photoaffinitätslabel auf Basis von BAY 58-2667 durch Einführen einer photolabilen Azidogruppe und einer Tritiummarkierung synthetisiert. Die markierte sGC sollte nach Inkubation mit diesem Photoaffinitätslabel fragmentiert und die entstandenen radioaktiven Peptidfragmente durch Sequenzierung identifiziert werden.

Die Frage einer möglichen Interaktion zwischen ODQ, Häm und BAY 58-2667 sollte auch an der hämfreien sGC untersucht werden. Dies erforderte die Etablierung einer Methode zur Entfernung bzw. Rekonstitution der Hämgruppe kleiner Enzymmengen. Mit der so gewonnenen hämfreien sGC sollte die Wechselwirkung zwischen ODQ und BAY 58-2667 untersucht werden. Darüber hinaus sollte auch eine Expression eines Teilfragments der sGC in *E. Coli* etabliert werden.

Zur Identifizierung von Aminosäuren, die an der Bindung der Hämgruppe oder an einer Interaktion mit BAY 58-2667 beteiligt sein könnten, sollten Multisequenzalignments durchgeführt und die identifizierten Aminosäuren durch Mutagenese ausgetauscht werden. Um die Präsenz oder den Verlust der Hämgruppe der verschiedenen generierten Mutanten ohne weitere Aufreinigung im cytosolischen Milieu der Zelle indirekt nachweisen zu können, sollten die sGC-Mutanten transient in eine cGMP-

Reporterzelllinie transfiziert und ihre Aktivitätsprofile in Gegenwart verschiedener sGC-Aktivatoren bestimmt und verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Substanzen

NO-Donor DEA/NO

Als NO-Donor wurde DEA/NO (2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid) mit einer Halbwertszeit von 2 min (bei neutralem pH) verwendet (Morley *et al.*, 1993a, b). DEA/NO wurde in 10 mM NaOH auf Eis angesetzt und anschließend in den jeweiligen Testpuffern verdünnt.

NO-Scavenger PTIO

Als NO-Scavenger wurde PTIO (2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid) eingesetzt. Es ist in wässrigen Puffern löslich und reagiert unmittelbar stöchiometrisch in einem Verhältnis von 1:1 mit freiem NO ab (Akaike *et al.* 1993).

sGC-Inhibitor ODQ

Als sGC-Inhibitor wurde ODQ (1H-(1,2,4)-Oxadiazolo-(4,3a)-quinoxazin-1-one) verwendet, welcher das Fe²⁺-Zentrum der prosthetischen Hämgruppe oxidiert und damit eine Aktivierung des Enzyms durch NO oder Häm-abhängige sGC-Stimulatoren (YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543) unterbindet (Schrammel *et al.*, 1996; Stasch *et al.*, 2001, 2002a). In niedrigen Konzentrationen besitzt ODQ eine recht hohe Spezifität für die sGC, wobei in hohen Konzentrationen auch unspezifisch andere Hämproteine oxidiert werden (Feelisch *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Daneben wurde für einige Untersuchungen auch das unspezifische Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat(III) eingesetzt, welches ebenfalls Hämproteine oxidiert und dadurch die sGC inhibiert (Gruetter *et al.*, 1981; Stone und Marletta, 1994).

Protoporphyrin IX (PPIX)

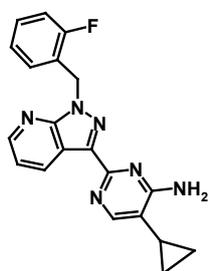
Bei Protoporphyrin IX handelt es sich um die eisenfreie Vorstufe des Häms, welche durch Imitation des pentakoordinierten Häm-Nitrosyl-Komplex die sGC aktiviert (Ignarro *et al.*, 1982). PPIX wurde 10 mM in DMSO gelöst und in 10 mM NaOH verdünnt.

Zink- und Mangan-Protoporphyrin IX (ZnPP, MnPP)

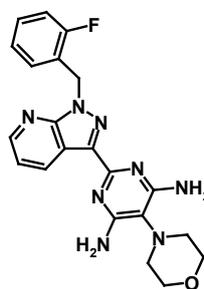
Metalloporphyrine binden mit hoher Affinität an die sGC und führen zur Verdrängung der nativen Hämgruppe (Ignarro *et al.*, 1984). Die verschiedenen Metalloporphyrine wurden 10 mM in DMSO gelöst und anschließend in 10 mM NaOH verdünnt.

Häm-abhängige sGC-Stimulatoren (BAY 41-2272, BAY 41-8543)

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 verwendet (Straub *et al.*, 2001, 2002; Stasch *et al.*, 2001, 2002a, b). Beide Substanzen wurden in DMSO oder ACN:H₂O (60:40) in einer Konzentration von 10 mM gelöst und anschließend entsprechend den jeweiligen Versuchsanforderungen weiterverdünnt.



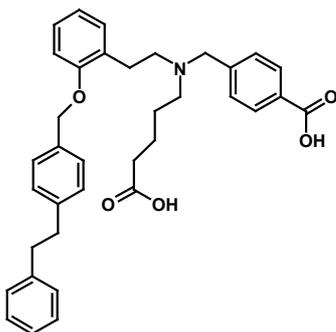
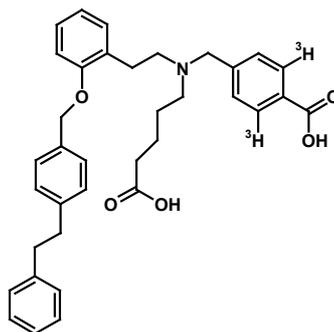
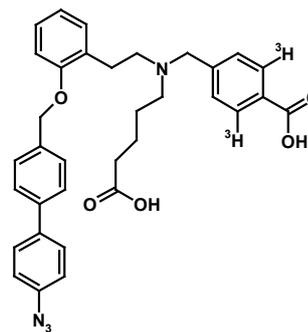
BAY 41-2272



BAY 41-8543

Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren (BAY 58-2667, BAY 61-2573)

Der verwendete Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 wurde wie beschrieben synthetisiert (Alonso-Alija *et al.*, 2001). Für die Photoaffinitätslabel-Untersuchungen wurde darüber hinaus das Photoaffinitätslabel (PAL) BAY 61-2573, durch Einfügen einer UV-labilen Azidogruppe in die Grundstruktur eines Derivates von BAY 58-2667, synthetisiert. Das PAL wurde bis zur Verwendung bei -20°C im Dunkeln gelagert. Zur Etablierung einer Rezeptorbindungsstudie für BAY 58-2667 sowie zur Lokalisation der Bindungsstelle der Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren durch das PAL BAY 61-2573 wurde in beide Substanzen eine Tritiummarkierung eingefügt. Diese Iridiumkomplex-katalysierte Austauschreaktion (Shu *et al.*, 2000) erfolgte mit dem jeweiligen Diester beider Verbindungen, wobei eine spezifische Aktivität von 5,4 Ci / mmol (³H-BAY 58-2667) bzw. 14,5 Ci / mmol (³H-BAY 61-2573) erzielt werden konnte. Beide Substanzen wurden für die Untersuchungen in DMSO oder ACN:H₂O (60:40) in einer Konzentration von 10 mM gelöst und anschließend entsprechend den jeweiligen Versuchsanforderungen weiterverdünnt.


BAY 58-2667

³H-BAY 58-2667

³H-PAL (BAY 61-2573)

2.2 Geräte

Agarosegelkammer	Agagel™ Standard	Biometra, Göttingen
Blot-Apparatur	Trans-Blot™ Transfer Cell	BioRad, München
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot™ Transfer Cell	BioRad, München
Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Heraeus, Düsseldorf
Demineralisierungsanlage	MilliQ HF Water System	Millipore, Schwallbach
Densitometer	GS-710 Calibrated Imaging Densitometer™	BioRad, München
ELISA-Reader	SLT Spectra Elisa Reader	SLT, Crailsheim
Flüssig-Szintillations-Counter	PW 4700 liquid scintillation counter	Philips, RayTest, Straubenhardt
Fotoentwickler	AGFA Curix 60™	AGFA, Köln
Geltrockner	Modell 583 Gel Dryer	BioRad, München
HPLC	SMART™ HPLC-System	Pharmacia, München
Inkubatoren	Memmert 500	Memmert, Schwallbach
Mikroskop	Axiovert 100, Olympus BH-2	Zeiss, Jena
PAGE-Apparatur	Protean II xi Cell™	BioRad, München
PAGE-Apparatur	Mini Protean II Cell™	BioRad, München
PCR-Cycler	UNO-Thermoblock™	Biometra, Göttingen
pH-Meter	pH-Meter 765 Kalimatic	Knick, Berlin
Photo-Imager	BAS 5000 Scanner	RayTest, Straubenhardt
Photometer	DU640 Spectrophotometer	Beckman, München
Powersupply	Power Pac 300	Biorad, München
SpeedVac	Bachofer Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Ultraschallbad	Transsonic TS 540	Faust Elma, Singen
Ultraschallspitze	Branson Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
UV-Handlampe	N8K UV 254 nm Handlampe	Benda Laborgeräte, Wiesloch
Waage	Waage PM 400	Mettler Toledo, Giessen
Waage	Feinwaage Mettler AX205 DeltaRange™	Mettler Toledo, Giessen
Wasserbad	GFL Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserbad	Julabo 19A mit Thermostat	Julabo, Seelbach
Wasserbad	Julabo U3	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Biofuge A Heraeus Sepatech	Heraeus, Düsseldorf
Zentrifuge	Ultrazentrifuge mit Rotor 70.1Ti	Beckman, München
Zentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Düsseldorf
Zentrifuge	Cryofuge 5000 Heraeus Sepatech	Heraeus, Düsseldorf

2.3 Materialien und Chemikalien

Materialien, Kits, Enzyme

Anti-Rabbit HRP-Detektionskit	Vectastain™ ABC	Vectorlabs, Burlingame, USA
Autoradiographiefilme	ECL-Hyperfilm™	Amersham Biosciences, Freiburg
Blot-Membranen	Nitrocellulose 0,45 µM	BioRad, München
Blot-Membranen	PVDF	BioRad, München
Coomassie-Färbung	Bio-Safe™ Coomassie	BioRad, München
DNA Ligase	T4-DNA-Ligase	Roche, Basel, Schweiz
DNA-Gel-Extraktion	QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
ECL-Kit	ECL-Chemilumineszenzkit	Amersham Biosciences, Freiburg
Endoproteinase LysC	Endoproteinase (Sequencing grade)	Roche, Basel, Schweiz
Glasfaserfilterplatte	Multiscreen™ FC/B	Millipore, Schwallbach
MaxiPrep-Kit	QIAprep™ Spin Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
MidiPrep-Kit	QIAprep™ Spin Midiprep Kit	Qiagen, Hilden
MiniPrep-Kit	QIAprep™ Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Mutagenesekit	QuickChange™ Mutagenesekit	Stratagene, La Jolla, USA
<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> , <i>XbaI</i> , <i>NotI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>	Restriktionsendonukleasen	Roche, Basel, Schweiz
Photoimagerplatten	BAS-TR 20/25 Imaging Plate	RayTest, Straubenhardt
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Silber-Färbung	Silver Stain Plus™	BioRad, München
Szintillationsgefäße	20 ml Polypropylengefäße	Zinsser Analytic, Frankfurt

Transfektionsreagenz	Lipofectamine™ Plus™	Invitrogen, Karlsruhe
UV-Einwegküvetten	Uvette™	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturmaterial	Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturmaterial	Neugebauer Zählkammer	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturmaterial	Rubber Policeman	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturmaterial	Mediumfiltriereinheiten (0,22 µM)	Millipore, Schwallbach
Zentrifugations-Ionenaustauscher	Vivapure™ QL	Vivascience, Hannover

Chemikalien

Alle weiteren verwendeten Chemikalien waren vom höchsten Reinheitsgrad und wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den folgenden Firmen bezogen: Alexis, Grünberg; Calbiochem, Bad Soden; Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen. Folgende Radiochemikalien wurden bezogen: [$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP (Spezifischen Aktivität: 29,6 TBq/mmol) von NEN, Köln; ^{14}C -Rainbowmarker von Amersham Biosciences, Freiburg.

2.4 Lösungen und Medien

2.4.1 Gelelektrophoretische Untersuchungen von DNA

Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer: 242 g Tris-Base

57,1 ml Essigsäure

100 ml 0,5 mM EDTA, pH 8,0

ad 1000 ml MilliQ H₂O

Agaroselösung:

1 g Agarose (Molekularbiology grade)

100 ml 1 x TAE-Puffer

In Mikrowelle aufkochen, anschließend etwas abkühlen lassen

5 µl Ethidiumbromid zugeben

2.4.2 Proteinfärbung von Gelen und Membranen

Coomassie-Färbung

Färbelösung:

30% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

0,1% (w/v) Coomassie Blue-R 250

Entfärbelösung:

30% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Silber-Färbung

Fixierlösung: 50% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure

Silberlösung: 1,4 ml Ammoniaklösung (25%)
 21 ml 0,36%ige NaOH
 4 ml 20%ige (w/v) Silbernitratlösung tropfenweise zugeben
 ad 100 ml MilliQ H₂O

Entwicklerlösung: 0,005% (w/v) Zitronensäure
 0,019% (w/v) Formaldehyd

Ponceaurot-Färbung von Membranen

Ponceaulösung: 0,1% (w/v) Ponceau S
 5% Essigsäure

Coomassie-Färbung von Membranen

Färbelösung: 40% (v/v) Methanol
 0,025% (w/v) Coomassie Blue-R 250

2.4.3 Gelelektrophoretische Untersuchungen von Proteinen

Tris-Glycin-Gele nach Laemmli

Acrylamid:	40% Acrylamid / Bis-Acrylamid (29:1)	
Tris-Glycin-Sammelgel:	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,2% (w/v) SDS	
Tris-Glycin-Trenngel:	250 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,2% (w/v) SDS	
APS:	10% (w/v) Ammoniumpersulfat	
SDS-Laufpuffer:	100 mM Tris-HCl (ohne pH-Einstellung) 100 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS	
Laemmli-Probenpuffer:	2 x konzentriert	5 x konzentriert
	125 mM Tris-HCl, pH 6,8	312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
	100 mM DTT	250 mM DTT
	4% (w/v) SDS	10% (w/v) SDS
	20% (v/v) Glycerin	50% (v/v) Glycerin
	0,01% (w/v) Bromphenolblau	0,025% (w/v) Bromphenolblau

Tris-Tricin-Gele nach Schagger und Jagow

Anodenpuffer:	200 mM Tris-HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer:	100 mM Tris-HCl, pH \approx 8,25 (nicht weiter einstellen) 100 mM Tricin 0,1% (w/v) SDS

Isoelektrofokussierung nach O'Farrel

Acrylamid:	28,38% (w/v) Acrylamid 1,62% (w/v) Bis-Acrylamid Lösung filtrieren und bei 4°C dunkel lagern
IEF-Gellösung:	5,5 g Harnstoff 1,33 ml 30% (w/v) Acrylamid 2 ml 10% (v/v) Nonidet P-40 1,97 ml MilliQ H ₂ O Erwärmen (handwarm) und rühren bis Harnstoff gelöst ist. 0,4 ml Ampholine, pH 5-7 0,1 ml Ampholine, pH 3-10 10 µl 10% (w/v) APS Lösung 1 min entgasen 7 µl Temed zugeben Rundgele mit erwärmter Pasteurpipette gießen
Kathodenpuffer:	20 mM NaOH Lösung entgasen
Anodenpuffer:	660 µl 85% H ₃ PO ₄ ad 1000 ml MilliQ H ₂ O
Äquilibrierungspuffer:	60 mM Tris-HCl, pH 6,8 30% (v/v) Glycerol 3% (w/v) SDS
O'Farrel-Lysispuffer:	5,5 g Harnstoff 2 ml 10% (v/v) Nonidet P-40 1,97 ml MilliQ H ₂ O 0,4 ml Ampholine, pH 5-7 0,1 ml Ampholine, pH 3-10

2.4.4 Westernblot

Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl (ohne pH-Einstellung)
192 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

2.4.5 sGC-Rezeptorbindungsstudien

Beschichtungslösung: 0,5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP, 360 kDa)
0,1 % (v/v) Tween-20

Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,2
100 mM NaCl

5 x Inkubationspuffer: 250 mM TEA-HCl, pH 7,5
500 μ M EDTA
5 mM DTT
15 mM MgCl₂

IgG-Puffer: 1% IgG in 1 x Inkubationspuffer

PEG-Puffer: 35% PEG 8000 in 1 x Inkubationspuffer

2.4.6 Photoaffinitätslabeling

Inkubationspuffer: 50 mM TEA-HCl pH 7,4
0,1 mM EGTA
3 mM MgCl₂
1 mM cGMP
200 μ M GTP

TCA-Lösung (100%): 500 g TCA + 227 ml MilliQ H₂O

2.4.7 Aufreinigung der sGC mit Zentrifugations-Ionenaustauscher

Inkubationspuffer:	125 mM TEA-HCl, pH 8,0 0,25 mM EGTA 2,5 mM DTT 7,5 mM MgCl ₂
Puffer I:	25 mM TEA-HCl, pH 8,0 50 µM EGTA 1,5 mM MgCl ₂
Puffer II:	Puffer I mit 300 mM NaCl und pH 7,0
Puffer III:	Puffer II mit 1 M NaCl

2.4.8 LysC In-Gel Proteinspaltung

2 x ABC-Puffer:	0,4 M Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,9
1 x ABC-Puffer + Tween-20:	200 µl 5% (v/v) Tween-20 24,8 ml MilliQ H ₂ O 25 ml 2 x Ammoniumbicarbonatpuffer

2.4.9 sGC Aktivitäts-Assay

Probenpuffer:	50 mM TEA-HCl, pH 7,5 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 2 mg/ml BSA
---------------	---

Inkubationspuffer:	125 mM TEA-HCl, pH 7,5 0,25 mM EGTA 2,5 mM DTT 2,5 mg/ml BSA 2,5 mM cGMP 2,5 mM IBMX 7,5 mM MgCl ₂ 12,5 mM Creatinphosphat 31,25 U/ml Creatinphosphokinase
Substratlösung:	1 mM GTP mit ca. 100.000 cpm [α - ³² P]-GTP je Ansatz

2.4.10 Medien und Lösungen für die Zellkultur

<i>E. Coli</i> :	LB Broth, Miller (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) Ampicillin (Invitrogen, Karlsruhe) Chloramphenicol (Invitrogen) Kanamycin (Invitrogen)
cGMP-Reporterzelllinie:	MEM Alpha-Medium (Cat.-No.: 22571-020: Invitrogen, Karlsruhe) FBS (Cat.-No.: 10500-064: Invitrogen) Penstrep 10000 U/ml (Cat.-No.: 15140-122: Invitrogen) Glutamin 200 mM (Cat.-No.: 25030-024: Invitrogen) Zeocin 100 mg/ml (Cat.-No.: 801935: Invitrogen)

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm (Biophotometer, Eppendorf) in Einwegküvetten (Uvette™, Eppendorf) gemessen. Die Verdünnung wurde dabei so gewählt, dass die OD₂₆₀ in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,8 lag.

2.5.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 1% Agarosegelen aufgetrennt. Für die Gele wurde 1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, abgekühlt und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 10 x Gelladepuffer (BlueJuice, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und bei einer Spannung von 100 V getrennt. Als Größenstandard wurde eine 1kb DNA-Leiter (Ready Load 1kb-Ladder, Invitrogen) verwendet. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht auf einem Gelscanner (GelDoc 2000, BioRad, München) mit der Software Quantity One (Version 4.23, BioRad).

2.5.3 Mutagenese

Die Mutationen der sGC α - und β -Untereinheit wurden mit dem QuickChange™ Mutagenesis-Kit der Firma Stratagene (La Jolla, USA) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Als Template wurden jeweils 20 ng des zu mutierenden Plasmids eingesetzt und eine Elongationszeit von 1,5 min je kb Plasmid gewählt. Die für die Mutationen verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.5.4 Transformation von *E. Coli* und Plasmidgewinnung

Retransformation eines Vektors

Zur Vermehrung eines Vektors wurden 0,5 µl des Plasmids mit 50 µl kompetenten *E. Coli* (XL1-Blue, Stratagene, La Jolla, USA) für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend auf einer LB-Agarplatte mit

dem entsprechenden Selektionsmarker (Ampicillin: 100 µg/ml) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten (16 h, 37°C) wurde mit einer einzelnen Kolonie eine 4 ml Starter-Kultur (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und diese für ca. 8 h bei 37°C inkubiert. Mit 200 µl dieser Starter-Kultur wurde eine 200 ml Maxi-Kultur (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) inokuliert und für ca. 16 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden am nächsten Tag abzentrifugiert und die Plasmide gewonnen (Qiaprep Spin Maxi, Qiagen, Hilden).

Transformation eines Ligations- bzw. eines Mutageneseansatzes

Zur Transformation eines Ligations- bzw. Mutationsansatzes wurde 1 bis 5 µl Ansatz mit 50 µl kompetenten *E. Coli* (XL1-Blue, Stratagene, La Jolla, USA) gemischt und nach folgendem Protokoll transformiert:

Transformation: 30 bis 45 min Inkubation auf Eis
 2 min Hitzeschock bei 42°C
 2 min Inkubation auf Eis
 Zugabe von 450 µl LB-Medium (37°C) ohne Selektionsmarker
 Inkubation für 1 h bei 37°C
 Ausplattieren der 500 µl auf LB-Agarplatten mit Selektionsmarker
 Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht

Von jeder Ligation bzw. Mutagenese wurden anschließend mindestens drei Klone gepickt und damit jeweils eine 4 ml Übernachtskultur inokuliert (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin). Nach 16 h Inkubation (37°C, 250 rpm) wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Plasmide isoliert (Qiaprep Spin Mini, Qiagen, Hilden). Die Verifizierung der Mutationen erfolgte durch Sequenzierung (Invitak, Berlin).

2.5.5 Restriktionsverdau

Um eine Ligation oder das korrekte Einfügen einer Schnittstelle zu überprüfen oder ein Plasmid für eine Ligation zu linearisieren, wurde ein Restriktionsverdau mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dazu wurde ein Ansatz, wie im Folgenden beschrieben, zusammengegeben:

Restriktionsansatz: 2 µl 10 x Restriktionspuffer (Passend zum Enzym: A, B, L, M oder H)
 0,5 µl Enzym
 500 ng Vektor
 ad 20 µl steriles H₂O

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert, mit 10 x Gel-Ladepuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel getrennt. Für Restriktionen mit zwei Enzymen wurde der Puffer gewählt, in dem beide Nukleasen nach Möglichkeit die größte Aktivität aufwiesen. Ansonsten wurde in einem ersten Schritt mit dem Enzym geschnitten (1 h, 37°C), welches in einem Niedrigsalzpuffer (L, M) die höchste Aktivität besaß. Anschließend wurde zu dem Ansatz 4 µl des Hochsalzpuffers (H) sowie das zweite Restriktionsenzym (0,5 µl) pipettiert und auf 40 µl mit H₂O aufgefüllt. Nach einer weiteren Stunde bei 37°C konnten die linearisierten DNA-Fragmente im Gel getrennt und anschließend unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten werden. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem Gel-Extraktionskit QiaQuick™ (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers.

2.5.6 Klonierung der cDNA

Für eine heterologe Expression eines sGC-Fragments in *E. Coli* wurde die cDNA für die β-Untereinheit der sGC aus dem Vektor pBluescript II KS+ (Stratagene, La Jolla, USA) in den prokaryotischen Expressionvektor pET22b (Novagen, Madison, USA) kloniert. Dazu wurde durch Mutation eine *Nde*I-Schnittstelle (Erkennungssequenz: CATATG) am Startcodon der cDNA generiert, und diese anschließend durch Restriktion mit *Nde*I und *Xho*I aus dem Vektor geschnitten. Anschließend wurde der pET22b-Vektor mit *Nde*I und *Xho*I linearisiert, zusammen mit der geschnittenen cDNA der β-Untereinheit in einem Agarosegel getrennt und aus der Gelmatrix eluiert. Die linearisierte cDNA und der linearisierte pET22b-Vektor wurden wie folgt beschrieben ligiert:

Ligationsansatz: 1 µl 10 x T4-Ligase-Puffer
 1 µl T4-DNA-Ligase
 40 ng *Nde*I / *Xho*I linearisierter Vektor
 β cDNA (Vektor:Insert = 1:1 und 1:3)
 ad 10 µl steriles H₂O

Die Ansätze wurden für 16 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl jedes Ligationsansatzes in kompetente *E. Coli* (XL1-Blue™) transformiert und auf LB-Agarplatten mit passendem Selektionmarker ausplattiert. Von einigen der gewachsenen Kolonien wurden Übernachtskulturen angeimpft (4 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 220 rpm) und am folgenden Tag die Plasmide isoliert (Qiaprep™ Spin Mini, Qiagen, Hilden). Die Ligation wurde mittels Restriktion überprüft und positive Klone anschließend sequenziert (Invitak, Berlin).

2.5.7 Expression des N-terminalen Fragments der β -Untereinheit der sGC

Für die Expression von Fragmenten der sGC in *E. Coli* wurde das T7-Expressionssystem gewählt. Dabei wird die cDNA von der viralen T7-RNA-Polymerase transkribiert und anschließend translatiert. Dieses System hat zwei Vorteile: Zum einen erlaubt es die einfache Vermehrung des Vektors ohne unerwünschte Transkription in *E. Coli*, welche nicht die nötige T7-RNA-Polymerase besitzen. Zum anderen werden in *E. Coli* Stämmen mit einer genomischen Kopie der T7-RNA-Polymerase große Mengen mRNA, aufgrund des starken viralen T7-Promotors, gebildet. Für die Expression wurde der *E. Coli*-Stamm „BL21 (DE3) pLysS“ (Novagen, Madison, USA) verwendet. Nach Induktion mit IPTG wird die T7-RNA-Polymerase gebildet und transkribiert anschließend das transformierte Konstrukt. Mit einem Klon, welcher die cDNA für die N-terminalen 200 AS der β -Untereinheit der sGC im Expressionsvektor pET22b enthielt, wurde eine Kultur angeimpft (100 ml LB-Medium, 0,34 µg/µl Chloramphenicol, 100 µg/µl Ampicillin) und bei 37°C inkubiert bis die Zelldichte eine OD₆₀₀ von 0,7 erreichte. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) und anschließender Inkubation bei 25°C für 20 h. Die Kultur wurde daraufhin gekühlt, die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet durch Sonifizierung auf Eis lysiert. Das Lysat wurde in der Ultrazentrifuge bei 100.000xg bei 4°C für 30 min zentrifugiert, und der Überstand über Zentrifugationsionenaustauscher (siehe 2.6.7) aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (siehe 2.6.5).

2.5.8 Transiente Transfektion der cGMP-Reporterzelllinie

Um die Auswirkung der verschiedenen Mutationen der sGC auf die Aktivierbarkeit des Enzyms durch NO, BAY 41-2272 und BAY 58-2667 zu testen, wurden die Vektoren für die α - und β -Untereinheit der

sGC in eine Reporterzelllinie, welche ein cGMP-Readoutsystem besitzt, transient co-transfiziert. Dazu wurden die Zellen in 96-Well Zellkulturplatten in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h die Zellen in den 96er Platten nach folgendem Protokoll mit den Transfektionsreagenzien Lipofectamine™ und Plus™ (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Beide Transfektionslösungen wurden dabei nach Angaben des Herstellers verwendet. Die im folgenden Protokoll eingesetzten Konzentrationen an DNA, Plus™ und Lipofectamine™ wurden in Vortests optimiert.

Transiente Transfektion:

DNA-Lösung

	1 Well	96er Platte
sGC α -Vektor:	75 ng	7,2 μ g
sGC β -Vektor:	75 ng	7,2 μ g
Optimem-Medium:	10 μ l	960 μ l
Plus™-Reagenz:	0,5 μ l	48 μ l

Komplexierung der DNA mit dem Plus™-Reagenz 15 min bei RT

Lipofectamine™-Lösung:

	1 Well	96er Platte
Lipofectamine™:	1 μ l	96 μ l
Optimem-Medium:	10 μ l	960 μ l

Zusammengeben der DNA/Plus™-Lösung mit Lipofectamine™

Komplexierung der DNA mit Lipofectamine™ 30 min bei RT

96er Platten mit 200 μ l Optimem-Medium je Well waschen

DNA-Lösung mit Optimem-Medium verdünnen

	1 Well	96er Platte
Optimem-Medium:	80 μ l	7,7 ml

- 96er Platten absaugen
- 100 µl der Transfektionslösung je Well pipettieren
- 3 h bei 37°C inkubieren
- Absaugen des Transfektionsmediums
- 200 µl Kulturmedium ohne Selektionsmarker je Well pipettieren

Nach erfolgreicher Transfektion wurden die Zellen für zwei weitere Tage in Medium ohne Selektionsmarker inkubiert, um ihnen ausreichend Zeit für die transiente Expression der sGC zu geben. Nach dieser Zeit wurden die Zellen für die Messung des intrazellulären cGMP-Gehaltes durch das Aequorin basierte Readout-System der Reporterzelllinie vorbereitet.

2.5.9 Messung der sGC-Mutanten im cGMP-Readout-System

Zur Messung des intrazellulären cGMP wurde in eine CHO-Zelle ein Readout-System stabil transfiziert. Dieses System beruht auf der Biolumineszenz des Aequorins, einem Protein der pazifischen Leuchtqualle *Aequorea forskalea* (Hastings *et al.*, 1969; Shimomura *et al.*, 1970), welches in Gegenwart der Cofaktoren Coelenterazin und Calcium Biolumineszenz aussendet. Diese Reporterzelllinie wurde wie beschrieben transient mit WT- bzw. mutierter sGC transfiziert. Vor dem Test wurden diese Zellen mit 200 µl Ca²⁺-freier Tyrode (CaTy) gewaschen und anschließend für 3 h bei 37°C mit Coelenterazin beladen (CaTy, 200 mM IBMX, 0,83 µg/ml Coelenterazin). Direkt vor der Messung wurde die transient exprimierte sGC, durch Zugabe von jeweils 50 µl sGC-aktivierender Substanz und anschließender Inkubation für 15 min bei 37°C, stimuliert. Das in dieser Zeit gebildete cGMP führte zur Öffnung cGMP-abhängiger Kationenkanäle, wobei jedoch die Abwesenheit von Calcium im Medium eine Biolumineszenz verhinderte. Die anschließende Zugabe 50 µl CaTy mit 10 mM Ca²⁺ je Well in einer lichtdichten CCD-Kamera initiierte den Einstrom von Ca²⁺ durch die in Abhängigkeit von der intrazellulären cGMP-Konzentration geöffneten cGMP-abhängigen Kationenkanäle. Die abgestrahlte Biolumineszenz wurde über einen Zeitraum von 120 s aufgenommen. In diesem Testsystem konnte somit relativ einfach der Einfluss von Mutationen der sGC auf die Aktivierbarkeit des Enzyms durch sGC aktivierende Substanzen untersucht werden.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Proteinbestimmung

Bradford-Assay

Die Proteinbestimmung von Proben erfolgte mit einem Farbreagenz (Protein Assay, BioRad) basierend auf der Methode von Bradford (1976). Zur Messung des Proteingehaltes wurden 10 µl Probe mit 200 µl Farbstofflösung in einer 96-Well Platte gemischt und 10 min bei RT bis zur Ausbildung stabiler Farbstoff-Protein-Komplexe inkubiert. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen und die Werte gegen eine BSA-Eichreihe kalibriert.

OD₂₈₀-Messung

Proteine absorbieren eingestrahktes Licht aufgrund ihres Gehaltes an aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Extinktion in diesem Bereich ist ein Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung. Da diese Methode keinerlei Verbrauch an Protein hat, wurde sie zur Normierung der sGC-Spektren herangezogen, da hier nur sehr begrenzte Mengen an Probenmaterial zur Verfügung standen.

2.6.2 UV/Vis-Spektroskopische Untersuchungen

Die spektroskopischen Untersuchungen der sGC wurden auf einem Beckman DU 640 Spektrophotometer in einer 50 µl Quarzküvette durchgeführt. Zur Messung einer möglichen, direkten Interaktion verschiedener sGC-Aktivatoren mit dem zentralen Eisenatom des Häms wurden 50 µl aufgereinigte sGC ($\approx 0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit BAY 41-8543 (100 µM), BAY 58-2667 (100 µM) und DEA/NO (1 mM) versetzt und direkt gemessen. Die beiden NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren wurden 100 mM in DMSO gelöst und 1:1000 verdünnt, was einer Endkonzentration an DMSO von 0,1% entspricht, welche keinen Einfluss auf den Test hatte. Zur Untersuchung der Oxidation des Häms und dessen möglicher Verdrängung aus dem Enzym durch BAY 58-2667 wurde die sGC mit BAY 58-2667 (10 µM, 100 µM) in An- und Abwesenheit von ODQ (10 µM) 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend, vor der UV/Vis-Spektroskopie, über Vivapure Anionenaustauscher, wie unter 3.2.7 beschrieben, von ODQ, freiem Häm sowie BAY 58-2667 separiert.

2.6.3 Proteinfärbung von Gelen

Coomassie-Färbung

Die Gele wurden 50 min in der Coomassie-Färbelösung (siehe 2.4.2) bei RT inkubiert. Dadurch wurden die Proteinbanden gefärbt und gleichzeitig durch die in der Färbelösung vorhandene Essigsäure und Methanol in der Gelmatrix fixiert. Anschließend wurden die Banden durch waschen der Gele mit Entfärbelösung (siehe 2.4.2) sichtbar gemacht und auf einem Gelscanner ausgewertet (Densitometer GS-710, BioRad, München). Alternativ wurde die Bio-Safe™ Coomassie Färbelösung von BioRad verwendet, welche sowohl nachträgliches Entfärben als auch die Verwendung von Methanol überflüssig machte. Die gefärbten Gele wurden in einem Geltrockner (Gel Dryer 583, BioRad) auf Filterpapier getrocknet, um z.B. für eine nachfolgende Autoradiographie verwendet werden zu können.

Silber-Färbung

Die Silber-Färbung gehört zu den sensitivsten Nachweisverfahren für Proteine im Gel und kann Proteinmengen im Bereich weniger Nanogramm sicher detektieren. Die Silber-Färbung (siehe 2.4.2) wurde in Anlehnung an das Protokoll von Merril durchgeführt (Merril, 1994):

30 min Inkubation in Fixierlösung
6 x 5 min waschen in MilliQ H₂O
30 min Inkubation in Silberlösung
6 x 5 min waschen in MilliQ H₂O
Inkubation in Entwicklerlösung
Aufbewahrung in MilliQ H₂O

Alternativ wurde die Färbungslösung Silver Stain Plus™ von BioRad verwendet. Die Gele wurden nach der Färbung, wie oben beschrieben, ausgewertet und anschließend getrocknet.

2.6.4 Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen

Zur Untersuchung von Proteinen wurden hauptsächlich diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) verwendet. Als Trägerion wird in diesem Gelsystem Glycin verwendet, im Gegensatz zu der weiter hinten beschriebenen Methode nach

Schägger und Jagow, in der Tricin eingesetzt wird. Das bei dieser Methode verwendete SDS entfaltet und solubilisiert Proteine und maskiert darüber hinaus ihre Eigenladung, so dass eine Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer nativen Ladung bzw. Faltung, möglich ist.

Minigele

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Minigele für das Gelsystem Mini-Protean II (BioRad, München) verwendet. Die aufgetragene Proteinmenge kann, je nach der anschließend verwendeten Detektionsmethode (Silberfärbung, Coomassiefärbung, Westernblot), von 10 ng bis 100 µg variieren. Die zu trennenden Proteinproben wurden mit Laemmli-Probenpuffer (siehe 2.4.3) versetzt und anschließend 5 min bei 95°C erhitzt. Proteine und Zellbestandteile, welche durch diese Behandlung nicht in Lösung gebracht werden konnten, wurden abzentrifugiert (Tischzentrifuge: 10.000 rpm, 3 min). Der Gellauf erfolgte bei 200 V für 45 min im Kühlraum. Im Folgenden ist die Pufferzusammensetzung für vier Minigele, bzw. zwei große Gele, verschiedener Trennkapazität angegeben:

	Sammelgel	7,5% Trenngel	9% Trenngel	10% Trenngel	12% Trenngel
Acrylamid 40% [ml]	1,5	5,6	6,8	7,5	9,0
Tris-SDS pH 6,8 [ml]	7,5	-	-	-	-
Tris-SDS pH 8,8 [ml]	-	15	15	15	15
H ₂ O [ml]	6,0	9,4	8,3	7,5	6
APS [µl]	100	200	200	200	200
Temed [µl]	25	50	50	50	50

Tabelle 2.1: Pufferzusammensetzung für 4 Minigele bzw. 2 große Gele verschiedener Trennkapazität

Große Gele

Zur Trennung eng beieinanderliegender Banden wurden große Gele verwendet. Aufgrund der Länge des Trenngels weisen diese Gele eine größere Trennkapazität auf und können darüber hinaus mit größeren Probenmengen beladen werden. Als Gelsystem wurde die Protean II xi cell™ (BioRad, München) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 20 mA (Sammelgel) bzw. 25 mA (Trenngel) je Gel für ca. 6 h durchgeführt. Die Aufbereitung der Proben in Laemmli-Probenpuffer wurde, wie für die Minigele beschrieben, durchgeführt.

Tris-Tricin Gele

Für die Trennung besonders kleiner Peptidfragmente in einer Größenordnung von 1 bis 10 kDa ist das Tris-Tricin Gelsystem, nach Schägger und Jagow (1987), gut geeignet. Die Verwendung von Tricin führt zu einer größeren Trennkapazität als bei vergleichbaren Tris-Glycin-Gelen nach Laemmli. Darüber hinaus führt das Fehlen von Glycin zu einem niedrigeren Hintergrund bei einer folgenden Sequenzierung (Edman-Abbau), und ein In-Gel-Verdau von Proteinen mit anschließender Eluierung wird durch die geringere Dichte der Acrylamidmatrix erleichtert. Die Aufbereitung der Proben und die Handhabung der Gelsysteme erfolgte wie bei der Tris-Glycin Gelelektrophorese nach Laemmli. Die Elektrophorese wurde 2 h bei 30 V bis zum Eindringen der Proben in das Sammelgel durchgeführt und anschließend ca. 18 h bei konstanten 25 mA pro Gel fortgesetzt.

	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
Acrylamid (40%) mit 6% Bis-Acrylamid [ml]	12,4	-	-
Acrylamid (40%) mit 3% Bis-Acrylamid [ml]	-	1,85	1,25
Tris-Tricin-SDS-Puffer [ml]	10	2,5	3,1
Glycerin [g]	4	-	-
H ₂ O [ml]	3,6	3,4	12,25
APS [μl]	150	25	150
Temed [μl]	30	15	20

Tabelle 2.2: Pufferzusammensetzung für ein großes Tris-Tricin Gel hoher Trennkapazität

2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Vor der Trennung der Proteinproben nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Isoelektrofokussierung (IEF) in Rundgelen durchgeführt. Die Rundgele für die IEF wurden in Glasröhrchen (BioRad, München) mit einem inneren Durchmesser von 2 mm gegossen. Die Röhrchen wurden auf der einen Seite mit Parafilm abgedichtet und vor dem Befüllen auf ca. 40°C erwärmt, damit während des Einfüllens der vorgewärmten Gellösung der gelöste Harnstoff nicht auskristallisierte. Die gegossenen Rundgele wurden mit 20 μl MilliQ H₂O überschichtet, mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei RT bis zur vollständigen Polymerisation der Gelmatrix stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Rundgele in die Gelapparatur (BioRad, München) eingespannt, das überschichtete Wasser durch 20 μl O'Farrel Lysispuffer ersetzt und der Kathoden- und Anodenpuffer in die Gelkammern gefüllt. Zur Ausbildung des pH-Gradienten in den Rundgelen wurde vor der eigentlichen IEF eine Präfokussierung (15 min, 200 V;

30 min, 300 V, 30 min, 400 V) durchgeführt. Die lyophilisierten Proteinproben wurden in 100 µl O'Farrel Lysispuffer aufgenommen, einige Stunden geschüttelt, gevortext und für 2 min ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden die zu fokussierenden Proben (maximal 100 µl) auf die präfokussierten Gele aufgetragen und mit Kathodenpuffer überschichtet. Zwei Gele wurden zur späteren Bestimmung des pH-Gradienten nur mit 100 µl Lysispuffer beladen. Die Fokussierung der Proteinfragmente erfolgte bei einer Spannung von 400 V für 24 h (9600 Vh). Zur Beladung der fokussierten Proteine mit SDS wurden die Rundgele für 20 min bei RT in Äquilibriumspuffer inkubiert und anschließend, zur Auftrennung der Fragmente nach ihrem Molekulargewicht, auf ein 20%iges Tris-Glycin Gel geladen. Die Laufbedingungen für diese zweite Dimension wurden wie oben beschrieben gewählt.

2.6.5 Westernblot

Der Westernblot wurde nach Towbin (1979) durchgeführt. Dabei werden die im Gel (1D- bzw. 2D-PAGE) aufgetrennten Proteine durch Elektrophorese senkrecht zum Gel auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran passender Größe transferiert. Das zu blotende Gel, die Membran und die „Fiberpads“ wurden dazu für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. PVDF-Membranen mussten vor diesem Schritt in Methanol eingeweicht werden, da sie sich aufgrund ihrer Hydrophobizität nur schlecht benetzen ließen. Anschließend wurde ein Sandwich aus Gel, Membran und „Fiberpads“ in einer Blotkassette luftblasenfrei zusammengestellt. Die Kassette wurde in eiskaltem Transferpuffer in die Blotkammer (Mini Trans-Blot Cell™ bzw. Trans-Blot Cell™) gespannt und der Transfer bei einer Spannung von 100 V unter Kühlung für 1 h (Mini Trans-Blot Cell™) bzw. 3,5 h (Trans-Blot Cell™) durchgeführt.

2.6.6 Photoaffinitätslabel-Untersuchungen

Ein Photoaffinitätslabeling ist eine geeignete Methode, die Bindungsstelle einer Substanz an einem bekannten Zielprotein zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurde ein Derivat von BAY 58-2667 mit einer photolabilen Azidogruppe synthetisiert, aus der durch UV-Bestrahlung ein reaktives Nitren entsteht. Dieses Nitren reagiert mit in der Nähe befindlichen Aminosäuren ab und bildet eine kovalente Bindung zwischen der Substanz und dem Protein aus. Zusätzlich wurde eine Tritiummarkierung zur Lokalisierung der Bindungsstelle des PALs eingeführt (³H-BAY 61-2573). Für den Versuch wurden 15 µg sGC (100 pmol) mit einer steigenden Konzentration an ³H-PAL (³H-BAY 61-2573) in An- und

Abwesenheit eines 50-fachen Überschuss an nicht radioaktiven PAL (BAY 61-2573), wie in folgender Tabelle beschrieben, inkubiert.

	³ H-PAL	³ H-PAL + Verdrängung
2 x Inkubationspuffer	100 µl	100 µl
sGC	15 µg (100 pmol)	15 µg (100 pmol)
³H-PAL	1,88 µl / 6,3 µl / 18,8 µl (100, 300, 1000 pmol)	1,88 µl / 6,3 µl / 18,8 µl (100, 300, 1000 pmol)
PAL	-	1,5 µl / 5 µl / 15 µl (5, 15, 50 nmol)
MilliQ H₂O	ad 200 µl	ad 200 µl

Tabelle 2.3: Zusammensetzung eines Ansatzes für das Photoaffinitätslabeling.

Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und mit einer Wellenlänge von 254 nm in einem Abstand von 3 cm für 30 min bestrahlt (UV-Handlampe, Typ N8K). Die gelabelte sGC wurde zur Trennung von nicht gebundenem ³H-PAL mit TCA nach folgenden Protokoll gefällt, gewaschen und in 1 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

TCA-Fällung:

- 22 µl 100% TCA je Probe zugeben (siehe 2.4.6)
- 30 min Inkubation 4°C
- 30 min Zentrifugation (Tischzentrifuge 14000 rpm, 4°C)
- Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- Pellets 2 x mit 500 µl -20°C kalten Ethanol:Ether (1:1) waschen
- Pellets trocknen lassen
- Pellets in 60 µl 1 x Laemmli-Probenpuffer aufnehmen
- Proben 5 min bei 80°C erhitzen

Die Proben wurden anschließend gekühlt, auf ein großes 7,5%iges Polyacrylamid-Gel geladen und, wie beschrieben, elektrophoretisch getrennt (siehe 2.6.4). Die getrockneten Gele konnten anschließend autoradiographiert werden. Für die PAL-Untersuchungen am hämfreien Enzym wurde die UV-Bestrahlung in Gegenwart von 0,5% (v/v) Tween-20 durchgeführt. Da unter diesen Bedingungen bei der

oben beschriebenen TCA-Fällung der sGC das Detergenz ebenfalls ausfiel, wurde eine Chloroform/Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984) nach folgendem Protokoll verwendet:

Chloroform/Methanol-Fällung: 800 µl Methanol je Probe zugeben, vortexen, kurz abzentrifugieren
200 µl Chloroform zugeben, vortexen, kurz abzentrifugieren
600 µl MilliQ H₂O zugeben, stark vortexen
1 min zentrifugieren (Tischzentrifuge: 9000 rpm, 4°C)
Obere Phase abziehen und verwerfen (Protein an der Phasengrenze)
600 µl Methanol zugeben, stark vortexen
2 min zentrifugieren (Tischzentrifuge: 9000 rpm, 4°C)
Lösung vorsichtig abziehen
Pellet in 50 µl 1 x Laemmli-Probenpuffer aufnehmen
Proben 5 min bei 80°C erhitzen

Die Proben wurden anschließend auf ein 8-12% Gradientengel aufgetragen und für 7 h, wie oben beschrieben, elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde getrocknet und auf Photoimagerplatten autoradiographiert.

Zur Eingrenzung des Bereichs der sGC, in dem das ³H-PAL kovalent gebunden war, wurde die ³H-PAL gelabelte sGC durch BrCN chemisch gespalten und die entstandenen radioaktiv markierten Fragmente durch Sequenzierung identifiziert. Dazu wurde 200 µg sGC unter den oben beschriebenen Bedingungen durch UV-Bestrahlung gelabelt und mit TCA gefällt. Nach den Waschstritten wurde das Pellet in 210 µl 100% Ameisensäure gelöst, welche anschließend durch Zugabe von 90 µl MilliQ H₂O auf 70% verdünnt wurde. Zu der gelösten sGC wurde ein Kristall BrCN zugegeben und durch vortexen gelöst. Die Lösung wurde im Dunkeln über Nacht bei RT gelagert. BrCN führt, über eine Umwandlung von Methionin zu Homoserin, zu einer Spaltung des Proteins C-terminal von Methionin. Nach dieser Inkubation wurde der Ansatz mit 1 ml MilliQ H₂O verdünnt und in der SpeedVac eingedampft. Dieser Vorgang wurde, zur vollständigen Entfernung der Ameisensäure und des BrCN, dreimal wiederholt. Die getrockneten und ³H-PAL markierten sGC BrCN-Fragmente wurden bis zur Auftrennung in der 2D-PAGE (siehe 2.6.4) bei -80°C gelagert.

2.6.7 Aufreinigung der sGC über Zentrifugations-Anionenaustauscher

Für die Untersuchung der Oxidation der Hämgruppe der sGC, sowie deren Interaktion mit BAY 58-2667, wurde das Enzym nach erfolgter Inkubation mit ODQ, BAY 58-2667 oder Tween-20 von diesen Komponenten wieder getrennt, um unspezifische Interaktionen in nachfolgenden Tests auszuschließen. Die Aufreinigung kleinster Mengen des Enzyms erfolgte über Zentrifugations-Anionenaustauscher. Diese haben gegenüber klassischen Säulen den Vorteil, dass sie über kein Totvolumen verfügen, was eine konzentrierte Elution des Enzyms stark vereinfacht. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C und 3000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um unspezifische Adsorptionen der sGC an die Säule zu blocken, wurde diese vor der Verwendung nach folgendem Protokoll mit BSA beladen:

Blockieren der Säulen:	400 µl Puffer I	(Äquilibrieren der Säule)
	400 µl 1% BSA in H ₂ O	(Blockieren des Säulenmaterials)
	2 x 400 µl Puffer I	(Überschüssiges BSA entfernen)
	2 x 400 µl Puffer III	(Gebundenes BSA von der Säule lösen)
	4 x 400 µl Puffer I	(Regeneration der Ionenaustauschermatrix)

Um die Trennung von Tween-20, sGC und Porphyrin zu etablieren, wurde ein Testansatz aus Tween-20, BSA und ZnPP zusammengegeben und über die Ionenaustauscher aufgereinigt. Für diesen Testansatz wurde ZnPP als Porphyrin gewählt, da es aufgrund seiner starken Absorption bei 421 nm noch in wesentlich geringeren Konzentrationen als Häm spektrometrisch detektierbar war.

ZnPP-Testansatz:	10 µl Inkubationspuffer, pH 8,0
	15 µl BSA (1 µg/µl)
	10 µl 20% Tween-20
	5 µl 500 µM ZnPP
	ad 100 µl MilliQ H ₂ O

Zur Untersuchung der hämfreien oder oxidierten sGC, bzw. der Interaktion zwischen der Hämgruppe und BAY 58-2667, wurden jeweils 100 µl Ansätze der sGC mit BAY 58-2667 (10 µM, 100 µM) in An- und Abwesenheit von ODQ (10 µM) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend über Ionenaustauschersäulen aufgereinigt.

sGC-Inkubationsansatz: 10 µl Inkubationspuffer, pH 8,0
50 µl sGC (0,3 µg/µl)
10 µl 20% Tween-20 / 10 µM ODQ / 10 µM, 100 µM BAY 58-2667
ad 100 µl MilliQ H₂O

Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit eiskaltem Puffer I auf 400 µl aufgefüllt und zur Trennung der sGC über die Zentrifugations-Ionenaustauscher gegeben. Aufreinigung und Elution der sGC erfolgte nach folgendem Protokoll:

Aufreinigung der sGC:	400 µl Probenvolumen	(100 µl Ansatz + 300 µl Puffer I)
	400 µl Durchfluss	(Durchfluss wieder auf die Säule geben)
	200 µl Puffer I	(Waschen)
	60 µl Puffer II	(sGC Elution: Hauptfraktion)
	100 µl Puffer II	(sGC Elution: Nebenfraktion)
	200 µl Puffer III	(Kontrolle)

Jedem Beladen der Säulen folgte ein Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge: 3000 rpm, 4°C, 5 min).

2.6.8 sGC Aktivitäts-Assay

Aktivitätsmessung am hämhaltigen Enzym

Die Aktivität der gereinigten sGC bzw. von sGC enthaltenden Zellhomogenaten wurde durch die enzymatische Konversion von [α -³²P]-GTP zu [³²P]-cGMP nach einer Methode von Hönicka (1999) gemessen. Das Enzym wurde je nach Reinheit und Aufarbeitung vor dem Assay in Probenpuffer verdünnt.

Assayansatz: 40 µl Inkubationspuffer
20 µl sGC bzw. Zellhomogenat
20 µl Aktivator- bzw. Inhibitor-Lösung
20 µl Substratlösung

Alle Komponenten, mit Ausnahme der Substratlösung, wurden auf Eis zusammengegeben. Nach einer Vorwärmphase von 3 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 20 µl der GTP-

Substratlösung gestartet, und nach weiteren 10 min durch Zugabe von 400 µl Zinkacetat (100 mM) und 500 µl Natriumcarbonat (120 mM) gestoppt. Nicht umgesetztes GTP kopräzipitiert mit dem gebildeten Zinkcarbonat als weißer Niederschlag und wurde anschließend abzentrifugiert (5 min, 2800 rpm, 4°C). Der Überstand (1 ml) wurde über mit Tris-HCl (100 mM, pH 7,5) äquilibrierte Aluminiumoxidsäulen (Säulenvolumen: 1 ml) chromatographiert, um verbliebenes GTP aus der Probe zu entfernen. Das gebildete cGMP wurde mit einer Ausbeute von 60% durch Zugabe von 10 ml Tris-HCl (100 mM, pH 7,5) eluiert und in 20 ml Szintillationsröhrchen aufgefangen. Die Aktivität der einzelnen Proben wurde anschließend in einem Flüssig-Szintillations-Counter gemessen und die spezifische Aktivität der Enzymprobe nach folgender Gleichung bestimmt.

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{\mu\text{M}}{\mu\text{g} \times \text{min}} \right] = \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Leerwert}}}{\text{cpm}_{\text{Eingesetzte Aktivität}}} \times \frac{\text{GTP}_{\mu\text{M}}}{W \times t_{\text{min}} \times P_{\mu\text{g}}}$$

W = Wiederfindungsrate (0,6)

P = Enzymmenge [µg]

t = Zeitdauer des Assays [min]

Aktivitätsmessung am hämfreien Enzym

Um die Wirkung verschiedener sGC-Aktivatoren an der hämfreien sGC zu testen, wurde das Enzym nach einer Methode von Förster (Förster *et al.*, 1996) hämfrei gemacht. Dazu wurde das Enzym in Probenpuffer (siehe 2.4.9) mit 0,5% Tween-20 für 5 min bei 37°C inkubiert, was zu einem Verlust der prosthetischen Hämgruppe führt. Damit es während des Assays nicht zu einer Rekonstitution der sGC mit Häm kommen konnte, enthielt der Inkubationspuffer ebenfalls 0,5% Tween-20. Der Assay wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt (Hönicka *et al.*, 1999).

Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max}

Zur Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte sowohl, des nicht aktivierten als auch des durch die sGC-Aktivatoren BAY 41-8543, BAY 58-2667 sowie DEA/NO aktivierten Enzyms, wurde der sGC Aktivitätsassay mit einer steigenden Konzentration an GTP (12,5, 25, 50, 100, 200 und 400 µM), wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Konzentration der jeweiligen Substanzen war 10 µM (BAY 41-8543), 100 nM (BAY 58-2667) und 10 nM (DEA/NO). Die Linearität der Reaktion für die Messdauer von 10 min wurde in Vortests gezeigt.

Bestimmung der Halbwertzeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes

Zur Bestimmung der Halbwertzeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes wurde der sGC Aktivitätsassay nach einer modifizierten Methode von Russwurm durchgeführt (Russwurm *et al.*, 2002). Das Häm der sGC wurde in einem ersten Schritt mit NO gesättigt und anschließend in Inkubationspuffer verdünnt, welcher in hohem Überschuss den NO-Scavenger PTIO enthielt. Das freie NO und solches, das wieder vom Nitrosyl-Häm-Komplex abdiffundierte, wurden dadurch unmittelbar abgefangen. Dadurch ließ sich die Stabilität des Nitrosyl-Häm-Komplexes anhand des gebildeten cGMP verfolgen, und hieraus die Halbwertzeit durch nicht-lineare Regression bestimmen (Russwurm *et al.*, 2002). Zu diesem Zweck wurden 2 µg sGC in einem Volumen von 20 µl mit 50 µM DEA/NO für 165 s bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden GTP und MgCl₂ (Endkonzentration 40 nM GTP, 400 nM MgCl₂) zugegeben und für weitere 15 s inkubiert. Daraufhin wurde das Enzym 1:100 in 2 ml 37°C warmen Inkubationspuffer, der eine Konzentration von 65 µM des NO-Scavengers PTIO enthielt, verdünnt. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9, 15, 30 und 45 s wurde ein 100 µl Aliquot entnommen, die Reaktion gestoppt und das gebildete [³²P]-cGMP bestimmt. Zur Messung einer Beeinflussung der Stabilität des Nitrosyl-Häm-Komplexes durch die zwei Klassen von sGC-Aktivatoren wurde die sGC, wie beschrieben, mit 50 µM DEA/NO in Anwesenheit von 10 µM des sGC-Stimulators BAY 41-8543 bzw. 1 µM des sGC-Aktivators BAY 58-2667 vorinkubiert. Bedingt durch den starken überadditiven Effekt von BAY 41-8543 und NO wurde der Test für diese Verbindung nur mit 0,1 µg sGC durchgeführt, um eine Substratverarmung bzw. Produkthemmung der sGC zu vermeiden. Darüber hinaus wurden für diese Substanz weitere Aliquots zu den Zeitpunkten 60, 90, 120, 180, 240, 300, 600, 1200, 1800 und 2400 s entnommen. Zur Bestimmung der Basal- und Maximalaktivität der sGC, sowie der Halbwertzeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes aus der cGMP Akkumulation, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{cGMP}_{\text{Akkumuliert}}(t) = -\frac{1}{\ln 2} \times t_{0,5} \times (\text{Aktivität}_{\text{Max}} - \text{Aktivität}_{\text{Basal}}) \times \left(e^{\frac{\ln 2 \times t}{t_{0,5}}} - 1 \right) + t \times \text{Aktivität}_{\text{Basal}}$$

Aktivität_{Max} = Maximale katalytische Aktivität zum Zeitpunkt t = 0

Aktivität_{Basal} = Basale katalytische Aktivität zum Zeitpunkt t = unendlich, dem sich die momentane katalytische Aktivität asymptotisch annähert

t_{0,5} = Halbwertzeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes

Die drei Variablen $\text{Aktivität}_{\text{Max}}$, $\text{Aktivität}_{\text{Basal}}$ und die Halbwertszeit $t_{0,5}$ wurden zur Anpassung der Regression an die gemessenen Daten variiert und gingen anschließend in die folgende Formel zur Darstellung der Veränderung der spezifischen Aktivität über die Zeit ein:

$$\text{sGC Aktivität}_{\text{aktuell}}(t) = (\text{Aktivität}_{\text{Max}} - \text{Aktivität}_{\text{Basal}}) \times e^{-\frac{\ln 2 \times t}{t_{0,5}}} + \text{Aktivität}_{\text{Basal}}$$

2.6.9 Rezeptorbindungsstudien

Sättigungsbindung

Für die Messung der Bindungskonstante K_D des sGC-Aktivators BAY 58-2667 wurde ein Rezeptorbindungsassay etabliert. Die Trennung von gebundenem und freiem radioaktiven Liganden erfolgte mittels Vakuumfiltration über 96er Glasfaserfilterplatten. Zur Reduktion der unspezifischen Bindung von ^3H -BAY 58-2667 an die Filter auf unter 1% der eingesetzten Radioaktivität wurden diese nach einem von Scott beschriebenen Protokoll beschichtet (Scott *et al.*, 1995).

Filterplattenbeschichtung: 200 μl PVP-Beschichtungslösung (siehe 2.4.5)
Inkubation bei RT für mindestens 3 h
6 x waschen der Platte mit 200 μl eiskaltem Waschpuffer

Zur Messung der Bindungskonstante K_D wurde die sGC mit ^3H -BAY 58-2667 in steigender Konzentration von 0,1 nM über 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 bis 300 nM in An- und Abwesenheit eines mindestens 100-fachen Überschusses an nicht radioaktivem BAY 58-2667 inkubiert. Zur schnellen Einstellung eines Gleichgewichts aus Assoziation und Dissoziation des sGC-Aktivators an das Enzym wurde radioaktiver und nicht-radioaktiver Ligand, vorher zusammen 10-fach konzentriert, in ACN:H₂O (60:40) angesetzt und gemeinsam in den jeweiligen Ansatz pipettiert. Die Zusammensetzung einer Probe war wie folgt:

Assayansatz: 20 μ l 5 x Inkubationspuffer, pH 7,5(siehe 2.4.5)
 2 μ l sGC (0,3 μ g/ μ l)
 58 μ l H₂O
 10 μ l H₂O bzw. ODQ (100 μ M)
 10 μ l Ligandenmix

Die Proben wurden anschließend zur Einstellung eines Bindungsgleichgewichtes 10 min bei 37°C inkubiert und für weitere 10 min auf Eis gekühlt. Die Fällung der sGC erfolgte durch Zugabe von 15 μ l eiskaltem IgG-Puffer (Konzentration IgG im Ansatz: 0,75 μ g/ μ l) und anschließender Präzipitation durch Zugabe von 85 μ l eiskaltem PEG-Puffer (Demoliou-Mason *et al.*, 1984). Das präzipitierte Protein wurde anschließend auf die Filterplatte gegeben und ungebundener Ligand durch Anlegen eines Vakuums abgesaugt. Die Proben wurden zweimal mit eiskaltem 1 x Inkubationspuffer gewaschen, die Filter anschließend aus der Platte entfernt und für 3 h in 500 μ l ACN:H₂O (60:40) bei 50°C und 1000 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Diese Lösungen wurden anschließend mit den Filtern in 20 ml Szintillationsröhrchen überführt und mit 10 ml Szintillator (Ultima Gold, Packard BioScience, Groningen, Niederlande) gemischt. Die Messung der Menge an gebundenem Liganden erfolgte mittels eines Flüssig-Szintillations-Counters.

Kompetitionsbindung

Nach Bestimmung des K_D -Wertes und der Sättigungs-Bindungskurve für BAY 58-2667 konnte im Folgenden die Verdrängung von ³H-BAY 58-2667 durch andere NO-unabhängige sGC-Aktivatoren getestet und deren K_i -Werte berechnet werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl homologe- als auch heterologe Verdrängungsexperimente mit verschiedenen NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren durchgeführt. Die Versuchsdurchführung war analog zum oben beschriebenen Ablauf, jedoch mit konstanter Konzentration ³H-BAY 58-2667 von 100 nM bzw. 300 nM, welche nach den Ergebnissen der Sättigungsbindung gerade den Bereich maximaler Sättigung erreichte. Zur schnellen Einstellung eines Gleichgewichts aus Assoziation und Dissoziation wurde radioaktiver und nicht-radioaktiver Ligand, vorher zusammen 10-fach konzentriert in ACN:H₂O (60:40), angesetzt und gemeinsam in den jeweiligen Ansatz pipettiert.

2.6.10 In-Gel-Spaltung der sGC durch Endoproteinase LysC

Zur genauen Bestimmung der durch das Photolabeling markierten Aminosäure in der β -Untereinheit der sGC wurden getrocknete SDS-PAGE Gele in MilliQ H₂O über Nacht rehydriert, vom Untergrund gelöst und die radioaktiv markierte Bande der sGC β -Untereinheit mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das die β -Untereinheit der sGC enthaltende Gelstück in kleine Schnipsel geschnitten, mit einem Pistill in MilliQ H₂O homogenisiert und abschließend in der SpeedVac vollständig getrocknet. Die in diesem Gelbrei enthaltende sGC β -Untereinheit wurde anschließend nach folgendem Protokoll in der Gelmatrix durch Endoproteinase LysC gespalten:

In-Gel LysC-Spaltung: 2-5 μ l 200 mM ABC-Puffer + 0,02% Tween-20 je Bande einquellen lassen
1 μ g LysC (0,1 μ g/ μ l) je Bande einquellen lassen und mischen
100 mM Tris-HCl zur Quellung und Bedeckung des Gelhomogenats zugeben
Inkubation 21 h bei 37°C
Zentrifugieren (Tischzentrifuge: 5 min, 14.000 rpm, RT)
Überstand abnehmen und sammeln
50 μ l 60% ACN zugeben und mixen
Inkubation im Thermoschüttler (15 min, 500 rpm, 37°C)
Zentrifugieren (Tischzentrifuge: 5 min, 14000 rpm, RT)
Überstand abnehmen und sammeln
Peptidextraktion weitere zweimal wiederholen
Alle 4 Überstände zusammengeben
Zentrifugieren (Tischzentrifuge: 5 min, 14000 rpm, RT)
Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen, Gelstücke zurücklassen
Je nach Volumen Probe in der SpeedVac eindampfen
5 μ l Probe zu Messung der Radioaktivität verwenden
Restliche Probe für Trennung über SMART μ C₁₈-Säule verwenden

2.6.11 Trennung von Peptidgemischen auf dem SMART® HPLC-System

Zur Auftrennung der bei der In-Gel LysC-Spaltung entstandenen Peptidfragmente wurde das SMART®-HPLC System der Firma Pharmacia verwendet, da es speziell für die Trennung kleinster Probenmengen ausgelegt ist. Die Trennung der Peptidfragmente erfolgte auf einer μC_{18} -Säule (Durchmesser 2 mm, Länge 10 cm) mittels eines linearen ACN/TFA Gradienten. Als Fließmittel A wurde 0,1% TFA, als Fließmittel B 0,1% TFA mit 60% ACN verwendet. Die Flussrate betrug 150 $\mu\text{l}/\text{min}$.

HPLC-Trennprotokoll:	20 min Fließmittel A	(Auswaschen des DTT)
	5 min 100% Fließmittel A	
	50 min linearer Anstieg auf 100% Fließmittel B	
	5 min 100% Fließmittel A	(Regeneration der Säule)

Die Fraktionierung des HPLC-Durchlaufs startete mit Beginn des linearen Gradienten. Es wurden insgesamt 48 Fraktionen von jeweils 150 μl gesammelt. 5-10 μl jeder Fraktion wurden mit 4 ml Szintillator (Ultima Gold, Packard BioScience, Groningen, Niederlande) gemischt und im Flüssig-Szintillations-Counter gemessen. Die Peptide der radioaktiven Fraktionen wurden in einer anschließenden Rechromatographie auf einem Phosphatpuffer/ACN-Gradienten getrennt. Als Fließmittel A wurde 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) verwendet. Fließmittel B enthielt zusätzlich 60% ACN. Die Chromatographie erfolgte, nach dem oben beschriebenen Trennprotokoll, ohne isokratischen Waschschrift. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen der Rechromatographie wurde, wie oben beschrieben, gemessen und die radioaktiven Fraktionen durch Edman-Abbau sequenziert.

2.7 Zellkultur

2.7.1 Prokaryotische Zellen

Es wurden zwei verschiedene Stämme *E. Coli* verwendet. Für sämtliche Transformationen von Klonierungen und Mutagenesen, sowie zur Vermehrung von Plasmiden, wurden „XL1-Blue supercompetent cells“ *E. Coli* von Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Die Versuche zur Expression des N-terminalen Fragments der β -Untereinheit der sGC wurden im *E. Coli*-Stamm BL21 (pLysS) DE3 von Novagen (Madison, USA) durchgeführt. Beide Stämme wurden in LB-Medium, bzw. auf LB-Agarplatten, bei 37°C kultiviert. Die Kulturen der BL21-*E. Colis* enthielten darüber hinaus noch Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zur Selektion des pLysS-Plasmids, welches das T7-Lysozym codiert.

2.7.2 Eukaryotische Zellen

Zum Testen der Aktivität der einzelnen sGC-Mutanten, wurde eine auf CHO-Zellen basierende cGMP-Reporterzelllinie verwendet (Wunder *et al.*, 2003). Diese Zelllinie wurde stabil transfiziert mit dem cGMP-gesteuerten Kationenkanal CNG2 (Kaupp *et al.*, 2002) sowie mit Aequorin (Hastings *et al.*, 1969; Shimomura *et al.*, 1970; Dupriez *et al.*, 2002). Das Medium für diese Reporterzelle war folgendermaßen zusammengesetzt:

500 ml MEM Alpha-Medium
50 ml FCS (10%)
5 ml Penstrep (1%)
5 ml Glutamin (1%)
1250 μl Zeocin (0,25 mg/ml)

Die Zellen wurden alle drei Tage mit Zell-Dissoziationspuffer aus den Kulturflaschen abgelöst und 1:10 verdünnt in neue Flaschen (150 cm^2) passagiert.

3. Ergebnisse

3.1 UV/Vis-Spektroskopische Untersuchungen

3.1.1 Interaktion von BAY 41-8543 bzw. BAY 58-2667 mit dem zentralen Hämeisen der sGC

Substanzen, welche über eine direkte Interaktion mit dem zentralen Eisenatom der Hämgruppe ihre Wirkung entfalten, führen zu einer Verschiebung der charakteristischen, bei 431 nm liegenden Soretbande der sGC. So verursacht die Bindung von NO an die Hämgruppe eine Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 398 nm, wohingegen die Oxidation des Eisens zu einer Verschiebung nach 392 nm führt. Eine direkte Interaktion von BAY 41-8543 und BAY 58-2667 mit dem zentralen Eisen des Häms sollte ebenfalls zu einer Veränderung der Soretbande führen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde gereinigte sGC in An- und Abwesenheit von NO mit jeweils 100 μM beider Substanzen inkubiert und anschließend ein UV/Vis-Spektrum aufgezeichnet. NO verursachte eine Verschiebung der Soretbande zu 398 nm während weder BAY 41-8543 (Abb. 3.1A), noch BAY 58-2667 (Abb. 3.1B) allein oder in Kombination mit NO einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum hatten. Eine direkte Interaktion beider Substanzen mit dem zentralen Eisenatom ist nach diesen Befunden unwahrscheinlich.

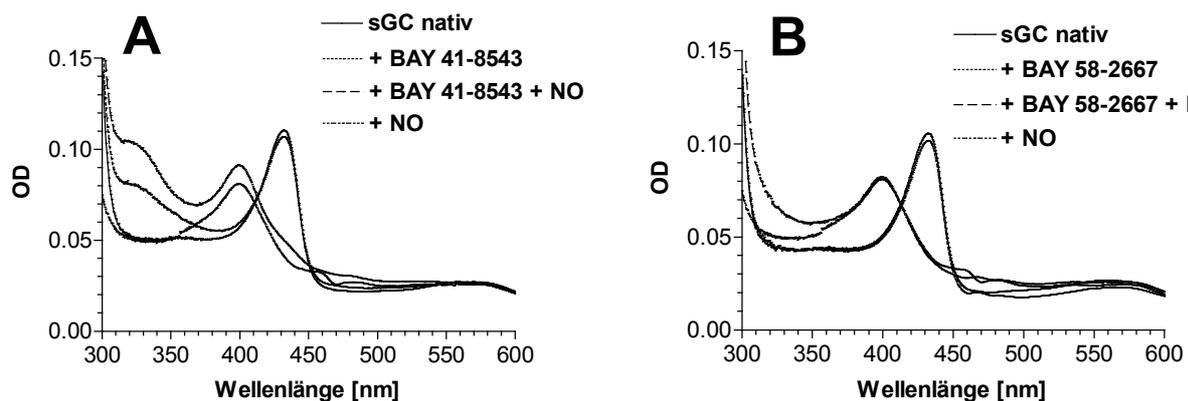


Abbildung 3.1 Die UV/Vis-Spektren der sGC wurden, wie unter 2.6.2 beschrieben, aufgenommen. Es wurden 15 μg sGC mit 1 μM DEA/NO, 100 μM BAY 41-8543 (A) und 100 μM BAY 58-2667 (B) in einem Volumen von 100 μl inkubiert.

3.1.2 Konkurrenz zwischen BAY 58-2667 und der Hämgruppe der sGC

Zur Untersuchung einer möglichen Konkurrenz zwischen BAY 58-2667 und der Hämgruppe der sGC wurde das Enzym, wie unter 2.6.2 beschrieben, mit BAY 58-2667 in An- oder Abwesenheit von ODQ inkubiert. Da bei einer möglichen Verdrängung der Hämgruppe diese im Testansatz in Lösung vorliegt, und durch ihre Absorption das UV/Vis-Spektrum des am Enzym verbliebenen Häms stört, musste für diese Fragestellung (im Gegensatz zu der in 3.1.1) die sGC nach der Inkubation chromatographiert werden (siehe 2.6.7). Freies in Lösung vorliegendes Häm wurde dabei von der Säulenmatrix gebunden und somit aus dem Ansatz entfernt. Als Kontrolle wurde sowohl unbehandelte als auch mit ODQ oxidierte sGC mitgeführt. Abb. 3.2A zeigt die Soretbande der nativen, reduzierten sGC bei 431 nm und das Absorptionsmaximum der oxidierten sGC bei 392 nm.

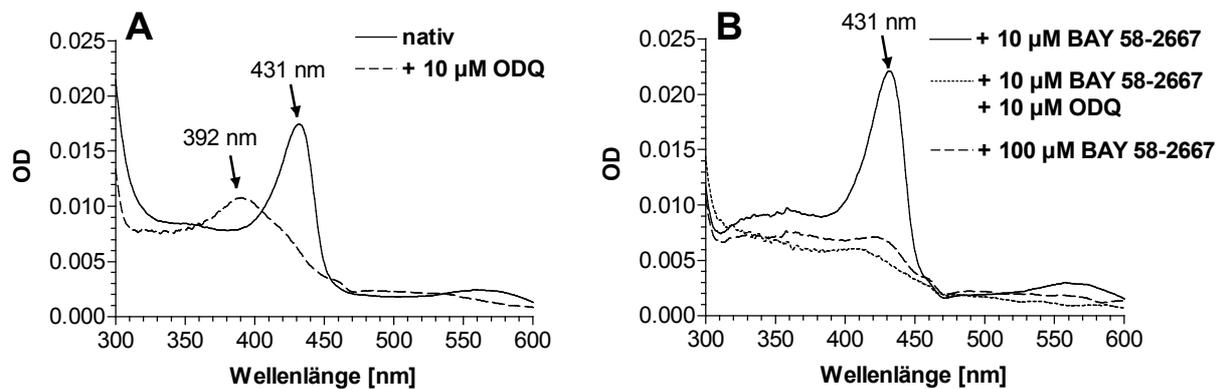


Abbildung 3.2 Die UV/Vis-Spektren der sGC wurden, wie unter 2.6.2 beschrieben, aufgenommen. Es wurden 15 µg sGC mit BAY 58-2667 (10 µM, 100 µM) in An- oder Abwesenheit von ODQ (10 µM) inkubiert und anschließend, vor Aufnahme der UV/Vis-Spektren, chromatographiert.

Wie in Abb. 3.2B gezeigt, führte die Inkubation des Enzyms mit 10 µM BAY 58-2667 zu keiner Veränderung des Absorptionsverhaltens der sGC gegenüber der Kontrolle. In Anwesenheit von ODQ verursachte die gleiche Konzentration jedoch die Entfernung der prosthetischen Hämgruppe des Enzyms. Wurde die Konzentration von BAY 58-2667 auf 100 µM erhöht, kam es auch ohne Oxidation zur Verdrängung der Hämgruppe (Abb. 3.2B).

3.2 sGC-Aktivierung durch NO, BAY 41-8543 und BAY 58-2667

3.2.1 Aktivitätsprofile von BAY 41-8543 und BAY 58-2667

Zur Charakterisierung des Häm-abhängigen sGC-Stimulators BAY 41-8543 und des Häm-unabhängigen sGC-Aktivators BAY 58-2667 wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven der jeweiligen Substanzen alleine und in Kombination mit verschiedenen NO-Konzentrationen sowie ODQ bestimmt. Abb. 3.3 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Die Basalaktivität des Enzyms war in diesen Versuchen 158 ± 13 (A) bzw. 111 ± 11 (B) $\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. BAY 41-8543 führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der sGC-Aktivität bis zu einer maximalen Aktivierung um den Faktor 66. In Kombination mit 10 nM des NO-Donors SIN-1, einer Konzentration die selber kaum eine aktivierende Wirkung hatte (2,5-fach), zeigte sich ein starker überadditiver Effekt auf die Enzymaktivierung durch beide Aktivatoren, welcher in Gegenwart von 100 nM SIN-1 eine maximale Stimulation um den Faktor 202 erreichte. Eine Inkubation mit dem sGC-Inhibitor ODQ senkte die maximale Aktivierung durch BAY 41-8543 um 71%. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte BAY 58-2667 eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Enzymaktivität bis zu einem Maximum um den Faktor 30. Die Inkubation des Enzyms mit 10 nM und 100 nM DEA/NO führte zu einer Aktivierung um den Faktor 17 bzw. 94. In Kombination zeigte BAY 58-2667 und DEA/NO nur einen additiven Effekt über den gesamten Konzentrationsbereich bis zu einer maximalen sGC-Aktivierung von 45-fach bzw. 124-fach.

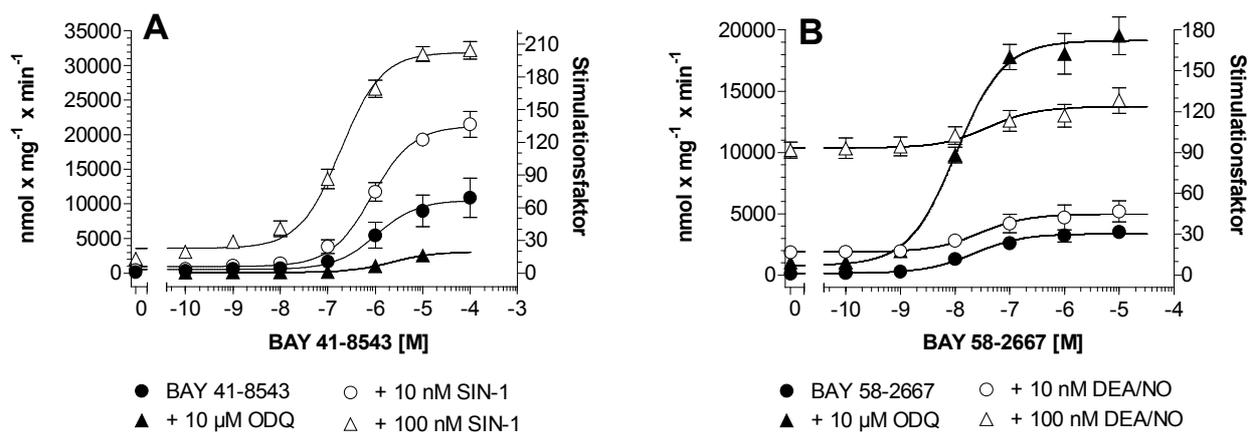


Abbildung 3.3: Die sGC wurde mit steigenden Konzentrationen von BAY 41-8543 (A) bzw. BAY 58-2667 (B) in An- und Abwesenheit eines NO-Donors (10 nM, 100 nM) bzw. ODQ (10 μM) inkubiert und ihre spezifische Aktivität ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM vier bis acht unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

Die Zugabe von 10 μM ODQ führte zu einer starken Potenzierung der Wirkung von BAY 58-2667, bis zu einem Faktor von 173 gegenüber der Basalaktivität. Die jeweiligen maximalen Aktivierungsfaktoren und die aus der nicht-linearen Regression berechneten EC_{50} -Werte sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

	BAY 41-8543		BAY 58-2667	
	EC_{50} [nM]	Faktor	EC_{50} [nM]	Faktor
sGC-Aktivator [100 pM – 100 μM]	1047 \pm 296	66,5 \pm 3,2	21,6 \pm 2,7	30,2 \pm 0,6
+ SIN-1 [10 nM]	849 \pm 125	135 \pm 2,1	-	-
+ SIN-1 [100 nM]	28,4 \pm 3,9	222 \pm 2,6	-	-
+ DEA/NO [10 nM]	-	-	28,0 \pm 8,6	44,8 \pm 1,2
+ DEA/NO [100 nM]	-	-	39,7 \pm 15,6	124 \pm 1,8
+ ODQ [10 μM]	2317 \pm 321	19,4 \pm 0,6	10,4 \pm 0,7	172 \pm 1,7

Tabelle 3.1: Die Tabelle zeigt die aus der Abbildung 3.3 bestimmten EC_{50} -Werte und die maximalen Stimulationsfaktoren der durch die verschiedenen sGC-Aktivatoren induzierten Enzymaktivität. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM vier bis acht unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

Abbildung 3.4 zeigt eine konzentrationsabhängige sGC-Aktivierung durch BAY 41-8543 alleine und in Kombination mit 1 μM BAY 58-2667. Beide Substanzen führten in Kombination zu einem additiven Effekt auf die Enzymaktivität. Dieser additive Effekt, sowie die oben gezeigten unterschiedlichen Aktivierungsprofile beider Substanzklassen alleine und in Kombination mit NO bzw. ODQ belegen, dass die sGC-Aktivierung durch BAY 41-8543 und BAY 58-2667 durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird.

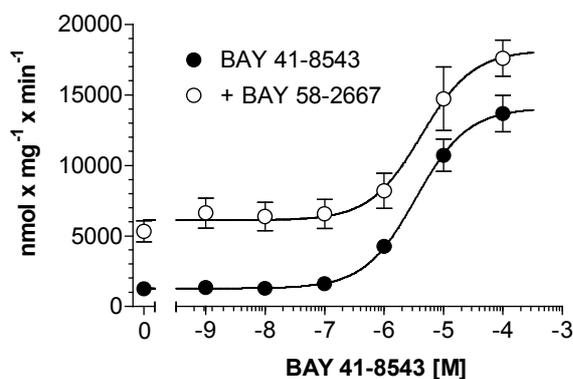


Abbildung 3.4: Die sGC wurde mit steigenden Konzentrationen von BAY 41-8543 in An- und Abwesenheit von BAY 58-2667 (1 μM) inkubiert und die spezifische Aktivität ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM vier unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

3.2.2 Kinetische Parameter der BAY 41-8543 und BAY 58-2667 aktivierten sGC

Die unterschiedlichen Charakteristika der Aktivierungsprofile von BAY 41-8543 und BAY 58-2667 sowie der additive Effekt beider Substanzen auf die Enzymaktivierung legten nahe, dass die Wirkung beider Substanzklassen über verschiedene Mechanismen vermittelt wird. Aus diesem Grund wurden die kinetischen Parameter K_m und V_{max} der sGC unter Basalbedingungen sowie in Anwesenheit von BAY 41-8543 (10 μ M) bzw. BAY 58-2667 (100 nM) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration GTP bestimmt. Darüber hinaus wurde das Enzym mit BAY 41-8543 sowie BAY 58-2667 in Kombination mit NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) inkubiert (siehe 2.6.8). In der Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung als nicht-lineare Regression (A, C, E), bzw. als Lineweaver-Burk Diagramm (B, D, F), dargestellt. Die aus den nicht-linearen Regressionen bestimmten K_m und V_{max} Werte sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
	[μ M]	[μ mol x mg^{-1} x min^{-1}]	[μ M]	[μ mol x mg^{-1} x min^{-1}]
Basal	74.2 \pm 9.2	0.13 \pm 0.02	1	1
DEA/NO	119 \pm 16.7	1.49 \pm 0.08	1.6	11.1
BAY 41-8543	79.3 \pm 14.8	11.5 \pm 0.77	1.1	86.0
BAY 41-8543 + DEA/NO	135 \pm 7.3	62.0 \pm 1.40	1.8	463
BAY 41-8543 + ODQ	183 \pm 11.3	4.08 \pm 0.12	2.5	30.4
BAY 58-2667	56.1 \pm 13.1	3.40 \pm 0.26	0.8	25.4
BAY 58-2667 + DEA/NO	70.9 \pm 13.6	4.93 \pm 0.33	1.0	36.8
BAY 58-2667 + ODQ	90.6 \pm 4.0	14.2 \pm 0.23	1.2	106

Tabelle 3.2: Die Tabelle zeigt in der linken Hälfte die aus der Abbildung 3.5 bestimmten kinetischen Parameter K_m und V_{max} unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. In der rechten Tabellenhälfte sind die links gezeigten kinetischen Parameter als Faktor normiert auf die basalen K_m und V_{max} -Werte angegeben. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM vier bis acht unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der kinetischen Parameter zeigen, dass sowohl NO, BAY 41-2272 als auch BAY 58-2667 ihre aktivierende Wirkung über eine Steigerung der maximalen katalytischen Aktivität V_{max} vermitteln, während die Affinität zum Substrat GTP sich unter allen getesteten

Bedingungen kaum veränderte (siehe Tabelle 3.2). Die im Aktivitätstest beobachteten Charakteristika beider Substanzen spiegeln sich in den ermittelten V_{\max} -Werten wieder. Es konnte sowohl der additive Effekt von BAY 58-2667 und NO als auch die potenzierenden Wirkungen von BAY 41-8543 mit NO bzw. BAY 58-2667 mit ODQ auf die sGC Aktivität beobachtet werden.

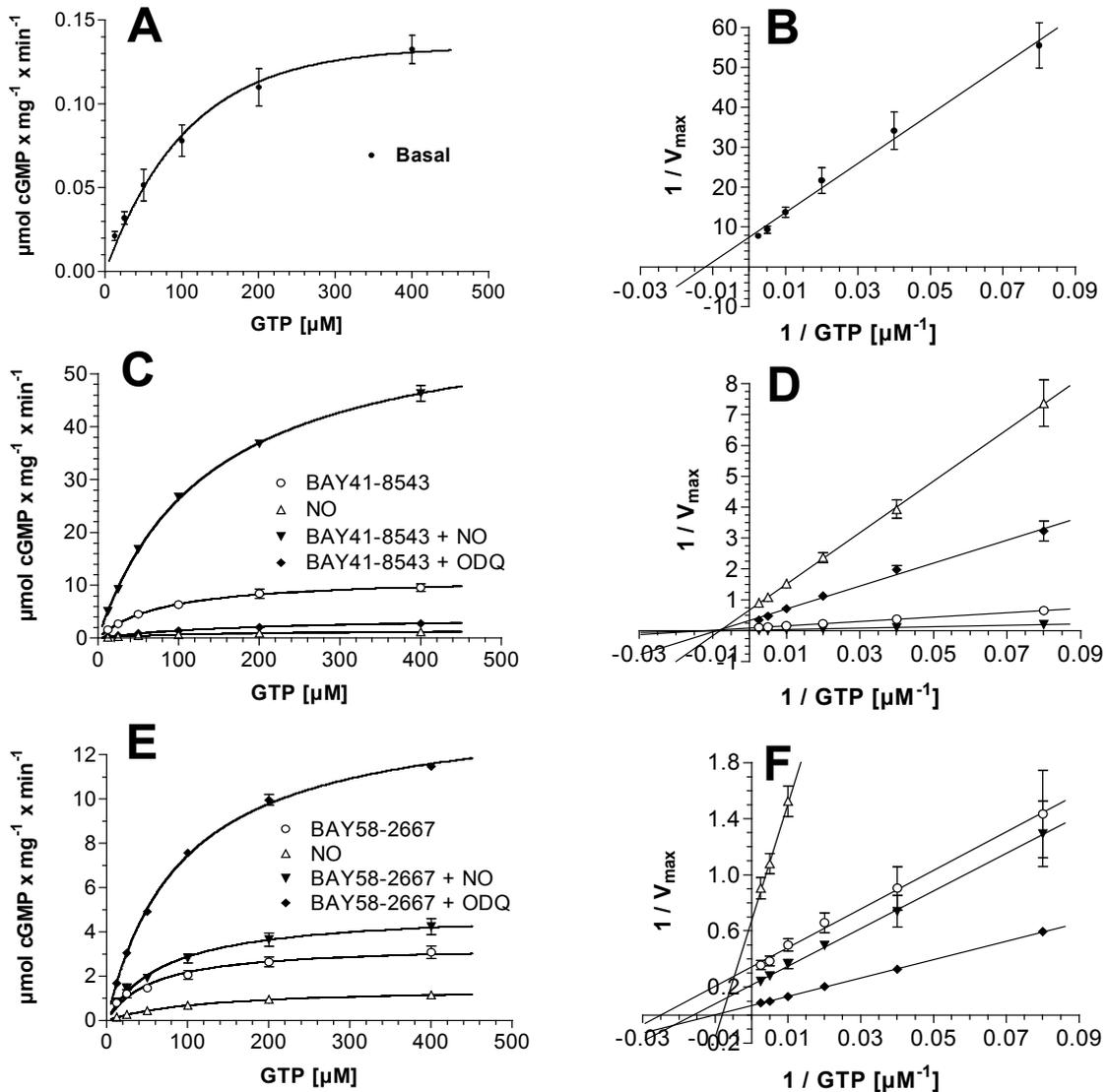


Abbildung 3.5: Die sGC wurde mit steigender Konzentration GTP unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und die spezifische Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) bestimmt. Die linke und rechte Spalte zeigen die gleichen Daten als nicht-lineare Regression (A, C, E), bzw. als Lineweaver-Burk-Diagramm (B, D, F). Gezeigt ist das native (A, B), bzw. das mit 10 μM BAY 41-8543 (C, D) und 100 nM BAY 58-2667 (E, F), inkubierte Enzym. DEA/NO und ODQ wurden 10 nM bzw. 10 μM eingesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM vier bis acht unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

3.2.3 Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes

Sowohl die Ergebnisse des sGC-Aktivitätstests als auch die Bestimmung der kinetischen Parameter zeigten eine starke Potenzierung der NO-vermittelten sGC-Aktivierung durch BAY 41-8543, welche für BAY 58-2667 nicht zu beobachten war. Um die Unterschiede beider Substanzen im Hinblick auf diesen Synergismus näher zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes in An- und Abwesenheit von BAY 41-8543, bzw. BAY 58-2667, bestimmt. Dazu wurde das Enzym durch Zugabe von DEA/NO mit NO gesättigt und dadurch maximal aktiviert. Anschließend wurde das NO aus der Lösung mit Hilfe des NO-Scavengers PTIO abgefangen und die Abnahme der sGC-Aktivität über die Zeit verfolgt (siehe 2.6.8). In der Abbildung 3.6 sind die Daten dieser Versuche zusammengefasst und die ermittelte jeweilige Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes angegeben.

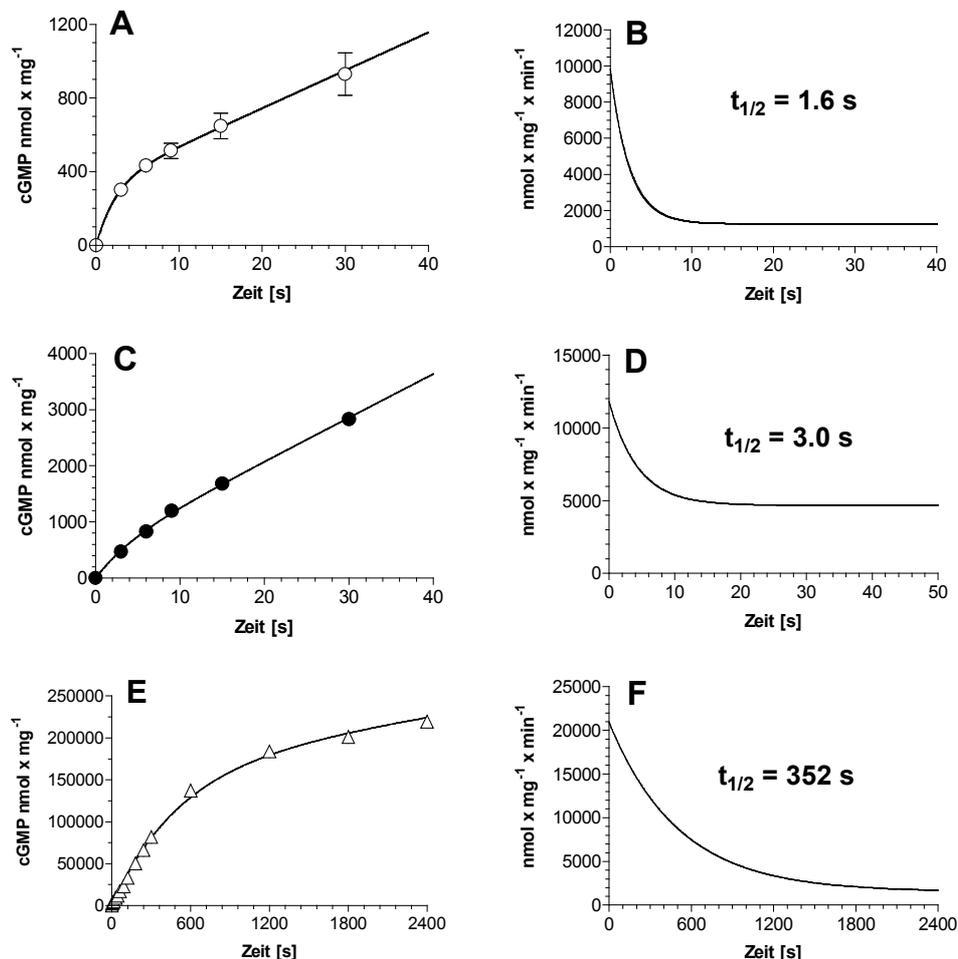


Abbildung 3.6: Bestimmung der Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes für das native (A, B), bzw. für das durch 1 μM BAY 58-2667 (C, D) und 10 μM BAY 41-8543 aktivierte (E, F), Enzym. Die linke Spalte zeigt die cGMP-Akkumulation ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1}$), die rechte Spalte die Abnahme der spezifischen Aktivität ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) über die Zeit. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM aus sechs unabhängigen Experimenten.

In der linken Spalte ist die Akkumulation des cGMP mit fortschreitender Zeit dargestellt, während die rechte Spalte die aus diesen Daten ermittelte spezifische Aktivität der sGC zeigt. Mit den aus der Regression gewonnenen Daten des nativen Enzyms (Abb. 3.6A) konnte die Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes mit 1,6 s bestimmt werden (Abb. 3.6B). Die Zugabe von 10 μ M BAY 41-8543 verlängerte diese Halbwertszeit um den Faktor 220 auf 352 Sekunden (Abb. 3.6C, D), während die Zugabe von BAY 58-2667 nur eine marginale Veränderung der Halbwertszeit zur Folge hatte (Abb. 3.6E, F). Somit führte BAY 41-8543 zu einer deutlichen Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes, wodurch sich der beobachtete Synergismus mit NO erklären ließe. Im Gegensatz zu BAY 41-8543 zeigte BAY 58-2667 keinen signifikanten Einfluss auf die Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes.

3.3 Rezeptorbindungsstudien an der gereinigten sGC

Rezeptorbindungsstudien bieten eine Möglichkeit, die Interaktion eines Liganden mit seinem Rezeptor näher zu beleuchten. Sie liefern Informationen über die Bindungskonstante (K_D -Wert) einer Substanz sowie über mögliche, verschiedene Bindungsstellen und deren negative bzw. positive Kooperativität. Im Gegensatz zu Rezeptorassays mit Membranrezeptoren, sind entsprechende Untersuchungen für lösliche Proteine, je nach ihren physikochemischen Eigenschaften und denen des Liganden, schwer zu entwickeln. In dieser Arbeit wurde erstmals ein Rezeptorbindungsassay für die sGC beschrieben. Zu diesem Zweck wurde der sGC-Aktivator BAY 58-2667 mit einer Tritiummarkierung synthetisiert (siehe 2.1).

3.3.1 Etablierung eines sGC-Radiorezeptorassays

Die in dieser Arbeit etablierte Methode basiert auf der Trennung von gebundenem und freiem Liganden durch Filtration an Glasfaserfilterplatten. Eines der Hauptprobleme ist die häufig sehr hohe unspezifische Bindung des Radioliganden an der Filtermatrix. Deshalb wurden mehrere Beschichtungen für die verwendeten Glasfaserfilter untersucht. Wie Abb. 3.7 zeigt, konnte mit einer Beschichtungslösung aus Polyvinylpyrrolidone (PVP) und Tween-20 (siehe 2.6.9) die niedrigste unspezifische Bindung des Radioliganden ^3H -BAY 58-2667 erreicht werden.

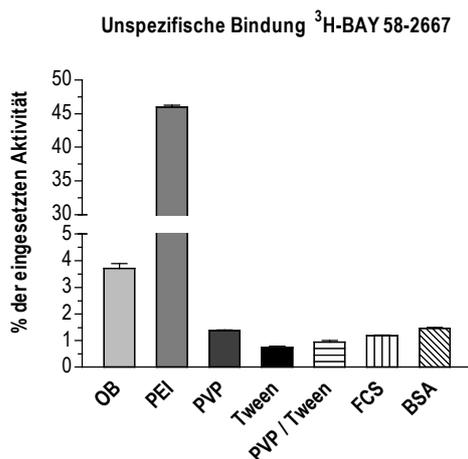


Abbildung 3.7: Dargestellt ist der Einfluss der verschiedenen Beschichtungen der Glasfaserfilter auf die Höhe der unspezifischen Bindung als prozentualer Anteil der gesamten eingesetzten Aktivität (Total). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

Auf Basis dieser Beschichtung wurde ein Rezeptorbindungsassay zur Untersuchung der Interaktion zwischen BAY 58-2667 und der sGC entwickelt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Methodenentwicklung. Abb. 3.8A zeigt die gesamte sowie die unspezifische Bindung von ^3H -BAY

58-2667 an die sGC. Die Differenz beider Kurven stellt die sättigbare Bindung des Liganden an seinen Rezeptor dar und zeigt einen typischen sigmoiden Verlauf. Zur Kontrolle wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen mit Glukoseoxidase (GOD) als Testprotein, anstelle der sGC, durchgeführt. Abb. 3.8B zeigt die Ergebnisse dieses Kontrollversuchs. Die sättigbare Bindung befand sich, wie für ein Protein ohne Bindungsstelle zu erwarten, über den gesamten Konzentrationsbereich auf dem Niveau des Hintergrundsignals. Diese Ergebnisse belegen, dass die hier beschriebene Methode zur Bestimmung des K_D -Wertes für BAY 58-2667 gut geeignet ist.

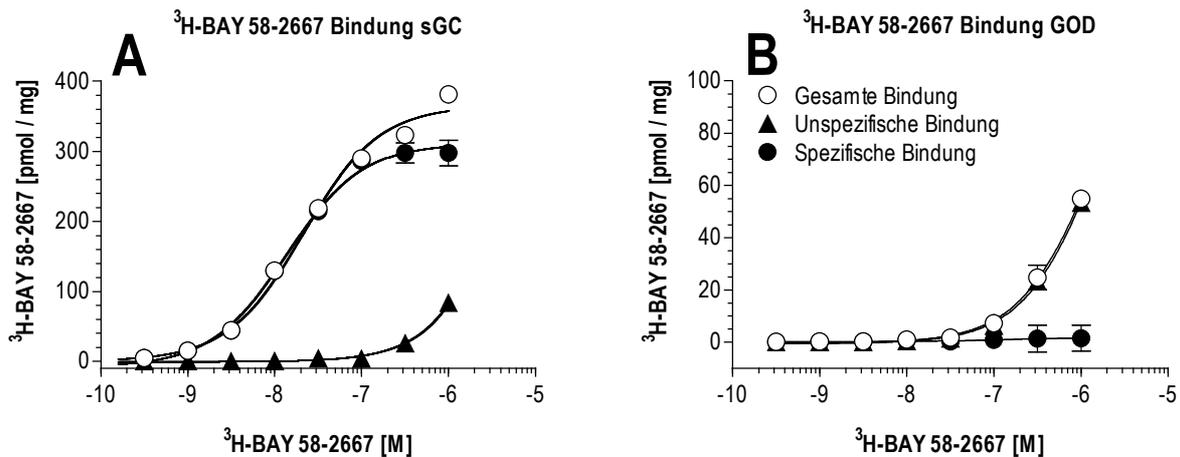


Abbildung 3.8: Dargestellt ist die gesamte (○), die unspezifische (▲) und die sättigbare Bindung (●) von ^3H -BAY 58-2667 an die sGC (A) bzw. Glukoseoxidase (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM vier unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

3.3.2 Bindungskonstante K_D für BAY 58-2667

Mit dem entwickelten Rezeptorbindungsassay wurde die Bindungskonstante von BAY 58-2667 in An- und Abwesenheit von ODQ bestimmt. Abb. 3.9 zeigt die sättigbare Bindung von ^3H -BAY 58-2667 an das native Enzym. Aus der nicht-linearen Regression konnte ein K_D -Wert von 3,2 nM und eine maximale Sättigung B_{max} von 470 pmol \times mg $^{-1}$ ermittelt werden. Der Versuch wurde unter gleichen Bedingungen in Anwesenheit von 10 μM ODQ wiederholt, wobei eine deutliche Zunahme der maximalen Bindung beobachtet werden konnte (Abb. 3.9). Die ermittelte nicht-lineare Regression legte die Anwesenheit von zwei Bindungsstellen für ^3H -BAY 58-2667 mit K_D -Werten von 1,2 nM und 54 nM an der sGC nahe. Darüber hinaus verdoppelte sich die maximale Sättigung auf 1049 pmol \times mg $^{-1}$.

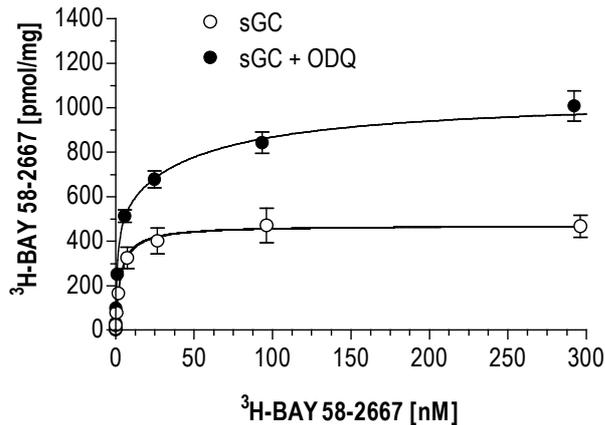


Abbildung 3.9: Dargestellt ist die Bindung von $^3\text{H-BAY 58-2667}$ an die sGC mit steigender Konzentration des Radioliganden in Ab- (\circ) und Anwesenheit (\bullet) von ODQ ($10 \mu\text{M}$). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

3.3.3 Homologe und heterologe Verdrängungsuntersuchungen

Homologe und heterologe Verdrängungsuntersuchungen wurden zur Charakterisierung einer möglichen Interaktion des Häm-abhängigen sGC-Stimulators BAY 41-2272 mit der Bindung von BAY 58-2667 an die sGC durchgeführt. In homologen Verdrängungsexperimenten wurde $^3\text{H-BAY 58-2667}$ durch steigende Konzentrationen nicht radioaktiv markierten sGC-Aktivators in An- und Abwesenheit von ODQ verdrängt. Abbildung 3.10 zeigt die Bindung des Radioliganden mit steigender Konzentration von BAY 58-2667. Am nativen Enzym wurde eine Sättigung von $683 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1}$ gemessen, welche durch hohe Konzentrationen von BAY 58-2667 bis auf $148 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1}$ reduziert wurde. Dabei konnte ein K_i -Wert von $8,7 \text{ nM}$ bestimmt werden. In Anwesenheit von ODQ ($10 \mu\text{M}$) wurde eine maximale Bindung von $1220 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1}$ und eine unspezifische Bindung von $158 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1}$ gemessen. Der K_i -Wert lag bei $6,5 \text{ nM}$.

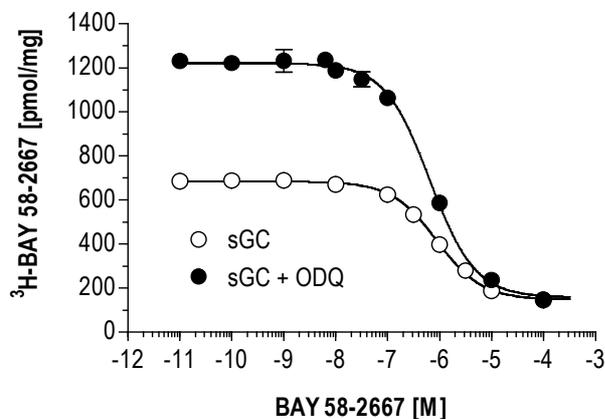


Abbildung 3.10: Dargestellt ist die Verdrängung des Radioliganden $^3\text{H-BAY 58-2667}$ von der sGC mit steigender Konzentration BAY 58-2667 in Ab- (\circ) und Anwesenheit (\bullet) von ODQ ($10 \mu\text{M}$). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

In einem heterologen Verdrängungsexperiment wurde der Einfluss des Häm-abhängigen sGC-Stimulators BAY 41-2272 auf die Bindung von ^3H -BAY 58-2667 bestimmt. Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, hatte BAY 41-2272 selbst in mikromolaren Konzentrationen keinen Einfluss auf die Bindung von ^3H -BAY 58-2667 an die sGC. Das zur Kontrolle ebenfalls eingesetzte BAY 58-2667 zeigte die erwartete Verdrängung des Radioliganden. Diese Studie belegt, dass die NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren verschiedene, voneinander unabhängige Bindungsstellen an der sGC besitzen.

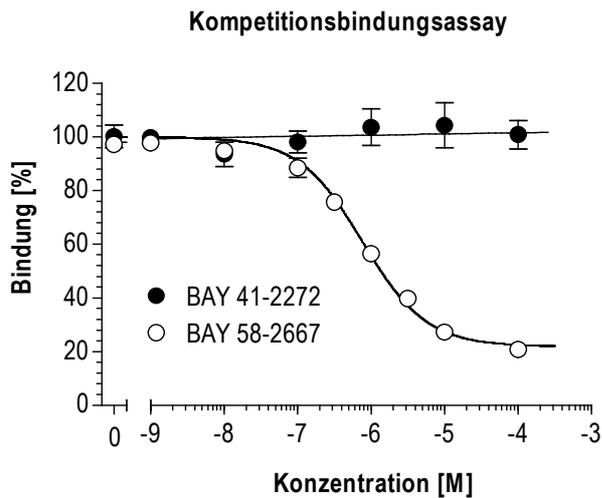


Abbildung 3.11: Dargestellt ist die Verdrängung des Radioliganden ^3H -BAY 58-2667 von der sGC mit steigender Konzentration BAY 58-2667 (\circ) bzw. BAY 41-2272 (\bullet). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

3.4 Photoaffinitätslabel-Untersuchungen an der gereinigten sGC

Eine probate Methode, die Bindungsstelle eines Liganden zu lokalisieren, ist das sogenannte Photoaffinitätslabeling. Dabei wird in eine Substanz eine photolabile Gruppe eingeführt, welche nach UV-Bestrahlung ein reaktives Radikal bildet. Diese entstandene reaktive Gruppe soll kovalent mit Aminosäuren des Zielproteins abreagieren, die Teil der Bindungstasche oder in deren räumlicher Nähe lokalisiert sind.

3.4.1 Charakterisierung des Photoaffinitätslabels BAY 61-2573

Zur Identifizierung der Bindungsstelle von BAY 58-2667 an der sGC wurde in die chemische Grundstruktur der Substanz eine photolabile Azidogruppe als Substituent eingeführt. Aus der Struktur-Wirkungsbeziehung dieser chemischen Klasse war zu erwarten, dass Änderungen in der para-Position am Biphenylrest der Substanz gut toleriert werden würden. Erwartungsgemäß aktivierte das Photoaffinitätslabel (PAL) BAY 61-2573 die sGC mit den gleichen Charakteristika wie BAY 58-2667 (Abb. 3.12) und verdrängte diese in dem Rezeptorbindungsassay mit einem K_i -Wert von 1,3 nM.

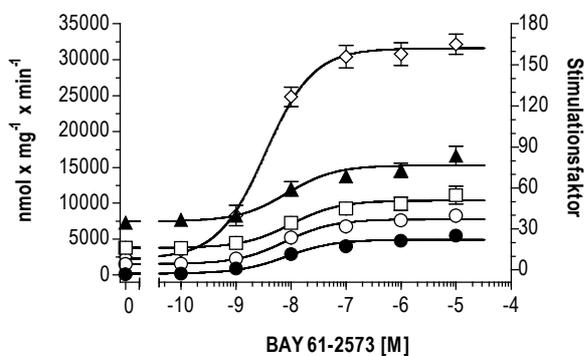


Abbildung 3.12: Dargestellt ist das Aktivierungsprofil des PAL BAY 61-2573 allein (●) und in Kombination mit 10 nM (○), 30 nM (□) und 100 nM (▲) DEA/NO sowie 10 μM ODQ (◇). Die linke Achse zeigt die spezifische Aktivität des Enzyms ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), die rechte den Stimulationsfaktor. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM vier unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass BAY 61-2573 die gleiche Bindungsstelle an der sGC besetzt wie BAY 58-2667 und dadurch eine der Ursprungssubstanz vergleichbare Aktivierung induziert. In weiteren Vorversuchen wurden die Bestrahlungsbedingungen für eine produktive Insertion des PAL in das Enzym optimiert. Zur Lokalisation des PAL am Protein wurde das PAL durch den Einbau von Tritium radioaktiv markiert (siehe 2.1), wobei eine spezifische Aktivität von 14,5 Ci/mmol erzielt wurde.

3.4.2 Photoaffinitätslabeling der sGC (SDS-PAGE)

Nach Etablierung der experimentellen Details in den Vorversuchen, wurde die sGC, wie unter 2.6.6 beschrieben, mit steigender Konzentration ^3H -BAY 61-2573 inkubiert und unter den ermittelten Bedingungen mit UV-Licht bestrahlt (254 nm, 30 min). Die Versuchsansätze wurden aufgereinigt und auf einer 8%igen SDS-PAGE getrennt. Das getrocknete Gel wurde anschließend auf einer Photoimagerplatte autoradiographiert. Das Ergebnis dieses Photoaffinitätslabelings ist in Fehlfarbdarstellung in Abbildung 3.13 dargestellt.

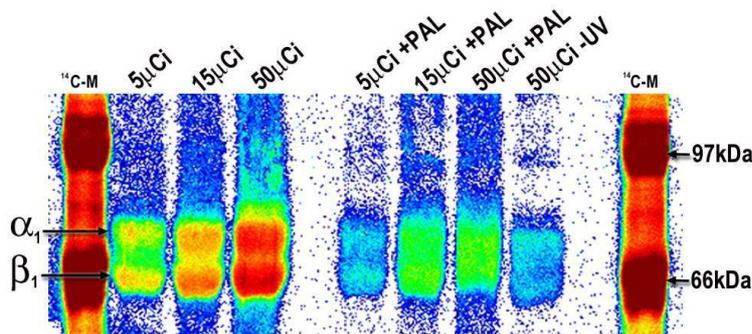


Abbildung 3.13: In Fehlfarben dargestellt ist die Autoradiographie der auf einer 8%igen SDS-PAGE getrennten und mit steigender Konzentration des Photoaffinitätslabels ^3H -BAY 61-2573 inkubierten sGC-Proben. Der ^{14}C -markierte Molekulargewichtsmarker ist auf beiden Seiten der Proben gezeigt.

Deutlich ist eine Markierung beider sGC-Untereinheiten zu erkennen, welche mit steigender Konzentration des PAL zunimmt. Durch Zugabe von nicht radioaktivem PAL konnte die Markierung des Enzyms um durchschnittlich 70% reduziert werden. Die als Kontrolle ohne UV-Licht inkubierte Probe zeigte 10% des maximalen nach Bestrahlung erhaltenen Signals. Diese Ergebnisse belegten eine konzentrationsabhängige spezifische Markierung beider Untereinheiten der sGC durch BAY 61-2673 nach UV-Bestrahlung.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss verschiedener sGC-Modulatoren auf das Photolabeling getestet. Wie in Abbildung 3.14A dargestellt, führte die Zugabe von DEA/NO oder dem Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 zu keiner Veränderung des Markierungsmusters. Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Bindungsstellen für die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren und die Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren hin. Die Inkubation mit dem sGC-Inhibitor ODQ führte zu einer deutlichen Verschiebung der ^3H -PAL-Markierung von der α - auf die β -Untereinheit der sGC. Das gleiche Markierungsmuster konnte für die hämfreie sGC beobachtet werden (Abb. 3.14B).

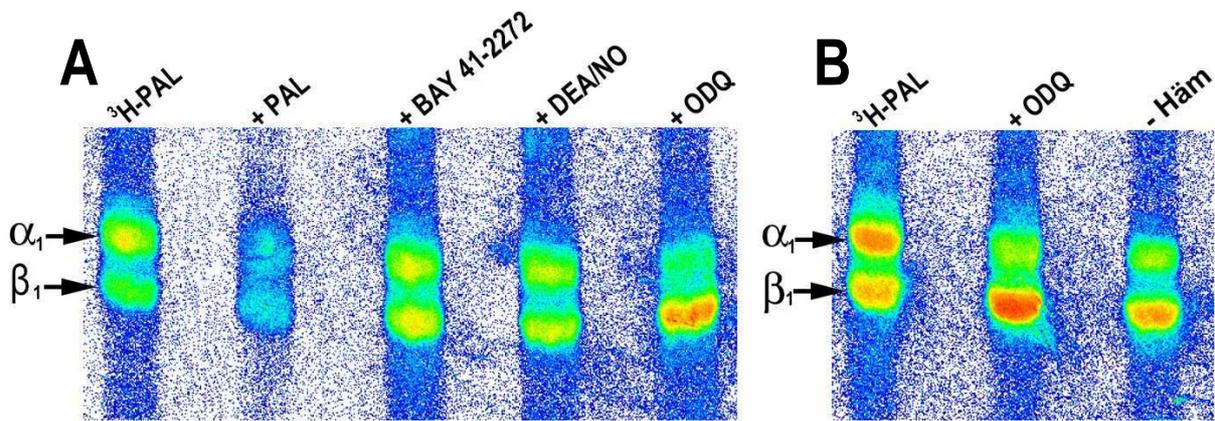


Abbildung 3.14: In Fehlfarben gezeigt sind die Autoradiographien gelelektrophoretisch getrennter sGC-Proben, die mit konstanter Konzentration an $^3\text{H-PAL}$ in An- und Abwesenheit verschiedener sGC-Modulatoren inkubiert wurden. Die in A dargestellten Proben wurden vor der SDS-PAGE mit TCA, die in B aufgetrennten sGC-Proben mit der unter 2.6.6 beschriebenen Chloroform/Methanol-Methode gefällt.

3.4.3 Identifizierung der Bindungsstelle des Photoaffinitätslabels (2D-PAGE)

Zur genauen Lokalisierung der Bindungsstelle des PAL wurde die sGC, nach erfolgter UV-Bestrahlung durch BrCN chemisch C-terminal der Methionine gespalten (siehe 2.6.6). Da aufgrund unvollständiger Spaltungen beider Untereinheiten eine Vielzahl radioaktiver Banden zu erwarten war, wurden die Spaltfragmente in einer 2D-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.15).

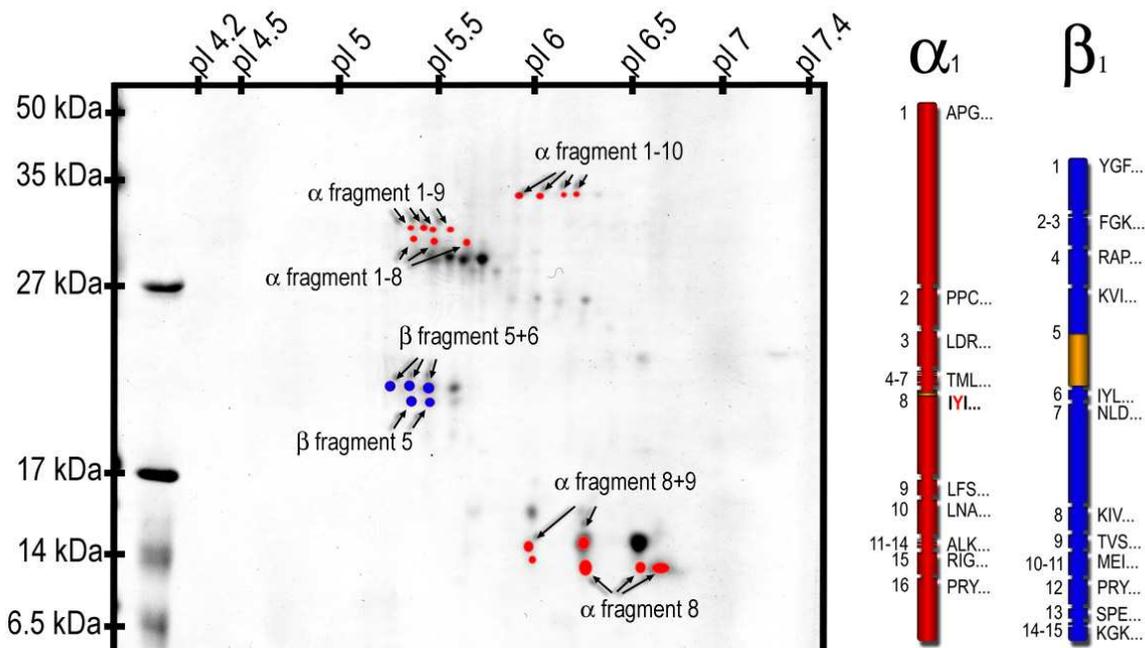


Abbildung 3.15: Gezeigt ist der Coomassie gefärbte Blot der 2D-PAGE der $^3\text{H-PAL}$ gelabelten und durch BrCN gespaltenen sGC-Fragmente. Die durch Autoradiographie des Blots als radioaktiv identifizierte Fragmente sind rot (α) und blau (β) markiert. Am rechten Rand ist die Position der markierten Fragmente in der jeweiligen Primärstruktur beider Untereinheiten dargestellt.

Die hoch aufgelöste Trennung der Fragmente war eine Voraussetzung für die folgende Sequenzierung und Identifizierung der markierten Spaltstücke. Abb. 3.15 zeigt den Coomassie gefärbten Blot der 2D-PAGE, in dem die als radioaktiv identifizierten Fragmente (bestimmt durch Autoradiographie des Blots) farbig dargestellt sind. Die radioaktiven Spots wurden aus dem Blot ausgeschnitten, die Peptidfragmente eluiert und anschließend durch eine N-terminale Sequenzierung nach Edman identifiziert. Durch diese Methode ließ sich der Bereich, in welchem das PAL kovalent abreagiert hatte, stark eingrenzen. Für die α -Untereinheit der sGC konnte das PAL im 8. BrCN-Fragment (AS 370-481) für die β -Untereinheit im 5. BrCN-Fragment (AS 165-310) lokalisiert werden. Die einzelnen Fraktionen des Edman-Abbaus wurden aufgefangen, eingedampft und ihre Radioaktivität im Flüssig-Szintillations-Counter gemessen. Für das markierte Fragment der α -Untereinheit (AS 370-481) wurde eine hohe Radioaktivität an der zweiten Aminosäure, Tyr₃₇₁, beobachtet (Abb. 3.16). Somit konnte für die α -Untereinheit der sGC die Aminosäure, an der das PAL kovalent gekoppelt war, eindeutig bestimmt werden. Für das markierte Fragment der β -Untereinheit (AS 165-310) konnte innerhalb der ersten 66 Zyklen des Edman-Abbaus keine erhöhte Radioaktivität festgestellt werden (Abb. 3.16). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Verknüpfung des PAL an der β -Untereinheit wahrscheinlich innerhalb der Aminosäuren 231-310 liegt.

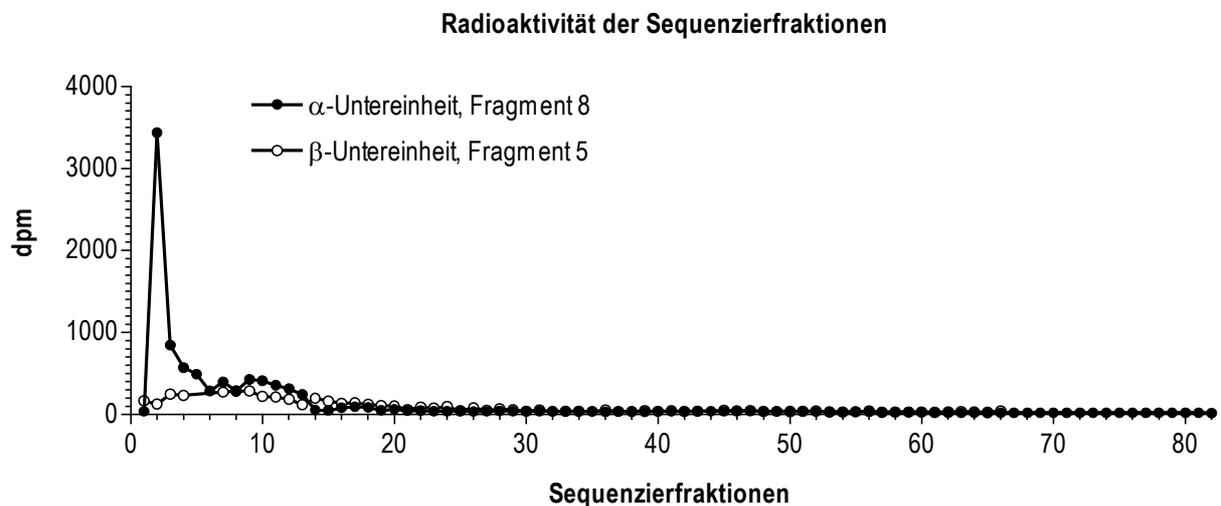


Abbildung 3.16: Dargestellt ist die gemessene Radioaktivität (dpm) der einzelnen Fraktionen der Peptidsequenzierung des radioaktiv markierten BrCN-Fragments 8 der α -Untereinheit (●) und des Fragments 5 der β -Untereinheit (○).

3.4.4 Enzymatische Spaltung der gelabelten sGC

Zur weiteren Lokalisation der markierten Aminosäure im Bereich 231-310 wurde die gelabelte β -Untereinheit der sGC enzymatisch gespalten und die entstandenen Peptidfragmente mittels HPLC getrennt. Dazu wurden durch ^3H -PAL markierte und in einer SDS-PAGE getrennte Banden der β -Untereinheit aus den Gelen ausgeschnitten und, wie unter 2.6.10 beschrieben, durch Endoprotease LysC gespalten. Das so erzeugte Peptidgemisch wurde anschließend in einer HPLC auf einer $\mu\text{C}18$ -Säule mittels eines ACN/TFA-Gradienten getrennt und die erhaltenen Fraktionen auf ihre Radioaktivität hin untersucht. Abbildung 3.17 zeigt das HPLC-Chromatogramm sowie die Aktivität der einzelnen Fraktionen.

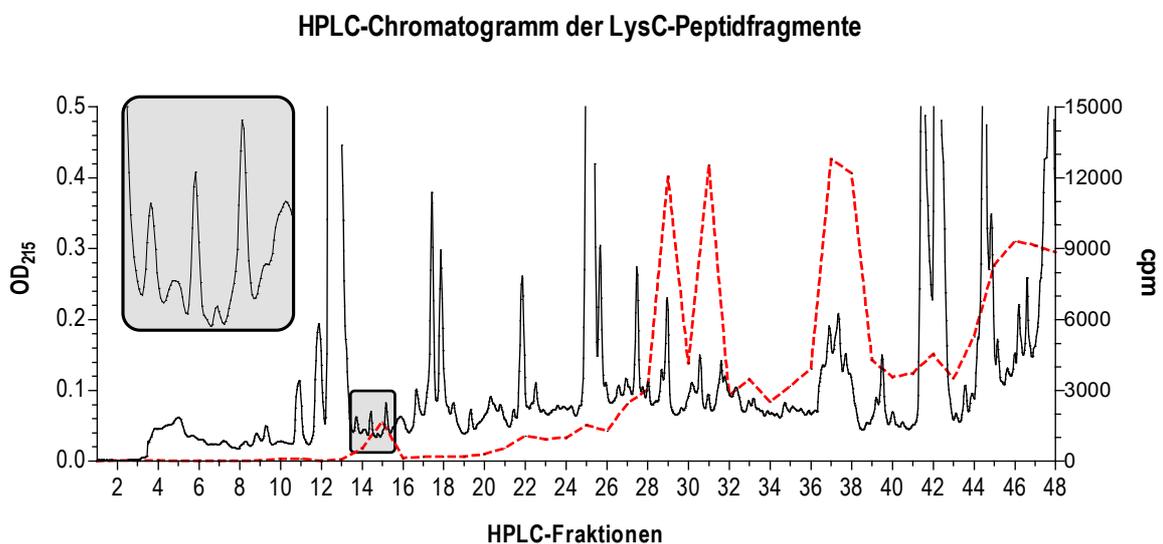


Abbildung 3.17: Gezeigt ist das bei einer Wellenlänge von 215 nm (OD_{215}) aufgenommene Peptidfragmentierungsmuster der durch Endoprotease LysC gespaltenen und mittels HPLC getrennten sGC-Fragmente. Die Verteilung der Radioaktivität der HPLC-Fraktionen (cpm) ist in Rot dargestellt. Grau hinterlegt sind die Fraktionen, die für die Rechromatographie eingesetzt wurden.

Die über dem Hintergrundsignal liegenden vier Radioaktivitätsspitzen (Fraktion 14+15, Fraktion 29, Fraktion 31 und Fraktion 37+38) wurden in einer Rechromatographie mit einem ACN/Phosphatpuffer-Gradienten getrennt, wobei nur für die Fraktionen 14+15 ein Peptidsignal im Chromatogramm gefunden werden konnte, welches mit einer erhöhten Radioaktivität korrespondierte (Abb. 3.18A). Das in der Rechromatographie der Fraktionen 14+15 gefundene Peptid wurde anschließend durch N-terminale Sequenzierung identifiziert und die einzelnen Fraktionen des Edman-Abbaus zur Messung der Radioaktivitätsverteilung aufgefangen. Die Sequenzierung identifizierte das Peptid als humanes Keratin

und somit als Verunreinigung der Probe. Übereinstimmend dazu zeigte die Aktivitätsverteilung in Abbildung 3.18B einen exponentiellen Abfalls des Signals, wie er für unspezifisch mitgeführte Radioaktivität zu erwarten war. Somit konnte mit dieser Methode der durch das PAL markierte Bereich der β -Untereinheit der sGC nicht weiter eingegrenzt werden.

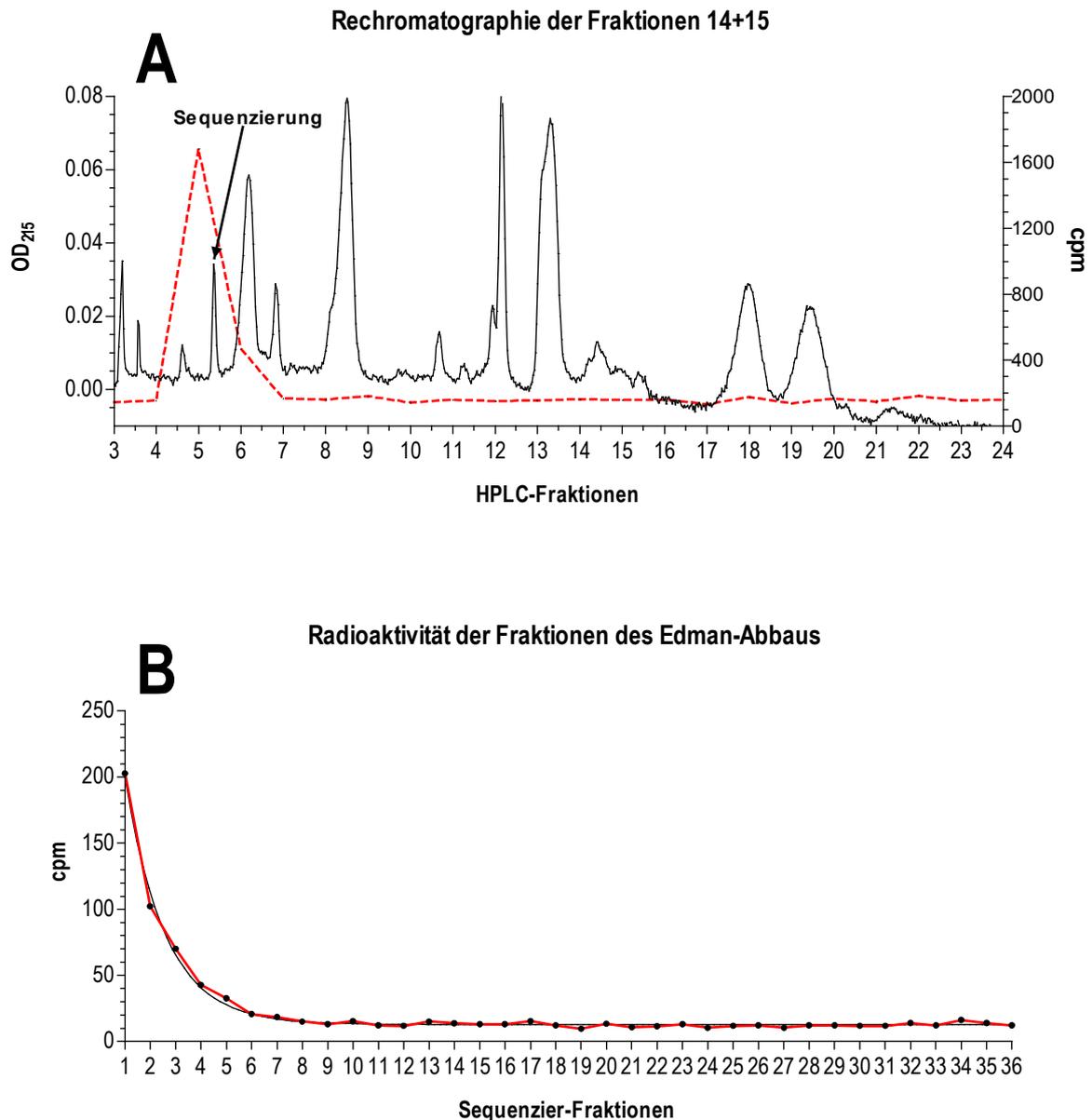


Abbildung 3.18: In der in A gezeigten Rechromatographie (OD_{215}) der Fraktionen 14+15 der HPLC-Trennung (Abb. 3.17) konnten zahlreiche verschiedene Peptide voneinander separiert werden. Die in Rot angegebene Radioaktivität (cpm) der einzelnen Fraktionen der Rechromatographie zeigt einen Anstieg an Position 4 und 5. Die Peptidfragmente dieser beiden Fraktionen wurden anschließend Sequenziert. Die Radioaktivität der aufgefängenen 36 Sequenzierzyklen ist in B dargestellt.

3.5 Expression des N-terminalen Fragments der β -Untereinheit der sGC

Um das hämbindende Fragment der sGC sowohl für spektroskopische Untersuchungen als auch für Rezeptorbindungsuntersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde diese Domäne heterolog in *E. Coli* exprimiert. Dazu wurde durch Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle vor das Start-ATG sowie nach 200 Aminosäuren ein doppeltes Stop-Codon in die cDNA der β -Untereinheit eingefügt. Die so veränderte cDNA wurde anschließend in den prokaryotischen Expressionsvektor pET22b kloniert und in den *E. Coli*-Stamm BL21 (pLysS) DE3 transformiert. Die Expression wurde, wie unter 2.5.7 beschrieben, durchgeführt. Nach dem Lysieren der Zellen wurde der 100.000 g Überstand über Zentrifugations-Ionenaustauscher aufgereinigt (siehe 2.6.7) und die exprimierte β -Untereinheit im Westernblot, wie unter 2.6.5 beschrieben, detektiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt den Westernblot der einzelnen Eluate des Anionenaustauschers.

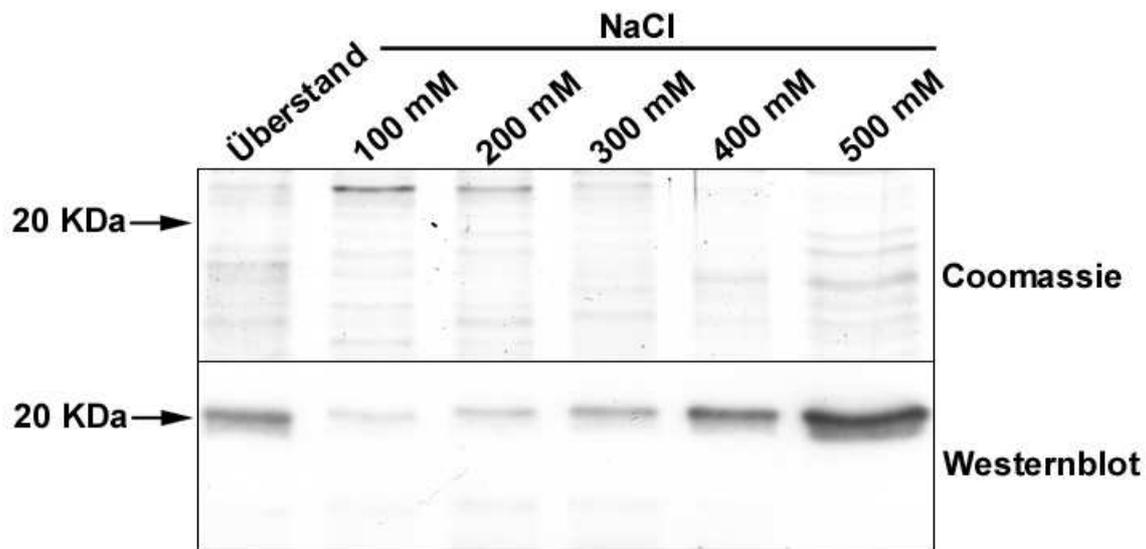


Abbildung 3.19: Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes Gel (oben) und der Westernblot (unten) der Expression des 200 AS N-terminalen Fragments der β -Untereinheit in *E. Coli*. Aufgetragen wurde der 100,000 g Überstand sowie die verschiedenen eluierten Fraktionen des Anionenaustauschers. Für den Westernblot wurde polyklonales Anti- β -Antiserum verwendet.

Wie in Abbildung 3.19 dargestellt, konnte mit dem Anti- β -Antiserum eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 20 kDa detektiert werden, die bei einer NaCl-Konzentration zwischen 400-500 mM eluierte. In der Coomassie gefärbten SDS-PAGE der gleichen Proben konnte jedoch keine Anreicherung einer Bande beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass das gewünschte Fragment zwar löslich ist, jedoch nur gering exprimiert wird. Da für die nachfolgenden Untersuchungen, wie UV/Vis-Spektroskopie oder Rezeptorbindungsstudien, größere Mengen des

Proteinfragments erforderlich sind, muss die Expression weiter optimiert werden. Darüber hinaus ließe sich das exprimierte Fragment durch das Einfügen eines „Tags“ leichter aufreinigen und in höherer Konzentration eluieren.

3.6 Untersuchungen zur Häm-ODQ Wechselwirkung

Die Inkubation der sGC mit dem sGC-Inhibitor ODQ führte zu einer Potenzierung der Wirkung von BAY 58-2667 durch eine starke Erhöhung der maximalen katalytischen Aktivität V_{\max} sowie zu einer Verdopplung der sättigbaren Bindung in den Rezeptorbindungsstudien (3.2.2 und 3.3.1). Deshalb sollte untersucht werden, ob ODQ diesen Effekt über die Oxidation der prosthetischen Hämgruppe erzielt, oder ob eventuell andere Häm-unabhängige Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Zu diesem Zweck musste eine Methode zur Entfernung der Hämgruppe kleinster Enzymmengen etabliert werden.

3.6.1 Entfernung bzw. Rekonstitution des prosthetischen Häms der sGC

Obwohl in der Literatur mehrere Methoden zur Entfernung der prosthetischen Hämgruppe unter Verwendung von Tween-20 beschrieben sind, zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass die notwendige Trennung des hämfreien Enzyms von Detergenz und freiem Häm nach den bekannten Protokollen nur unzureichend möglich bzw. äußerst umständlich ist. Aus diesem Grund wurde eine Methode zur Aufreinigung der hämfreien sGC auf Basis käuflicher Zentrifugations-Ionenaustauscher entwickelt. Dazu wurde, wie unter 2.6.7 beschrieben, ein Testansatz aus BSA, Tween-20 und Zink-Porphyrin zusammengegeben und anschließend über diese Ionenaustauscher getrennt.

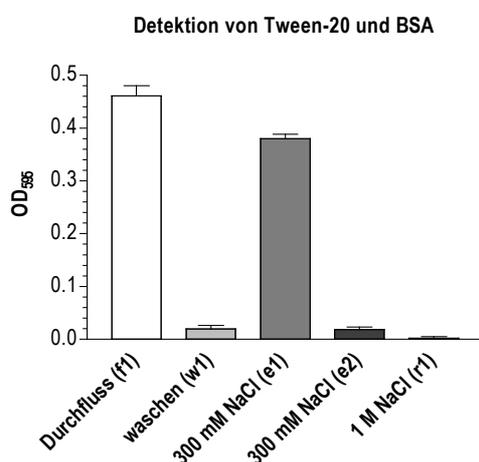


Abbildung 3.20: Dargestellt ist eine Proteinbestimmung nach Bradford der einzelnen Eluate des mit BSA, Tween-20 und ZnPP beladenen Ionenaustauschers. Die starke Interferenz dieser Methode mit Detergenzien wurde zu deren Detektion verwendet. Tween-20 eluierte vollständig in der ersten Fraktion (f1) während das gebundene Protein erst durch 300 mM NaCl (e1) von der Säulenmatrix eluiert werden konnte.

Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis der chromatographischen Trennung des Probenansatzes bestehend aus BSA, Tween-20 und ZnPP. Die starke Interferenz der Proteinbestimmung nach Bradford mit Detergenzien wurde zur Detektion des Tween-20 verwendet. Der Durchfluss des Testansatzes (f1) zeigte eine starke Farbreaktion, während in der Fraktion des ersten Waschschriffs (w1) kein Farbumschlag zu sehen war. Somit konnte die problematischste Fraktion des Testansatzes, das Tween-20, in einem einzigen Schritt entfernt werden. Der Proteinanteil der Lösung wurde von der Säulenmatrix adsorbiert und konnte mit einer Ausbeute von ca. 70% durch Zugabe von 300 mM NaCl enthaltenden Puffers (e1) eluiert werden. In den folgenden Elutionsschritten (e1, r1) wurde nur eine vernachlässigbare weitere Elution an Protein erzielt. Der ZnPP-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. 94% des ZnPP konnten an die Säulenmatrix gebunden werden. Eine kleine Restmenge an ZnPP befand sich im Durchfluss (Abb. 3.21B). Im Gegensatz dazu ließ sich, sowohl in der ersten Waschfraktion als auch am eluierten Protein, kaum ZnPP nachweisen (Abb. 3.21C). Das an die Säulenmatrix gebundene Porphyrin konnte selbst durch Zugabe von 1M NaCl enthaltenden Puffer nicht eluiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieser Methode Detergenz sowie mikromolare Mengen an Porphyrin vom Proteinanteil einer Lösung getrennt werden können.

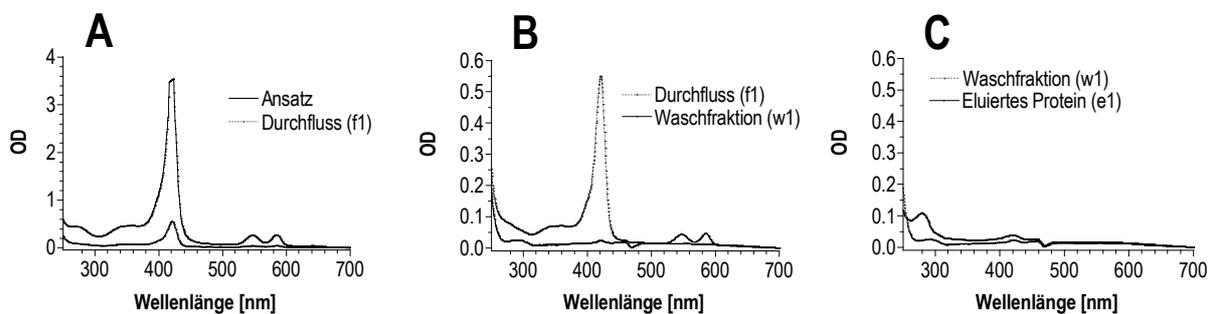


Abbildung 3.21: Dargestellt sind die aufgenommenen UV/Vis-Spektren des Testansatzes sowie der einzelnen Fraktionen der chromatographischen Trennung. Das UV/Vis-Spektrum des Testansatzes und des Durchflusses ist in A, das des Durchflusses und des ersten Waschschriffs in B gezeigt. Das UV/Vis-Spektrum des eluierten Proteins ist in C dargestellt.

3.6.2 Vergleich der ODQ-Wirkung an hämhaltiger und hämfreier sGC

Zur Untersuchung, ob ODQ einen Häm-unabhängigen Effekt auf die BAY 58-2667-induzierte Enzymaktivierung zeigt, wurde die prosthetische Hämgruppe des Enzyms mit der unter 2.6.7 beschriebenen Methode entfernt. Als Kontrolle wurde die sGC unter identischen Bedingungen, jedoch ohne vorherige Inkubation mit Detergenz, chromatographiert.

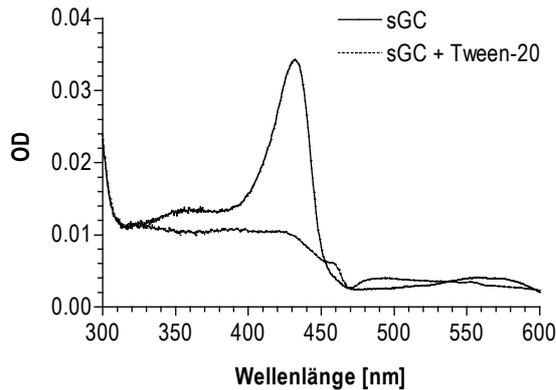


Abbildung 3.22: Dargestellt sind die UV/Vis-Spektren der mit und ohne Tween-20 inkubierten und anschließend chromatographierten sGC. Die Spektren sind die Mittelwerte vier unabhängiger Experimente normiert auf die Proteinkonzentration.

Nach Inkubation der sGC in An- und Abwesenheit von Tween-20 (siehe 2.6.7) und anschließender chromatographischer Trennung des Enzyms von Detergenz und freiem Häm wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen. Die ohne Tween-20 inkubierte Kontrolle zeigte die unveränderte Soretbande bei 431 nm, während die Inkubation mit 2% Tween-20 zu einer vollständigen Entfernung der prosthetischen Hämgruppe führte (siehe Abb. 3.22). Die so gewonnene hämhaltige bzw. hämfreie sGC wurde anschließend für Aktivitätsassays und Rezeptorbindungsstudien verwendet.

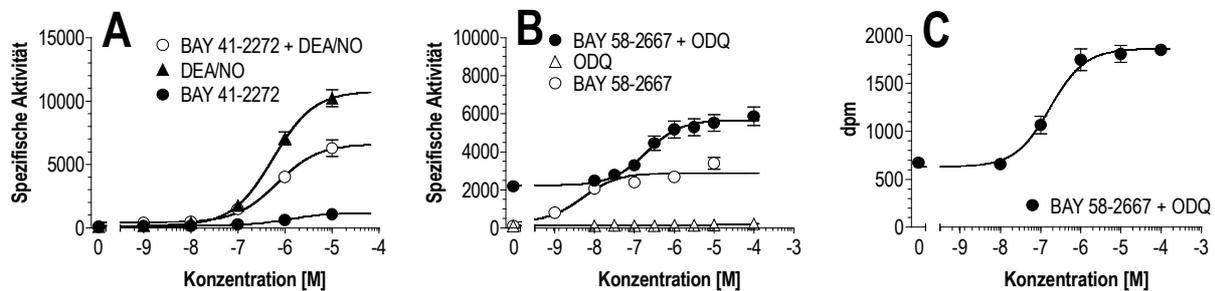


Abbildung 3.23: Die nach dem UV/Vis-Spektrum (Abb. 3.22) hämhaltige sGC wurde für Aktivitätsassays (A, B) und parallel dazu für Rezeptorbindungsuntersuchungen (C) verwendet. Dargestellt ist in A die spezifische Aktivität des hämhaltigen Enzyms ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) in Anwesenheit Häm-abhängiger Stimulatoren (DEA/NO, BAY 41-2272). B zeigt die Stimulation der hämhaltigen sGC mit steigender Konzentration des Häm-unabhängigen Aktivators BAY 58-2667, bzw. durch 100 nM BAY 58-2667, in Kombination mit einer steigenden Konzentration an ODQ. Die gesteigerte spezifische Bindung von ^3H -BAY 58-2667 an die sGC (als dpm) mit zunehmender Konzentration an ODQ ist in C dargestellt.

Die hämhaltige sGC wurde durch die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und DEA/NO konzentrationsabhängig um den Faktor 12,9 bzw. 116 aktiviert. In Gegenwart von 10 nM DEA/NO, eine Konzentration, welche nur zu einer geringfügigen Aktivierung der sGC führte, wurde eine Potenzierung

der Wirkung von BAY 41-2272 um über 450% beobachtet (Abb. 3.23A). Der Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte die sGC konzentrationsabhängig um Faktor 31,1. Zur Bestimmung des EC₅₀-Wertes für ODQ an der BAY 58-2667 aktivierten sGC wurde das Enzym mit 100 nM BAY 58-2667 sowie einer steigenden Konzentration an ODQ inkubiert. Der sGC-Inhibitor führte zu einer Steigerung der BAY 58-2667 induzierten sGC-Aktivierung mit einem EC₅₀-Wert von 190 nM (Abb. 3.23B). Parallel dazu wurde in einer Rezeptorbindungsstudie eine, mit steigender Konzentration an ODQ, erhöhte Bindung von ³H-BAY 58-2667 an das Enzym beobachtet. Aus den in Abb. 3.23C gezeigten Daten wurde ein EC₅₀-Wert von 170 nM ermittelt.

Die chromatographierte hämfreie sGC (siehe UV/Vis-Spektrum Abb. 3.22) wurde im sGC-Aktivitätstest und in Rezeptorbindungsstudien verwendet. Die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren DEA/NO und BAY 41-2272 zeigten an dieser Enzympräparation nahezu keine Wirkung (Abb. 3.24A). BAY 41-2272 erreichte eine maximale Enzymaktivierung um den Faktor 2,8, die in Gegenwart von 10 nM DEA/NO bis auf den Faktor 5,8 stieg. DEA/NO selbst aktivierte die sGC um den Faktor 14,7 bei einem unverändertem EC₅₀-Wert, was einem Wirkungsverlust von 92% gegenüber der hämhaltigen sGC entspricht. Der Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 führte zu einer starken Aktivierung der hämfreien sGC um den Faktor 63, der durch die Zugabe von ODQ nicht weiter steigerbar war (Abb. 3.24B). In der Rezeptorbindungsstudie wurde eine Bindung von ³H-BAY 58-2667 auf hohem Niveau beobachtet, die durch steigende Konzentrationen von ODQ unbeeinflusst blieb (Abb. 3.24C).

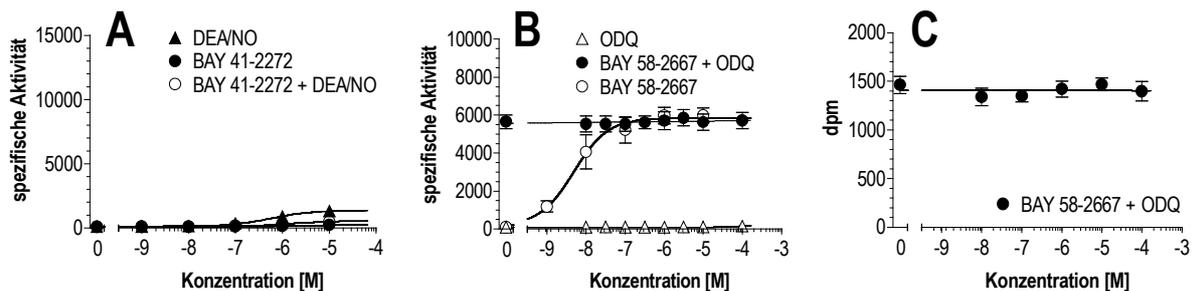


Abbildung 3.24: Die chromatographierte hämfreie sGC wurde für Aktivitätsassays (A, B) und parallel dazu für Rezeptorbindungsuntersuchungen (C) verwendet. Dargestellt ist in A die spezifische Aktivität des hämfreien Enzyms ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) in Anwesenheit Häm-abhängiger Stimulatoren (DEA/NO, BAY 41-2272). B zeigt die Stimulation der hämfreien sGC mit steigender Konzentration des Häm-unabhängigen Aktivators BAY 58-2667, sowie durch 100 nM BAY 58-2667 in Kombination mit einer steigenden Konzentration an ODQ. Die spezifische Bindung von ³H-BAY 58-2667 an die sGC (als dpm) mit zunehmender Konzentration an ODQ ist in C dargestellt.

3.6.3 Einfluss der Häm-Oxidation auf die Bindung von BAY 58-2667

Um abzuklären, ob die einzige Wirkung von ODQ über die Oxidation der Hämgruppe der sGC vermittelt wird, wurde eine Rezeptorbindungsstudie einerseits in Anwesenheit von ODQ und andererseits in Gegenwart des unspezifischen Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat durchgeführt. Abb. 3.25 zeigt, dass sich die maximale sättigbare Bindung von ^3H -BAY 58-2667 an die sGC durch Zugabe von ODQ ($10\ \mu\text{M}$) verdoppelte. Dieser Effekt ließ sich ebenfalls durch das unspezifische Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat ($10\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$) erzielen.

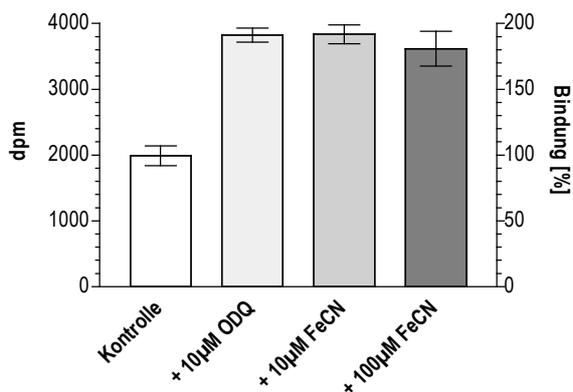


Abbildung 3.25: Dargestellt ist die maximale spezifische Bindung von ^3H -BAY 58-2667 an die sGC (als dpm) in Ab- und Anwesenheit von ODQ ($10\ \mu\text{M}$) bzw. Kaliumhexacyanoferrat ($10\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$)

3.7 Charakterisierung der Hämbindungsstelle der sGC

Aufgrund fehlender Kristallstrukturen, bzw. Homologiemodelle anderer Hämproteine, ist der Aufbau der hämbindenden Domäne der sGC unbekannt. Nach bisherigem Kenntnisstand ist der N-terminale Bereich der β -Untereinheit der sGC verantwortlich für die Bindung der prosthetischen Hämgruppe. In dieser Untereinheit konnte, gestützt durch zahlreiche spektroskopische Befunde, das Histidin₁₀₅ als axialer Ligand des zentralen Eisens der Hämgruppe identifiziert werden.

3.7.1 Identifizierung von an der Hämbindung beteiligter Aminosäuren

Es ist bekannt, dass die N-terminalen 200 Aminosäuren der β -Untereinheit der sGC ausreichen, um eine hämbindende Domäne zu formen. Für die Besetzung dieser Bindungstasche ist die Ausbildung einer Bindung des zentralen Hämeisens an das Histidin₁₀₅ dieser Domäne essenziell. Darüber hinaus

konnte die Bedeutung der Propionate des Häms für dessen Bindung an die sGC nachgewiesen werden. Als Interaktionspartner dieser Propionate konnten in diversen Hämproteinen basische Aminosäuren identifiziert werden. Basierend auf diesen Informationen wurde ein BLAST-Search mit anschließendem Multisequenzalignment durchgeführt, um mögliche an der Bindung der Hämgruppe beteiligte Aminosäuren zu identifizieren. Der BLAST-Search mit der Sequenz der ersten 200 Aminosäuren der β_1 -Untereinheit der Ratten-sGC lieferte Sequenzen verschiedener β_1 -, β_2 - sowie α_1 - und α_2 -Untereinheiten diverser Spezies. Darüber hinaus wurden einige prokaryotische Sequenzen unbekannter Funktion identifiziert. In dem in Abbildung 3.26 gezeigten Multisequenzalignment wurden ausschließlich Sequenzen verwendet, von denen die Fähigkeit zur Hämbindung bekannt war.

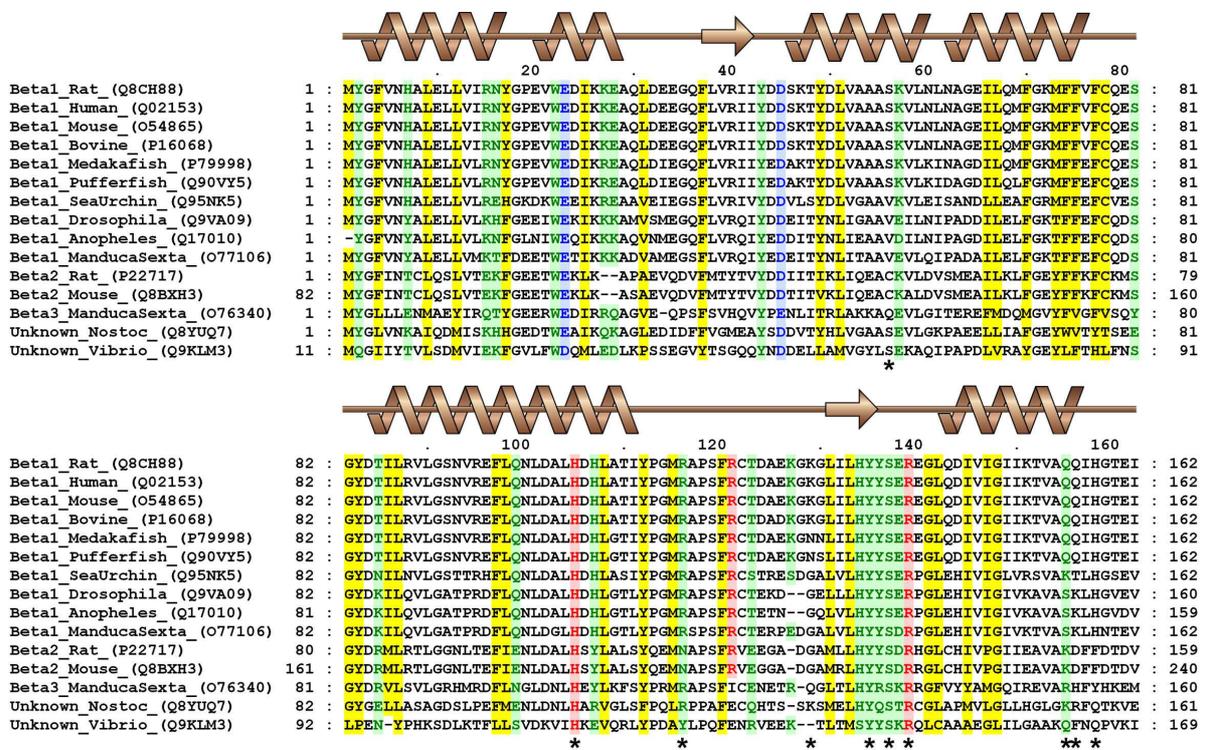


Abbildung 3.26: Dargestellt ist ein Multisequenzalignment verschiedener hämbindender Proteine, welche eine Homologie zur N-terminalen Domäne der β_1 -Untereinheit der Ratten-sGC aufweisen. Die vorhergesagte Sekundärstruktur des Consensus ist über den Sequenzen angegeben. Spiralen symbolisieren α -Helices, während β -Faltblätter durch Pfeile dargestellt sind. Farblich markiert sind invariante bzw. konservierte Aminosäuren nach folgendem Schema: Gelb = hydrophobe bzw. aromatische Reste (ALICVMFHWY), grün = polare Reste (HYSEDKRTQN), blau = negative Seitenketten (DE) und rot = positive Seitenketten (HRK). Die für Mutagenesestudien ausgewählten Aminosäuren sind durch einen Stern markiert.

3.7.2 Konstruktion und Screening der sGC-Mutanten

Die in Abbildung 3.26 markierten Aminosäuren βS_{56} , βH_{105} , βR_{116} , βK_{129} , βY_{135} , βS_{137} , βR_{139} , βQ_{155} , βQ_{156} und βH_{158} wurden ausgetauscht und die Mutanten nach transients Transfektion in einer cGMP Reporterzelle getestet (siehe 2.5.8). Um nachzuweisen, dass dieses Screeningsystem in der Lage ist, hämhaltige und hämfreie sGC zu unterscheiden, wurde neben WT-sGC der Mutant $\beta H_{105}F$ in die cGMP Reporterzellen transfiziert. Ein Austausch dieses axialen Hämliganden führt zur Expression hämfreier sGC. Die Ergebnisse der Validierung des Testsystems durch die WT-sGC und die $\beta H_{105}F$ -sGC ist in der Abbildung 3.27 gezeigt.

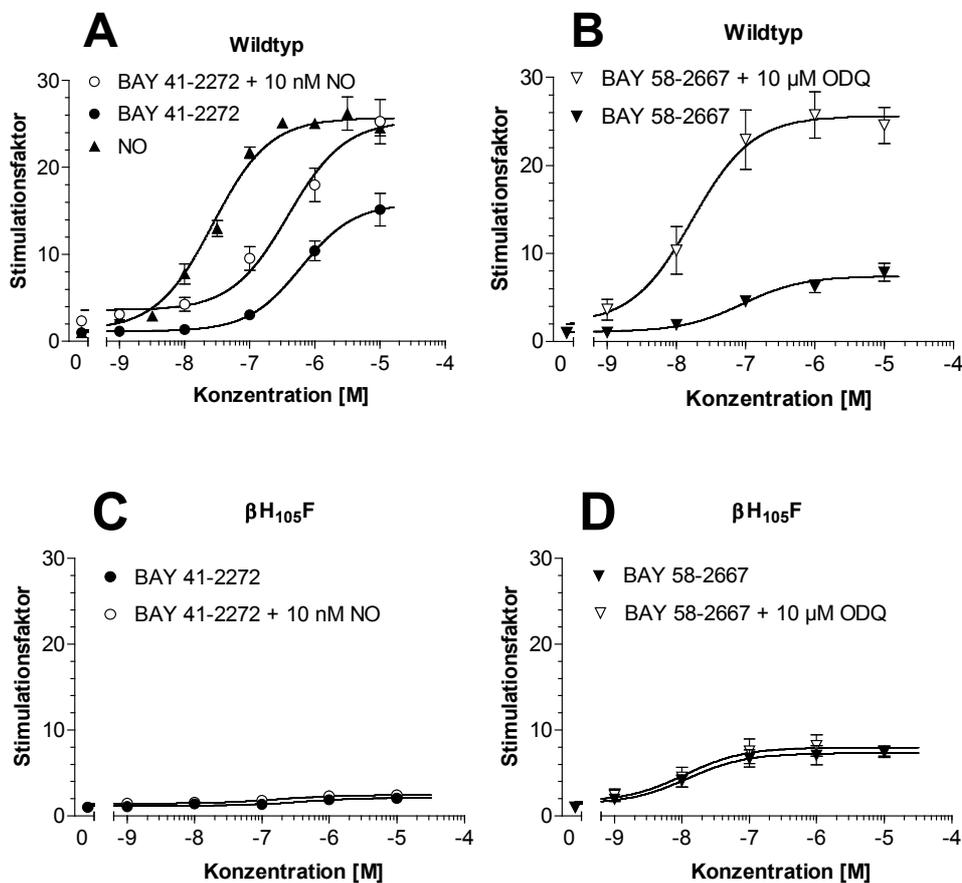


Abbildung 3.27: Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Aktivierung der WT-sGC (A, B) und $\beta H_{105}F$ -sGC (C, D) durch die Häm-abhängigen Stimulatoren DEA/NO und BAY 41-2272, sowie den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine und in Kombination mit DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in der transient transfizierten cGMP Reporterzelle.

Eine Inkubation der WT-sGC transfizierten Reporterzellen mit den Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren DEA/NO und BAY 41-2272 führte zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des Enzyms. In

Gegenwart einer geringen Konzentration DEA/NO (10 nM), die selber nur zu einer schwachen Aktivierung des Enzyms führte (2,2-fach), kam es zu einer Steigerung der maximalen Wirkung von BAY 41-2272 um 60%. Die Aktivierung der sGC durch BAY 58-2667 konnte durch Zugabe von ODQ (10 μ M) stark potenziert werden. Dieses charakteristische Aktivierungsprofil stimmt mit den Befunden am gereinigten hämhaltigen Enzym überein (siehe 3.2.1). Im Gegensatz dazu zeigte die β H₁₀₅F-sGC das erwartete Aktivierungsmuster hämfreier sGC. Weder NO noch BAY 41-2272, allein und in Kombination, führten zu einer Aktivierung dieses Mutanten. Erwartungsgemäß konnte die Wirkung von BAY 58-2667 durch ODQ nicht weiter gesteigert werden. Die erzielten jeweiligen maximalen Stimulationen sowie EC₅₀-Werte sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Das hier verwendete Testsystem stellt eine einfache und reproduzierbare Methode zur Unterscheidung hämhaltiger und hämfreier sGC dar und ist somit geeignet, die An- oder Abwesenheit der Hämgruppe der verschiedenen generierten sGC-Mutanten nachzuweisen. Die Aktivierungsprofile der β Y₁₃₅F und β R₁₃₉L Mutanten sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

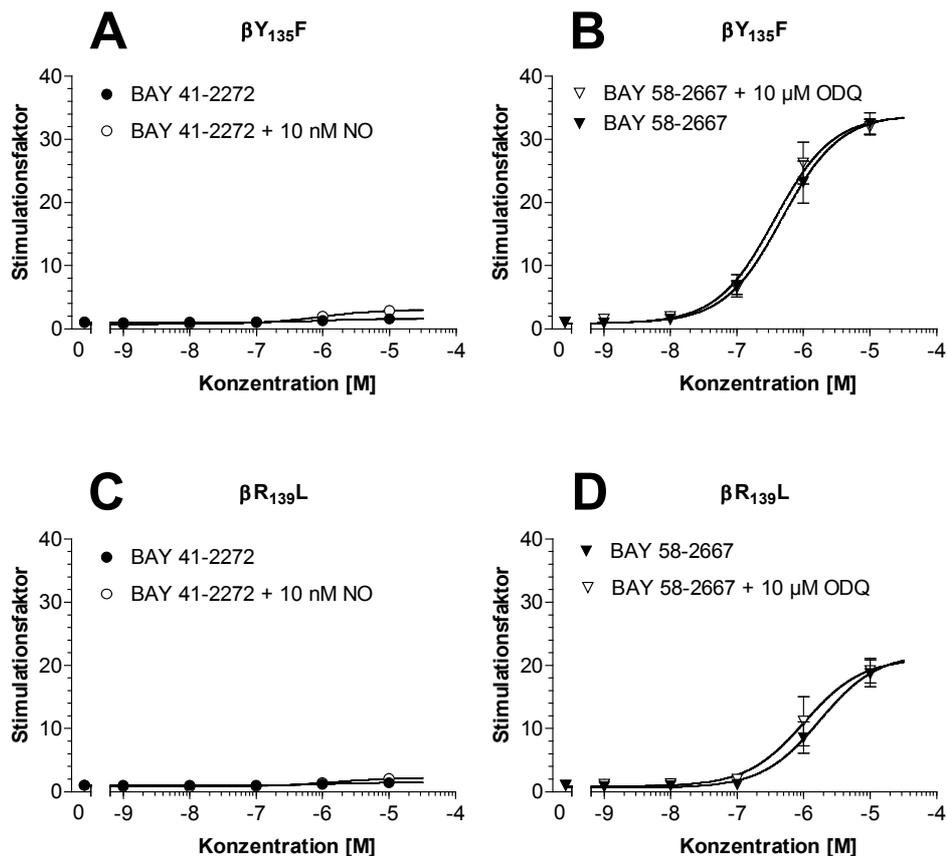


Abbildung 3.28: Dargestellt ist sowohl die konzentrationsabhängige Aktivierung der β Y₁₃₅F-sGC (A, B) und β R₁₃₉L-sGC (C, D) durch den Häm-abhängigen Stimulator BAY 41-2272 sowie den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667, alleine und in Kombination mit DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in der transient transfizierten cGMP Reporterzelle.

Beide Mutanten zeigten das typische Aktivierungsprofil hämfreier sGC. Weder DEA/NO noch BAY 41-2272 führten zu einer mit der WT-sGC vergleichbaren Aktivierung des Enzyms (Abb.: 3.28, Tabelle 3.3). Lediglich in den höchsten Konzentrationen von BAY 41-2272 konnte eine leichte Stimulation um den Faktor 1,5 bis 3,0 beobachtet werden (siehe Tabelle 3.3). Im Gegensatz dazu konnten beide Mutanten durch BAY 58-2667 konzentrationsabhängig aktiviert werden, wobei die jeweiligen EC_{50} -Werte um den Faktor 28 ($\beta Y_{135}F$) bzw. 103 ($\beta R_{139}L$) über den Werten des mit ODQ behandelten WT-Enzyms lagen. ODQ führte bei beiden Mutanten zu keiner weiteren Verstärkung der sGC-Aktivierung durch BAY 58-2667, was auf den Verlust der Hämgruppe hindeutet.

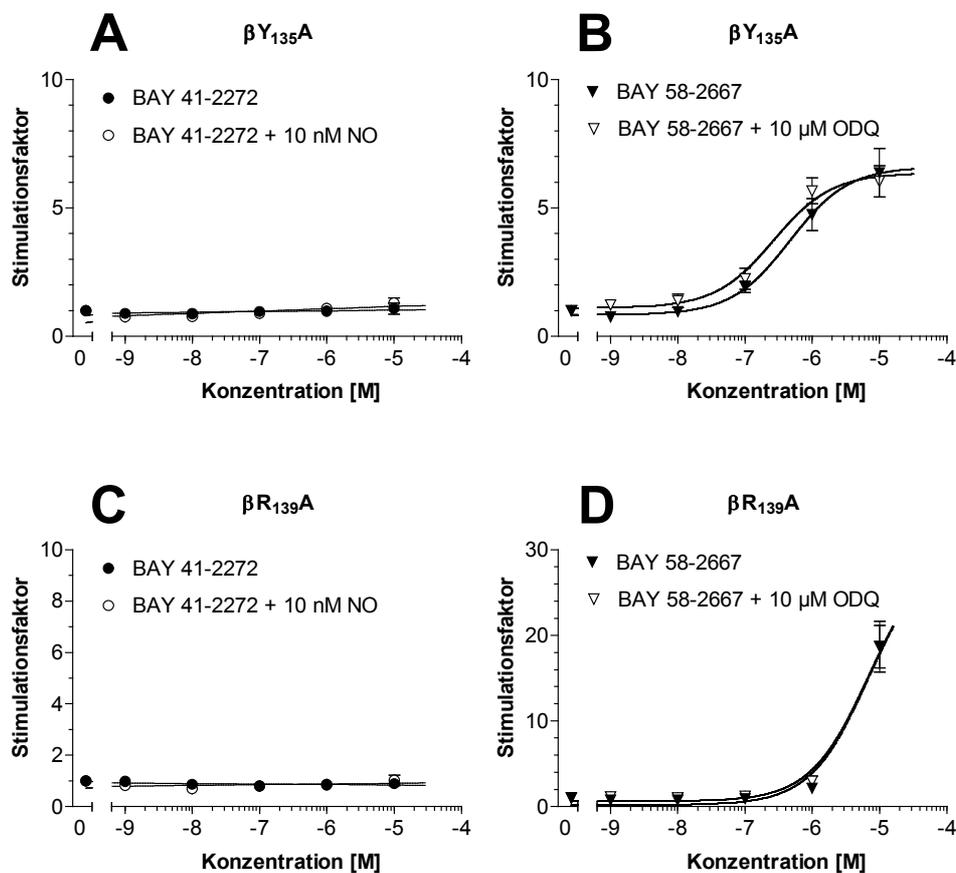


Abbildung 3.29: Dargestellt ist sowohl die konzentrationsabhängige Aktivierung der $\beta Y_{135}A$ -sGC (A, B) und $\beta R_{139}A$ -sGC (C, D) durch den Häm-abhängigen Stimulator BAY 41-2272 sowie den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine und in Kombination mit DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in der transient transfizierten cGMP Reporterzelle.

Der Austausch des Tyr₁₃₅, bzw. des Arg₁₃₉, gegen Alanin führte zu vergleichbaren Aktivierungsprofilen (Abb. 3.29). Beide Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren DEA/NO sowie BAY 41-2272 führten in den höchsten eingesetzten Konzentrationen allein und in Kombination zu keiner Aktivierung beider

Mutanten. Im Gegensatz dazu wurde eine BAY 58-2667-induzierte konzentrationsabhängige Aktivierung beider Mutanten beobachtet, welche durch zusätzliches ODQ nicht steigerbar war. Ähnliche EC_{50} -Werte wurden für BAY 58-2667 am $\beta Y_{135}A$ - und $\beta Y_{135}F$ -Mutanten ermittelt, wogegen die maximale Aktivierung der $\beta Y_{135}A$ -sGC (Faktor 6,4) geringer ausfiel als bei der WT- bzw. $\beta Y_{135}F$ -sGC (siehe Tabelle 3.3).

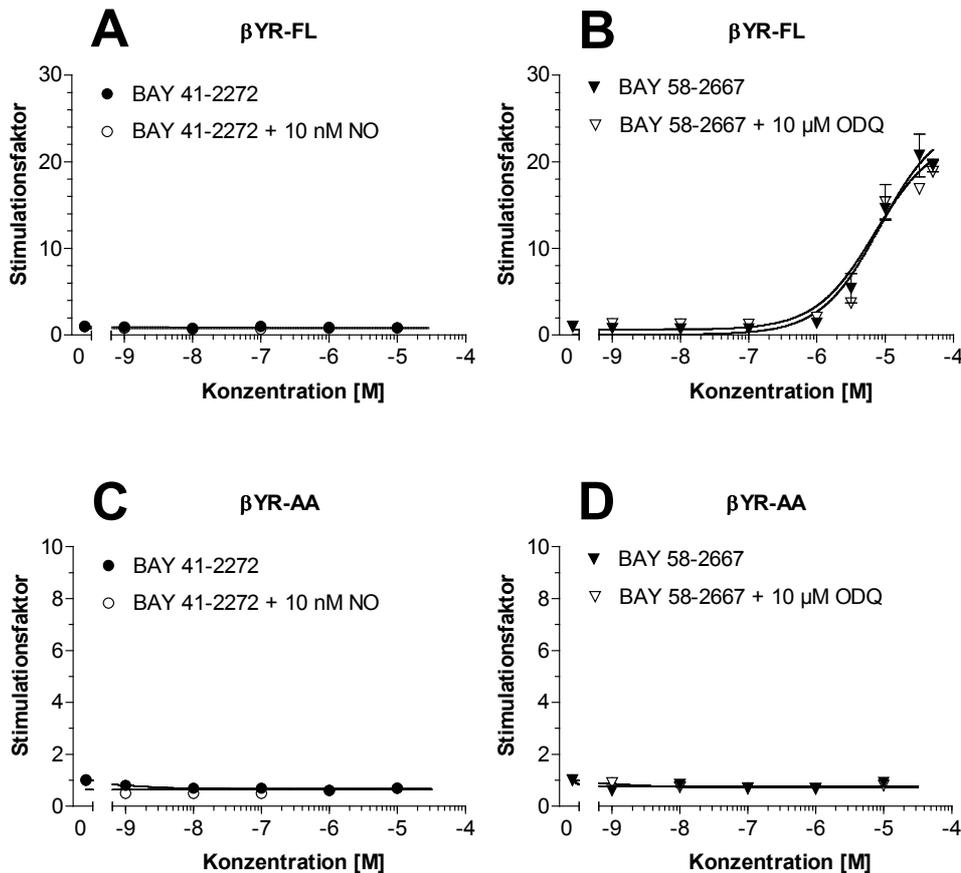


Abbildung 3.30: Dargestellt ist sowohl die konzentrationsabhängige Aktivierung der Doppelmutanten $\beta Y_{135}F+\beta R_{139}L$ (A, B) sowie $\beta Y_{135}A+R_{139}A$ (C, D) durch den Häm-abhängigen Stimulator BAY 41-2272 sowie den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine und in Kombination mit DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in der transfizierten cGMP Reporterzelle.

Der Austausch des Arg₁₃₉ gegen Alanin führte zu einem Enzym, welches durch BAY 58-2667 aktivierbar war, wobei jedoch die maximale Aktivierung mit den im Test einsetzbaren Konzentrationen nicht erreicht werden konnte. Aus dem extrapolierten Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve wurde ein EC_{50} -Wert für BAY 58-2667 am $\beta R_{139}A$ -Mutanten von ca. 7 μ M abgeleitet. Die extrapolierte maximale Stimulation war vergleichbar mit der des nativen Enzyms (Tabelle 3.3).

Der gleichzeitige Austausch des Tyr₁₃₅ gegen Phenylalanin und Arg₁₃₉ gegen Leucin (β YR-FL) führte zum typischen Aktivierungsprofil hämfreier sGC, wie es bereits für die oben genannten Einzelmутanten gezeigt wurde (Abb. 3.30). Aus der nicht-linearen Regression wurde ein EC₅₀-Wert für BAY 58-2667 von 8,3 μ M bestimmt (Tabelle 3.3). Die maximale Stimulation erreichte das Niveau des WT-Enzyms. Der gleichzeitige Austausch des Tyr₁₃₅ und Arg₁₃₉ gegen Alanin (β YR-AA) führte zu einem Enzym, welches weder durch NO, BAY 41-2272 oder BAY 58-2667 alleine, noch in Kombination mit DEA/NO, bzw. ODQ, aktiviert werden konnte. Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse dieser Versuche zusammen.

sGC Mutanten	BAY 41-2272				BAY 58-2667			
	- NO		+ 10 nM NO		- ODQ		+ 10 μ M ODQ	
	EC ₅₀ [nM]	Faktor						
WT	607 \pm 59	15.9 \pm 0.4	386 \pm 44	25.4 \pm 0.5	88.7 \pm 12	7.43 \pm 0.14	16.8 \pm 2.7	25.6 \pm 0.5
β H ₁₀₅ F	nd	2.09 \pm 0.08	nd	2.44 \pm 0.15	11.9 \pm 3.4	7.32 \pm 0.20	11.0 \pm 3.8	7.98 \pm 0.27
β Y ₁₃₅ F	nd	1.63 \pm 0.03	nd	3.04 \pm 0.10	471 \pm 45	33.9 \pm 0.6	366 \pm 32	33.8 \pm 0.6
β Y ₁₃₅ A	nd	nd	nd	nd	460 \pm 93	6.60 \pm 0.23	264 \pm 51	6.36 \pm 0.17
β R ₁₃₉ L	nd	1.75 \pm 0.08	nd	2.91 \pm 0.21	1725 \pm 398	21.9 \pm 1.31	1011 \pm 294	21.1 \pm 1.6
β R ₁₃₉ A	nd	nd	nd	nd	7000 ^a	25 ^a	7000 ^a	25 ^a
β YR-FL	nd	nd	nd	nd	8300 ^a	25 ^a	7000 ^a	23 ^a
β YR-AA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabelle 3.3: Dargestellt sind die ermittelten EC₅₀-Werte (nM) sowie die maximalen Aktivierungsfaktoren von BAY 41-2272 und BAY 58-2667 in An- und Abwesenheit von DEA/NO, bzw. ODQ, für die verschiedenen sGC-Mutanten. nd = nicht detektierbar, ^a = durch Extrapolation ermittelte Werte.

Alle konstruierten Mutanten wurden mit 10 nM und 1 μ M DEA/NO inkubiert. Das native WT-Enzym ließ sich durch beide Konzentrationen DEA/NO um Faktor 2,2 bzw. 27,8 aktivieren, während die in Tabelle 3.3 aufgeführten sGC-Mutanten nicht NO-stimulierbar waren (Abb. 3.31). Die restlichen nach dem Sequenzalignment (Abb. 3.26) konstruierten Mutanten β S₅₆, β R₁₁₆, β K₁₂₉, β S₁₃₇, β Q₁₅₅, β Q₁₅₆ und β H₁₅₈ zeigten in Gegenwart von DEA/NO, BAY 41-2272 oder BAY 58-267 ein dem WT-Enzym vergleichbares Aktivierungsprofil und wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

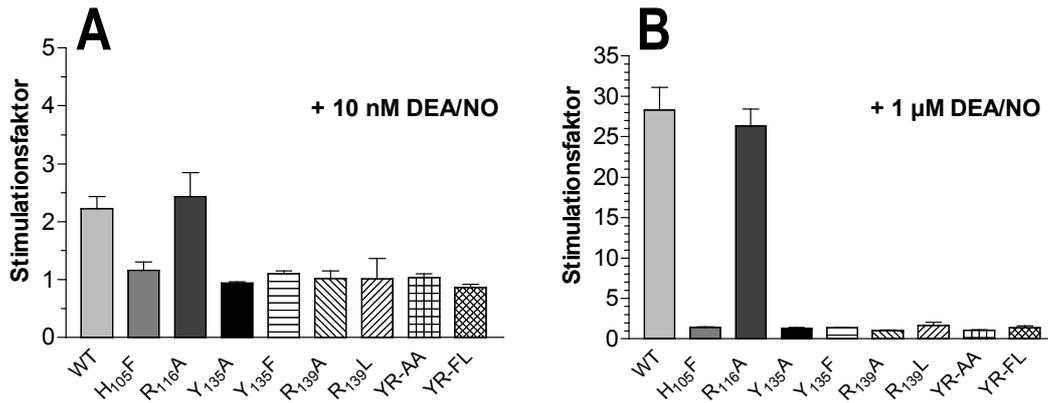


Abbildung 3.31: Dargestellt ist die Aktivierung des WT-Enzyms und verschiedener sGC-Mutanten durch 10 nM (A) bzw. 1 μ M DEA/NO (B) in der transient transfizierten cGMP Reporterzelle. Die Enzymaktivierung ist aufgetragen als Stimulationsfaktor normiert auf die transfizierte und nicht stimulierte Kontrolle. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von 6-16 unabhängigen Experimenten.

3.7.3 PPIX-Rekonstitution an exprimierten β Y₁₃₅F- und β R₁₃₉L-Mutanten

Die oben beschriebenen Mutagenesestudien legten eine maßgebliche Bedeutung der OH-Gruppe des Tyrosins₁₃₅ und der positiven Ladung des Arginins₁₃₉ für die Bindung der prosthetischen Hämgruppe der sGC nahe. Aus diesem Grund wurde versucht, das native WT-Enzym, bzw. die β Y₁₃₅F- und β R₁₃₉L-Mutanten, mit PPIX zu rekonstituieren. PPIX, die eisenfreie Vorstufe des Häms, imitiert den Nitrosyl-Häm-Komplex und führt dadurch zu einer Aktivierung der sGC. WT-, β Y₁₃₅F- und β R₁₃₉L-sGC wurde transient in CHO-Zellen exprimiert und der sGC-haltige 100.000 g Überstand der lysierten Zellen ohne weitere Aufreinigungsschritte zur PPIX-Rekonstitution verwendet. Allen Ansätzen wurde Tween-20 zugegeben, um das in wässriger Lösung als Dimer vorliegende PPIX zu monomerisieren und die Rekonstitution der sGC mit PPIX zu erleichtern. Die folgende Abbildung fasst die Ergebnisse dieser Experimente zusammen.

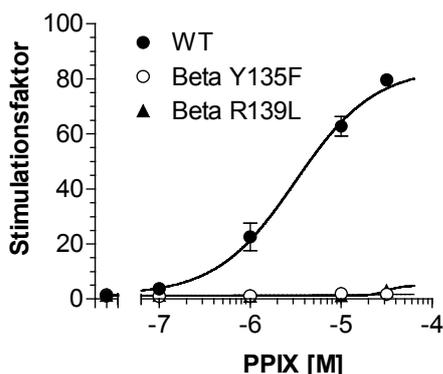


Abbildung 3.32: Dargestellt ist die durch PPIX-Rekonstitution induzierte Aktivierung der WT-, β Y₁₃₅F- und β R₁₃₉L-sGC. Die Enzymaktivierung ist aufgetragen als Stimulationsfaktor normiert auf die Basalaktivität. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

Die WT-sGC ließ sich konzentrationsabhängig mit PPIX rekonstituieren. Aus der nicht-linearen Regression wurde eine maximale Aktivierung um den Faktor 79,3 mit einem EC_{50} -Wert von 3,1 μM ermittelt. Im Gegensatz dazu zeigte der $\beta\text{Y}_{135}\text{F}$ -Mutant selbst in Gegenwart mikromolarer Konzentrationen an PPIX keine Aktivierung. Auch für den $\beta\text{R}_{139}\text{L}$ -Austausch wurde nach Inkubation mit 30 μM PPIX nur eine maximale Aktivierung um den Faktor 3,1 beobachtet.

3.7.4 Aktivierung der nativen und oxidierten sGC durch hohe Konzentrationen BAY 58-2667

Um zu untersuchen, ob eine Konkurrenz zwischen BAY 58-2667 und der Hämgruppe der sGC gegeben ist (wie die unter 3.1.2 gezeigten spektroskopischen Befunde nahe legten), wurde die Aktivierung der sGC durch hohe Konzentrationen BAY 58-2667 in An- und Abwesenheit von ODQ untersucht. In Gegenwart von ODQ wurde eine konzentrationsabhängige, sigmoide Aktivierungskurve mit einem EC_{50} -Wert von 9,6 nM beobachtet. Ab ca. 300 nM stellte sich dabei eine Sättigung ein. Demgegenüber wurde für das native Enzym ohne weitere Inkubation mit ODQ ein biphasischer Aktivierungsverlauf beobachtet. Für den ersten Aktivierungsschritt (von 0,5 nM bis ca. 50 nM BAY 58-2667) wurde ein EC_{50} -Wert von 3,6 nM ermittelt. Ab einer Konzentration von 10 μM BAY 58-2667 (bis zur Löslichkeitsgrenze der Substanz) konnte eine weitere Aktivierung des Enzyms beobachtet werden. Für diesen zweiten Aktivierungsschritt konnte, unter der Annahme einer vergleichbaren maximalen Enzymaktivierung, wie sie für die ODQ behandelte sGC beobachtet wurde, ein EC_{50} -Wert von ca. 135 μM extrapoliert werden.

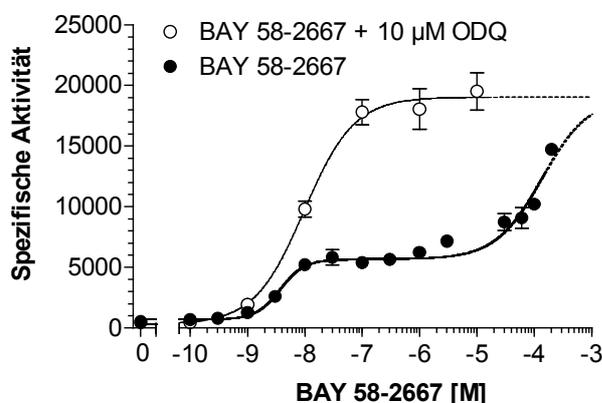


Abbildung 3.33: Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Aktivierung der gereinigten WT-sGC durch BAY 58-2667 in An- und Abwesenheit von ODQ aufgetragen als spezifische Aktivität ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die NO-unabhängige Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 sowie den erst kürzlich entdeckten Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 molekularbiologisch und biochemisch untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Klärung des bisher unbekanntes Aktivierungsmechanismus durch BAY 58-2667.

4.1 UV/Vis-Spektroskopie

Da NO als Aktivator der sGC über eine Interaktion mit dem zentralen Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe zur Aktivierung des Enzyms führt (Ignarro *et al.*, 1987; Stone *et al.*, 1995), sollte untersucht werden, ob eine vergleichbare Interaktion mit den NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren BAY 41-8543 und BAY 58-2667 ebenfalls zu beobachten war. In unseren Untersuchungen führte NO, in Übereinstimmung mit publizierten Daten, zu einer Verschiebung der charakteristischen Soretbande des Häms von 431 nm zu 398 nm (Ignarro *et al.*, 1986; Hönicka *et al.*, 1999). Demgegenüber konnte nach Inkubation mit dem Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-8543 keine Veränderung der Soretbande beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden für die chemischen Analoga BAY 41-2272 und YC-1 beschrieben (Friebe und Kösling, 1998; Denninger *et al.*, 2000; Stasch *et al.*, 2001). Der Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 führte sowohl alleine als auch in Kombination mit NO ebenfalls zu keiner Verschiebung des Absorptionsmaximums. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine direkte Interaktion beider NO-unabhängigen Aktivatoren mit dem Hämeisen und für einen neuen Wirkmechanismus. Allerdings kann durch diese UV/Vis-Spektren eine mögliche Interaktion beider Substanzklassen mit Teilen der Hämbindungstasche der sGC oder mit Seitenketten des Häms nicht ausgeschlossen werden. Eine solche Interaktion wurde für den Häm-abhängigen Stimulator YC-1 am NO bzw. CO aktivierten Enzym nach Raman-Resonanz-Spektroskopischen Untersuchungen postuliert, und wäre, in analoger Weise, auch für BAY 41-8543 nicht ausgeschlossen (Denninger *et al.*, 2000). Insgesamt belegen diese Ergebnisse klar, dass sich die Aktivierungsmechanismen der beiden verschiedenen Klassen NO-unabhängiger sGC-Aktivatoren fundamental von dem der NO-induzierten Enzymaktivierung unterscheiden.

4.2 Aktivierung der isolierten sGC durch BAY 41-8543 und BAY 58-2667

NO-unabhängige sGC-Stimulatoren wie YC-1, BAY 41-2272 oder BAY 41-8543 wurden in der Literatur der letzten Jahre beschrieben (Ko *et al.*, 1994; Mülsch *et al.*, 1997; Friebe und Kösling, 1998; Stasch *et al.*, 2001, 2002a,b). Neben diesen bekannten NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren wurde vor kurzem der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 entdeckt (Stasch *et al.*, 2002c). Die Charakteristika der sGC-Aktivierung durch BAY 58-2667 sowie BAY 41-8543 am rekombinanten hochgereinigtem Enzym wurden bestimmt und miteinander verglichen. Dazu wurden Aktivierungsprofile beider Substanzen in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an NO-Donoren als auch ODQ ermittelt.

BAY 41-8543 induzierte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Enzymaktivität von 0,1 μM bis 100 μM , welche in Kombination mit verschiedenen NO Konzentrationen zu einer starken überadditiven Aktivierung der sGC führten. Erwartungsgemäß reduzierte der sGC-Inhibitor ODQ die durch BAY 41-8543 induzierte Enzymaktivierung. Diese Ergebnisse bestätigen die beobachteten Charakteristika der Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und YC-1 (Friebe *et al.*, 1996; Mülsch *et al.*, 1997; Friebe und Kösling, 1998; Stasch *et al.*, 2001, 2002a). BAY 58-2667 aktivierte die sGC konzentrationsabhängig von 1 nM bis 100 nM, und damit ab einer deutlich niedrigeren Schwellenkonzentration als BAY 41-8543. Die Zugabe von unterschiedlichen NO-Konzentrationen führte nur zu einem additiven Effekt über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von BAY 58-2667. Überraschenderweise potenzierte der sGC-Inhibitor ODQ die Wirkung von BAY 58-2667 auf die sGC-Aktivierung (Stasch *et al.*, 2002c). Es ist beschrieben, dass ODQ das Hämeisen der sGC von Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000), was zu Veränderungen der Sekundärstruktur des Enzyms führt (Stone *et al.*, 1996; Kosarikov *et al.*, 2001). Für eine solche strukturelle Veränderung am Enzym spricht auch die ODQ-induzierte Verschiebung des Musters des BAY 58-2667 Photoaffinitätslabelings (siehe 3.4.2; Stasch *et al.*, 2002c). Diese Strukturänderung der sGC, die, wie sich in späteren Untersuchungen dieser Arbeit herausstellte, auf einer Verdrängung des oxidierten Häms durch BAY 58-2667 beruht, könnte für die potenzierte Wirkung von BAY 58-2667 in Gegenwart von ODQ mitverantwortlich sein. In Kombination hatten beide NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren BAY 58-2667 und BAY 41-8543 einen additiven Effekt auf die Aktivierung der sGC. Diese Ergebnisse sprechen, ebenso wie die unterschiedlichen Aktivitätsprofile, für das Vorhandensein verschiedener unabhängiger Mechanismen der Enzymaktivierung durch diese beiden Substanzklassen.

Da beide NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren deutlich verschiedene Aktivierungsprofile zeigten, wurde der Einfluss von BAY 41-8543 sowie BAY 58-2667 alleine und in Kombination mit NO bzw. ODQ auf die kinetischen Parameter K_m und V_{max} am isolierten Enzym bestimmt. Für die basale Enzymaktivität wurde ein K_m -Wert von 74 μM und ein V_{max} -Wert 0,13 $\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bestimmt, in guter Übereinstimmung mit Messungen anderer Gruppen (Ignarro *et al.*, 1984; Denninger *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Die Affinität der sGC zu ihrem Substrat GTP wurde durch die verschiedenen sGC-Modulatoren kaum beeinflusst. ODQ führte zu einer leichten Erhöhung des in Anwesenheit von BAY 41-8543 bzw. BAY 58-2667 bestimmten K_m -Wertes, wie bereits für die NO-aktivierte sGC beschrieben (Olesen *et al.*, 1997). Eine geringe Erhöhung des K_m -Wertes wurde nach Zugabe von DEA/NO beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Daten, welche eine Erniedrigung des K_m -Wertes durch NO belegen (Wolin *et al.*, 1982; Denninger *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Diese Diskrepanz könnte darauf beruhen, dass in dieser Untersuchung nur sehr geringe NO Konzentrationen verwendet wurden, während die veröffentlichten K_m -Werte unter maximaler NO-Aktivierung bestimmt wurden. Ein kürzlich vorgeschlagenes Modell für den Mechanismus der NO-induzierten Enzymaktivierung postuliert die Bildung eines sechsbindigen NO-Häm-Histidin-Komplexes, der jedoch kaum zur Aktivierung der sGC beiträgt (Zhao *et al.*, 1999; Ballou *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 2003). Dieses Intermediat zerfällt zum pentakoordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex, der zur maximalen Aktivierung des Enzyms führt. Die Autoren postulieren, dass die Geschwindigkeit des zweiten Enzym aktivierenden Schrittes stark von der NO Konzentration abhängt, so dass der in dieser Arbeit in Gegenwart von sehr geringen Mengen NO ermittelte K_m -Wert möglicherweise nicht direkt mit den Literaturdaten vergleichbar ist. Die beobachteten Veränderungen der K_m -Werte durch die verschiedenen sGC-Aktivatoren sind zu gering, um für deren starke Beeinflussung der Enzymaktivität verantwortlich zu sein. Somit beruht die Aktivierung in erster Linie auf einer Erhöhung der maximalen katalytischen Aktivität V_{max} . Die bestimmten V_{max} -Werte spiegeln die Charakteristika der Aktivitätsprofile wieder: BAY 41-8543 führte in Kombination mit NO zu einer starken Potenzierung der maximalen katalytischen Aktivität auf das über 460-fache der basalen Katalyse. Dies ist in Übereinstimmung mit Befunden, die mit dem strukturell ähnlichen Analogon YC-1 beobachtet wurden (Denninger *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Dagegen war die Wirkung von BAY 58-2667 und NO auf den V_{max} -Wert nur additiv. Der sGC-Inhibitor ODQ senkte die katalytische Aktivität des BAY 41-8543 stimulierten Enzyms, wogegen der V_{max} -Wert für die BAY 58-2667 aktivierte sGC durch ODQ stark potenziert wurde. Diese Befunde zeigen, dass die charakteristischen Aktivierungsprofile beider NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren vorwiegend auf eine starke Erhöhung der maximalen Katalysegeschwindigkeit zurückzuführen sind, während sich die Affinität von GTP zur sGC kaum verändert.

Wie beschrieben zeigte BAY 41-8543 in Kombination mit NO einen starken Synergismus auf die Enzymaktivität, während für BAY 58-2667 und NO nur ein additiver Effekt beobachtet werden konnte. Um diesen Unterschied näher zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes in An- und Abwesenheit von BAY 41-8543 sowie BAY 58-2667 bestimmt. Für die native NO-aktivierte sGC ergab sich eine Halbwertszeit von 1,6 Sekunden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Daten anderer Gruppen, die durch spektroskopische sowie enzymatische Untersuchungen eine Halbwertszeit von 5 bzw. 4,2 Sekunden bestimmen konnten (Kharitonov *et al.*, 1997; Russwurm *et al.*, 2002). Durch Zugabe von BAY 41-8543 wurde diese Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes um den Faktor 220 auf ca. 6 Minuten verlängert. Auch für YC-1 wurde eine Verlängerung der Halbwertszeit des Nitrosyl-Häm-Komplexes um den Faktor 155 beschrieben (Russwurm *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu kam es durch Zugabe von BAY 58-2667 zu keiner signifikanten Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes. Diese Ergebnisse könnten sowohl den starken Synergismus zwischen BAY 41-8543 und NO als auch den rein additiven Effekt von BAY 58-2667 und NO auf die sGC Aktivität erklären.

4.3 Rezeptorbindungsstudien mit BAY 58-2667

Die Etablierung einer Rezeptorbindungsstudie für lösliche Proteine ist, je nach den physiokochemischen Eigenschaften des Rezeptors und des Liganden, generell problematisch. Bisher konnte deshalb mit den bekannten NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren kein funktionierender Assay aufgebaut werden (Becker, unveröffentlichte Ergebnisse; Martin *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte erstmals eine klassische Rezeptorbindungsstudie für NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren an der sGC etabliert werden. Mit steigender Konzentration von ³H-BAY 58-2667 konnte eine Sättigung der Bindung des Radioliganden an die sGC erreicht und ein K_D von 3,2 nM bestimmt werden. Diese hochaffine Bindung von BAY 58-2667 an die sGC korrelierte mit Ergebnissen an isolierten Aorten und am Langendorff-Herz, die eine gefäßrelaxierende Wirkung im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich belegen (Stasch *et al.*, 2002c). Durch Zugabe von ODQ verdoppelte sich die maximale sättigbare Bindung an die sGC. Die gemessenen Werte werden optimal durch ein Regressionsmodell, basierend auf der Bindung zweier Liganden, beschrieben. Beide Hinweise deuteten die Möglichkeit der Existenz einer zweiten Bindungsstelle für BAY 58-2667 an der sGC an. Nach dieser Hypothese wäre eine Bindungsstelle im nanomolaren Konzentrationsbereich sättigbar, während die Affinität der zweiten Bindungsstelle, zumindest im reduzierten Zustand der Hämgruppe, extrem niedrig wäre. Erst die Oxidation des Häms der sGC durch ODQ würde die Affinität dieser zweiten Bindungsstelle derartig

erhöhen, dass sie durch die maximal eingesetzte Konzentration (300 nM) an ^3H -BAY 58-2667 gesättigt werden könnte. Diese starke Erniedrigung des K_D -Wertes von BAY 58-2667 für die Bindung an einer möglichen zweiten „oxidationsabhängigen“ Bindungsstelle könnte durch Veränderungen in der räumlichen Struktur der sGC erklärt werden. Solche Veränderungen der Enzymstruktur nach Oxidation sind in der Literatur beschrieben (Stone *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1998; Kosarikov *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte in den Rezeptorbindungsstudien eindeutig gezeigt werden, dass der Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 nicht in der Lage war, ^3H -BAY 58-2667 zu verdrängen. Dies belegt das Vorhandensein verschiedener allosterischer Bindungsstellen für die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren und die Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren am Enzym und ist in Übereinstimmung mit dem beobachteten additiven Effekt beider Substanzklassen auf die sGC-Aktivierung.

4.4 Photoaffinitätslabeling der sGC

Ein Photoaffinitätslabeling ist ein probates Mittel zur Identifizierung von Aminosäuren, welche an der Bildung einer Bindungstasche für einen Liganden beteiligt sein könnten. Um mögliche an der Bindung von BAY 58-2667 beteiligte Aminosäuren zu identifizieren, wurde in die chemische Grundstruktur eines Derivates von BAY 58-2667 eine photolabile Azidogruppe als Substituent eingeführt. Eine solche Kopplung wird häufig unter Verwendung eines aromatischen „Spacers“ durchgeführt, der zur Stabilisierung des nach UV-Bestrahlung entstehenden Nitrens dient (Pinney und Katzenellenbogen, 1991). Im Fall von BAY 58-2667 konnte darauf jedoch verzichtet werden, da BAY 58-2667, bzw. dessen Derivat, bereits über einen geeigneten Aromaten verfügte (siehe 2.1).

Zur Identifizierung der nach der UV-Bestrahlung markierten Aminosäuren wurde das Photoaffinitätslabel (PAL) BAY 61-2673 darüber hinaus an der Benzoe Gruppe tritiert (Shu *et al.*, 2000). Auf das in Enzymassays üblicherweise verwendete Reduktionsmittel DTT wurde verzichtet, da das photoaktivierte PAL durch die Reaktion mit der Thiolgruppe des DTT hätte inaktiviert werden können (Thomas und Pfeuffer, 1991; Becker *et al.*, 2001). Unter diesen Bedingungen aktivierte BAY 61-2573 die sGC mit den gleichen Charakteristika wie BAY 58-2667 und konnte die Ursprungssubstanz in einer Rezeptorbindungsstudie mit vergleichbarer Affinität von der sGC verdrängen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass, trotz der chemischen Modifikation der Grundstruktur, das PAL die gleiche Bindungsstelle wie BAY 58-2667 verwendete, und dass es dadurch eine Aktivierung der sGC mit den selben Charakteristika und vergleichbarer Wirkstärke wie die Ursprungssubstanz induzierte. In dieser Photoaffinitätslabelstudie

konnte gezeigt werden, dass das ^3H -PAL nach UV-Bestrahlung die sGC konzentrationsabhängig zu gleichen Teilen sowohl an der α - als auch an der β -Untereinheit markierte. Die ausgebildete kovalente Bindung des ^3H -PAL an die sGC war unter den verwendeten Versuchsbedingungen (TCA-Fällung, reduzierende SDS-PAGE) stabil. Die Markierung der sGC durch ^3H -PAL konnte durch einen Überschuss an nicht radioaktiv markiertem PAL um bis zu 80% reduziert werden. Ohne UV-Bestrahlung wurde nur ein vernachlässigbares Labeling der sGC erzielt. Diese Befunde sprechen für eine spezifische Markierung der sGC durch das ^3H -PAL. Die gleichverteilte Markierung beider Untereinheiten der sGC könnte ein Hinweis auf zwei getrennte Bindungsstellen für BAY 58-2667 an der α - und an der β -Untereinheit sein. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass eine Bindungstasche für BAY 58-2667 durch Aminosäuren beider Untereinheiten gebildet wird, wodurch das ^3H -PAL mit Aminosäuren sowohl der α - als auch der β -Untereinheit der sGC abreagieren könnte.

Darüber hinaus wurde der Einfluss anderer sGC-Modulatoren auf die ^3H -PAL-Markierung der sGC untersucht. Erwartungsgemäß reduzierte auch die Ursprungssubstanz des PAL, BAY 58-2667, das Labeling der sGC. Im Gegensatz dazu führte weder NO noch der Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 zu einer Veränderung der ^3H -PAL-Markierung der sGC. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Aktivitätsassays und den Rezeptorbindungsstudien, die beide Hinweise auf unabhängige Bindungsstellen und Aktivierungsmechanismen für beide Substanzklassen lieferten. Der sGC-Inhibitor ODQ führte interessanterweise zu einer Verschiebung der Markierung durch ^3H -PAL von der α - auf die β -Untereinheit der sGC. Diese Verschiebung könnte ein Hinweis auf eine durch Oxidation des Häms ausgelöste Veränderungen in der räumlichen Struktur der sGC sein, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Stone *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1998; Kosarikov *et al.*, 2001). Sollten zwei Bindungsstellen für BAY 58-2667 an der sGC existieren, könnte eine Veränderung der räumlichen Struktur die kovalente Kopplung des ^3H -PAL an die α -Untereinheit der sGC erschweren, was zu einer verminderten Markierung dieser Untereinheit führen würde. Eine veränderte Tertiärstruktur der sGC könnte jedoch auch zu einer Positionierung der reaktiven Nitrengruppe des ^3H -PAL in eine räumliche Nähe zu Aminosäuren der β -Untereinheit führen. Dies würde im Fall einer einzelnen Bindungsstelle für BAY 58-2667 zu einer schwächeren Markierung der α - und zu einer stärkeren Markierung der β -Untereinheit führen.

Da der sGC Aktivitätsassay vergleichbare Ergebnisse sowohl für die oxidierte als auch für die hämfreie sGC erbrachte, wurde das Photolabeling ebenfalls mit hämfreier sGC wiederholt. Auch in diesem Experiment zeigte sich die Verstärkung der ^3H -PAL-Markierung an der β -Untereinheit der sGC. Die

Oxidation des Häms führt zu einer starken Destabilisierung von dessen Bindung an die sGC (Hobbs, 2000). Vor diesem Hintergrund könnten die übereinstimmenden Ergebnisse hämfreier und oxidiertes sGC im Photoaffinitätslabeling sowie im Aktivitätsassays ein Indiz dafür sein, dass die Oxidation des Häms letztendlich zu dessen Entfernung vom Enzym führen könnte.

Um die Position der markierten Aminosäuren der α - und der β -Untereinheit näher einzugrenzen, wurde das Photolabeling wiederholt und die sGC anschließend mit Bromcyan inkubiert. Bromcyan führt, durch Umwandlung von Methionin zu Homoserin, zu einer Spaltung des Proteins C-terminal der Methionine. Diese Methode hat gegenüber verschiedenen Endoproteinasen den Vorteil, dass sie aufgrund der geringen Häufigkeit von Methionin relativ große Spaltfragmente erzeugt, die sich gelchromatographisch trennen lassen. Da beide Untereinheiten der sGC markiert wurden und eine Proteinspaltung selten zu einer kompletten Fragmentierung des Proteins führt, waren nach der Spaltung der sGC mehrere radioaktiv markierte Fragmente zu erwarten (Becker *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2001). Um diese Fragmente für die folgende Sequenzierung mit ausreichender Auflösung zu trennen, wurden die Peptide in einer 2D-PAGE nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht separiert. Ein weiterer Vorteil dieser Methode bestand darin, dass die exakte Fokussierung der Peptide in „Spots“ auf der Blotmembran zu einer kaum detektierbaren, unspezifischen Radioaktivität bei der nachfolgenden Peptidsequenzierung führte. Anhand der Sequenzierung konnten die radioaktiven sGC-Fragmente identifiziert, und dadurch die durch das ^3H -PAL markierten Bereiche eingegrenzt werden. Das PAL wurde am Tyr₃₇₁ der α -Untereinheit und im Bereich der Aminosäuren 231-310 der β -Untereinheit lokalisiert. Eine weitere Eingrenzung des markierten Bereichs der β -Untereinheit war nicht möglich.

Um eine mögliche Interaktion des durch das ^3H -PAL markierten αTyr_{371} oder benachbarten Aminosäuren mit BAY 58-2667 zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten konstruiert und mit dem beschriebenen System getestet. Im Bereich um das αTyr_{371} wurden folgende Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht: $\alpha 344$ - 345A , $\alpha 348\text{A}$, $\alpha 350$ - 354A , $\alpha 357$ - 361A , $\alpha 362$ - 363A , $\alpha 364\text{A}$, $\alpha 366\text{A}$, $\alpha 368$ - 369A , $\alpha 371$ - 375A , $\alpha 380\text{A}$, $\alpha 383\text{A}$, $\alpha 387$ - 388A , $\alpha 390$ - 391A , $\alpha 392$ - 395A , $\alpha 398\text{A}$ und $\alpha 400$ - 401A . Diese Konstrukte zeigten, mit Ausnahme der Mutanten $\alpha 371$ - 375A und $\alpha 344$ - 345 , im Hinblick auf ihre Aktivierbarkeit durch BAY 58-2667 ein dem WT-Enzym vergleichbares Verhalten und wurden nicht weiter untersucht. Bei den Mutanten $\alpha 371$ - 375 und $\alpha 344$ - 345 wurde eine leicht verminderte sGC-Aktivierung durch BAY 58-2667 beobachtet, bei gleichzeitiger, dem WT-Enzym vergleichbarer, Stimulation durch NO und BAY 41-2272. Da das Photoaffinitätslabel eine möglichst unveränderte Aktivierung der sGC induzieren musste, wurde die photolabile Azidogruppe in den Bereich von BAY

58-2667 eingeführt, der aufgrund der bekannten SAR größere Variationen tolerierte, ohne die Wirkung der Substanz zu stark zu beeinträchtigen. Der Beitrag dieses um die Azidogruppe erweiterten hydrophoben Bereichs von BAY 58-2667 an einer Interaktion mit dem Enzym ist daher vermutlich relativ gering. Vor diesem Hintergrund war der beobachtete schwache Einfluss der mutierten Aminosäuren auf die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung nicht überraschend.

4.5 Expression des N-terminalen Fragments der sGC β -Untereinheit

Eine Expression der sGC in *E. Coli* würde die Produktion größerer Mengen Protein vor allem zur Kristallisation erheblich vereinfachen. Trotz diverser Versuche konnten bisher nur ein 385 Aminosäuren langes sowie mehrere ca. 200 Aminosäuren lange N-terminale Fragmente der β -Untereinheit der sGC in *E. Coli* exprimiert werden (Zhao *et al.*, 1997; Schelvis *et al.*, 1998; Marletta *et al.*, 2003). Diese Fragmente besitzen sehr ähnliche spektroskopische Eigenschaften, wie die native sGC, woraus geschlossen wurde, dass eine N-terminale ca. 200 Aminosäuren umfassende Domäne der β -Untereinheit zur Bindung des Häms ausreichend ist (Zhao *et al.*, 1997; Marletta *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Expression des N-terminalen 200 Aminosäuren langen Fragments der β -Untereinheit in *E. Coli* in löslicher Form möglich ist. Da die Ausbeute geringer ausfiel als in den Arbeiten anderer Labore beschrieben, konnten an diesem exprimierten Fragment ohne weitere Aufreinigungen keine Untersuchungen durchgeführt werden (Zhao *et al.*, 1998). Eine Aufreinigung eines getaggtten 200 Aminosäuren langen Fragments ist für weiterführende Experimente geplant, zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht abgeschlossen.

4.6 Wechselwirkung zwischen ODQ, Häm und BAY 58-2667 an der sGC

Die in den vorangegangenen Experimenten beobachtete Potenzierung der BAY 58-2667-induzierten sGC-Aktivierung durch ODQ sollte näher beleuchtet werden. ODQ führt über die Oxidation des Hämeisens zur Inhibition der NO-, YC-1 oder BAY 41-2272 aktivierten sGC (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000; Stasch *et al.*, 2001). Bis heute konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob ODQ neben der Oxidation des Häms mit einer putativen Bindungsstelle interagiert, was möglicherweise die Spezifität von ODQ zur sGC gegenüber anderen Hämproteinen erklären könnte (Feelisch *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Mit BAY 58-2667 steht nun ein

Hilfsmittel zur Verfügung, um diese Frage, zumindest im Hinblick auf den potenzierenden Einfluss von ODQ auf die BAY 58-2667-induzierte Enzymaktivierung, anzugehen. Um die Wirkung von ODQ über die Oxidation der Hämgruppe der sGC zu unterbinden, musste diese durch Inkubation mit dem Detergenz Tween-20 entfernt werden (Förster *et al.*, 1996). Die Trennung von Detergenz, freiem Häm und Apoenzym ist in der Literatur zwar beschrieben (Ignarro *et al.*, 1986; Servass *et al.*, 1998), führte jedoch zu keinem befriedigenden Ergebnis, bzw. war technisch aufwendig (Förster *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Protokoll etabliert, welches, basierend auf käuflich erhältlichen Zentrifugations-Ionenaustauschern, eine einfache und effiziente Trennung des hämfreien Apoenzyms erlaubte. Mit dem so gewonnenen hämfreien Enzym wurden anschließend spektroskopische Untersuchungen, Aktivitätsassays sowie Rezeptorbindungsstudien durchgeführt.

Die UV/Vis-Spektren der mit der hier etablierten Methode gewonnenen hämfreien sGC zeigten, in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten, ein UV/Vis-Spektrum ohne die typische Soretbande (Förster *et al.*, 1996). Dagegen war bei der ohne Detergenz inkubierten Kontrolle ein klares Absorptionsmaximum bei 431 nm zu beobachten. In den nachfolgenden Tests zeigte sowohl das hämhaltige als auch das hämfreie Enzym das erwartete Aktivierungsprofil: Eine konzentrationsabhängige Aktivierung durch DEA/NO und den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 sowie einen starken Synergismus bei deren Kombination (Mülsch *et al.*, 1997; Friebe und Kösling 1998; Stasch *et al.*, 2001). BAY 58-2667 führte zu der erwarteten Aktivierung der hämhaltigen sGC. Darüber hinaus wurde die durch eine konstante Konzentration an BAY 58-2667 induzierte sGC Aktivität durch eine steigende Konzentration an ODQ potenziert (Stasch *et al.*, 2002c). Für diese ODQ verursachte Steigerung der Enzymaktivität wurde ein EC₅₀-Wert (für ODQ) von 170 nM bestimmt. Die parallel zum Aktivitätsassay in den Rezeptorbindungsuntersuchungen eingesetzte hämhaltige sGC zeigte mit steigender Konzentration an ODQ eine erhöhte spezifische Bindung von ³H-BAY 58-2667 an die sGC mit einem EC₅₀-Wert für ODQ von 190 nM. Die spezifische Bindung wurde zwar durch ODQ erhöht, erreichte jedoch keine Verdopplung wie in den Rezeptorbindungsstudien (Stasch *et al.*, 2002c). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die ³H-BAY 58-2667 Konzentration für diese Untersuchungen unterhalb der Sättigungskonzentration gewählt wurde. Andererseits konnte durch die hier gewählten experimentellen Bedingungen die unspezifische Bindung des Radioliganden deutlich reduziert werden, so dass sich bei der geringen Menge an eingesetzter sGC ein optimales Signal-Rauschverhältnis erzielen ließ. Die ermittelten EC₅₀-Werte für ODQ in Bezug auf die Steigerung der spezifischen Bindung von ³H-BAY 58-2667 in den Rezeptorbindungsstudien und der Steigerung der Aktivität im Enzymassay waren in der gleichen Größenordnung. Damit konnte der kausale Zusammenhang zwischen der

erhöhten Bindung von BAY 58-2667 und der Potenzierung der BAY 58-2667-induzierten sGC Aktivität durch Oxidation des Häms belegt werden.

Im zweiten Teil der Studie wurde an der hämfreien sGC untersucht, ob ODQ eine über die Oxidation des Häms hinausgehende Wirkung auf die BAY 58-2667 aktivierte sGC besitzt. Die Aktivierung des Enzyms durch DEA/NO und den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 wurde teilweise um über 90% reduziert, was für die fast vollständige Entfernung des Häms durch die in dieser Arbeit entwickelte Methode spricht. Die geringe verbliebene Aktivierung dürfte auf eine Restpopulation hämhaltiger sGC zurückzuführen sein, wie sie auch von Anderen beschrieben wurde (Förster *et al.*, 1996). BAY 58-2667 führte zu einer vergleichbar starken Aktivierung wie an der oxidierten hämhaltigen sGC, die sich, in Übereinstimmung mit publizierten Daten, durch ODQ nicht weiter steigern ließ (Stasch *et al.*, 2002c). Die spezifische Bindung von ³H-BAY 58-2667 wurde durch steigende Mengen ODQ ebenfalls nicht weiter erhöht. Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen konnte somit ein Häm-unabhängiger Mechanismus für ODQ ausgeschlossen werden.

Um die Bedeutung der Oxidation des Häms für die gesteigerte Bindung von ³H-BAY 58-2667 und die damit verbundene Potenzierung der BAY 58-2667-induzierten sGC Aktivität direkt nachzuweisen, wurde die spezifische Bindung von ³H-BAY 58-2667 in einer Rezeptorbindungsstudie in An- und Abwesenheit von ODQ sowie dem unspezifischen Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat bestimmt. Sowohl ODQ als auch Kaliumhexacyanoferrat führten über die Oxidation des Häms zu einer Verdopplung der spezifischen Bindung (Stasch *et al.*, 2002c). Damit kann als gesichert gelten, dass durch die Oxidation des Häms der sGC die Bindung von BAY 58-2667 an das Enzym erhöht wird, und dadurch für dessen gesteigerte Aktivität verantwortlich ist.

4.7 Identifizierung der Hämbindungsstelle

Nach der Entdeckung, dass die NO-vermittelte Aktivierung der sGC abhängig von der Anwesenheit der prosthetischen Hämgruppe ist (Craven *et al.*, 1978; Ignarro *et al.*, 1986), wurden in den folgenden zwei Dekaden zahlreiche Versuche unternommen, den genauen Mechanismus dieser NO-induzierten Aktivierung sowie die Enzym-Häm-Interaktion zu klären. Durch zahlreiche spektroskopische Untersuchungen und Mutagenesestudien konnte das Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit als axialer Ligand des Hämeisens identifiziert werden (Wedel *et al.*, 1994; Stone *et al.*, 1995; Förster *et al.*, 1996; Zhao *et*

al., 1998; Martin *et al.*, 2001). Die Bindung von NO an das zentrale Eisenatom führt zum Lösen der Histidyl-Häm-Bindung, was nach bisherigem Erkenntnisstand zur Aktivierung der sGC führt. Der genaue molekulare Mechanismus der NO-induzierten Enzymaktivierung ist jedoch bis heute das Thema kontroverser Diskussionen (Zhao *et al.*, 1999; Bellamy *et al.*, 2002; Ballou *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 2003). Vor allem Mutagenesestudien der Hämbindungsdomäne erwiesen sich als schwierig, da der Verlust der Hämgruppe gleichzeitig zum Wirkungsverlust aller bekannten sGC-Stimulatoren führte (Wedel *et al.*, 1994, 1995; Friebe *et al.*, 1997). Erst mit der Entdeckung des Häm-unabhängigen sGC-Aktivators BAY 58-2667 (Stasch *et al.*, 2002c) und der exponentiell gewachsenen Datenmenge in den Sequenzdatenbanken konnte die Frage der Bindung der Hämgruppe erneut angegangen werden.

Der Ausgangspunkt der Suche nach möglichen, an der Bindung der Hämgruppe beteiligten Aminosäuren (über das Histidin₁₀₅ hinaus) war eine von Ignarro 1984 aufgestellte Hypothese (Ignarro *et al.*, 1984). In dieser Arbeit wurde durch Rekonstitutionsexperimente die Bedeutung der negativ geladenen Propionatgruppen des Häms für dessen Bindung an die sGC nachgewiesen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden basische Aminosäuren der sGC als Interaktionspartner dieser Häm-Propionate postuliert. Daneben konnte in den letzten Jahren der für die Bindung der Hämgruppe verantwortliche Bereich auf die N-terminalen 200 Aminosäuren der β -Untereinheit eingegrenzt werden (Schelvis *et al.*, 1998; Marletta *et al.*, 2003). Ausgehend von diesen Informationen wurde ein Sequenzalignment verschiedener, zu diesem Bereich homologer Sequenzen durchgeführt, um mögliche invariante positive oder polare Aminosäuren zu identifizieren, welche an der Bindung des Häms beteiligt sein könnten. Dieser Ansatz wurde kürzlich von Arbeiten von Iyer unterstützt, die ein bisher unbekanntes hämbindendes Motiv innerhalb der ersten 200 Aminosäuren der β -Untereinheit der sGC identifizierten, welches sich auch in Prokaryoten finden lässt (Iyer *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse der von Ignarro durchgeführten Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen Häm-Derivaten zeigten deutlich den fundamentalen Einfluss sowohl der Position der Häm-Propionate am Porphyrin-Ringsystem als auch deren negative Ladung für die Bindung an der sGC. Veränderungen an diesen Punkten des Häms führten unmittelbar zum vollständigen Verlust der Hämbindung an das Enzym (Ignarro *et al.*, 1984). Eine Mutation der postulierten an dieser essenziellen Interaktion mit den Häm-Propionaten beteiligten Aminosäuren, sollte aus diesem Grund mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Verlust der Hämgruppe führen, analog zu den Ergebnissen des Austausches des Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit der sGC (Wedel *et al.*, 1994; Stone *et al.*, 1995; Förster *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2001). Die Präsenz oder der Verlust der Hämgruppe, der nach dem Sequenzalignment

konstruierten Mutanten, wurde über die Wirkung der Häm-abhängigen und der Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren sowie des sGC-Inhibitors ODQ nachgewiesen. Dazu wurden die verschiedenen sGC-Mutanten in einer cGMP-Reporterzelllinie transient exprimiert und mit den genannten Substanzen inkubiert (Becker *et al.*, 1999; Wunder *et al.*, 2003). Die Veränderungen des intrazellulären cGMP-Spiegels wurden über das Readout-System der Reporterzelle in Biolumineszenz umgesetzt, welche an einer CCD-Kamera gemessen werden konnte. Durch die Verwendung dieser cGMP-Reporterzelllinie und der verschiedenen sGC-Aktivatoren konnte die Präsenz der Hämgruppe der sGC erstmals innerhalb eines intakten Zellsystems nachgewiesen werden. Da vor der Entdeckung von BAY 58-2667 keinerlei Möglichkeit bestand, das hämfreie Enzym zu aktivieren, musste die An- oder Abwesenheit des Häms bisher spektroskopisch nachgewiesen werden (Förster *et al.*, 1996; Namiki *et al.*, 2001). Dieser Nachweis erforderte hochaufgereinigtes Enzym, dessen Expression relativ komplex und zeitaufwendig ist (Hönicka *et al.*, 1999). Darüber hinaus musste davon ausgegangen werden, dass Mutationen der hämbindenden Domäne der sGC zu einer generellen Destabilisierung der Hämbindung führen. Dadurch könnte die anschließende Aufreinigungsprozedur der sGC-Mutanten den Verlust des Häms verursachen, ohne dass die mutierten Aminosäuren an einer direkten Interaktion mit den Häm-Propionaten beteiligt wären (Gupta *et al.*, 1997; Friebe *et al.*, 1997; Hönicka *et al.*, 1999). Diese Problematik konnte durch das hier verwendete zelluläre Detektionssystem umgangen werden. Vor der eigentlichen Testung der Mutanten wurde die Fähigkeit dieses Detektionssystems zur Unterscheidung hämhaltiger und hämfreier sGC durch die Expression der hämhaltigen WT-sGC sowie der hämfreien $\beta\text{H}_{105}\text{F}$ -sGC validiert.

Das WT-Enzym zeigte dabei das für hämhaltige sGC erwartete Aktivierungsprofil: Eine starke konzentrationsabhängige Stimulation der transient transfizierten sGC durch NO und BAY 41-2272 sowie ein überadditiver Effekt beider Substanzen (Stasch *et al.*, 2001). Der Häm-unabhängige sGC Aktivator BAY 58-2667 führte ebenfalls zu einer Aktivierung der sGC, die in Anwesenheit des sGC-Inhibitors ODQ potenziert wurde, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen an der gereinigten sGC (Stasch *et al.*, 2002c). Der Austausch des axialen Hämliganden βHis_{105} führt zur Expression hämfreier sGC (Wedel *et al.*, 1994; Förster *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigte der $\beta\text{H}_{105}\text{F}$ -Mutant das erwartete Aktivierungsprofil hämfreier sGC. Für die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren NO und BAY 41-2272 wurde ein fast vollständiger Wirkungsverlust beobachtet. Eine verbliebene Restaktivierung des Enzyms durch BAY 41-2272 könnte durch eine geringe z.T. Häm-unabhängige Wirkung dieser Substanz erklärt werden, wie sie von Martin postuliert wurde (Martin *et al.*, 2001). Darüber hinaus führte der Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667

zu einer starken Aktivierung des $\beta\text{H}_{105}\text{F}$ -Mutanten, die durch ODQ nicht weiter gesteigert werden konnte. Da ODQ seine Wirkung über die Oxidation des Hämeisens vermittelt (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996, Zhao *et al.*, 2000), ist das Fehlen dieser Potenzierung ein sicheres Indiz für einen Verlust der Hämgruppe, wie es bereits für das gereinigte Enzym gezeigt werden konnte (Stasch *et al.*, 2002c). Die im Vergleich zum WT-Enzym geringeren Aktivierungsfaktoren dieses Mutanten resultieren aus einer um ca. Faktor 4,6 erhöhten Basalaktivität. Dieser Befund geht konform mit publizierten Daten von Martin, die ebenfalls eine 4,2-fach erhöhte Aktivität des βH_{105} -Austausches beobachteten (Martin *et al.*, 2001). Die absoluten Messwerte des BAY 58-2667 aktivierten $\beta\text{H}_{105}\text{F}$ -Enzyms lagen auf dem Niveau des WT-Enzyms. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass das hier verwendete Detektionssystem auf Basis der cGMP-Readoutzelllinie kombiniert mit BAY 41-2272, BAY 58-2667, NO und ODQ eine einfache und gut reproduzierbare Methode zur Unterscheidung hämhaltiger und hämfreier sGC im cytosolischen Milieu des Enzyms darstellt.

Nachdem die Eignung des hier etablierten Detektionssystems zur Identifizierung hämfreier sGC gezeigt werden konnte, wurden die im oben beschriebenen Alignment identifizierten invarianten Aminosäuren, welche der Vorhersage von Ignarro entsprachen, ausgetauscht (Ignarro *et al.*, 1984). Die so konstruierten Mutanten wurden anschließend in der cGMP-Reporterzelllinie auf das Vorhandensein der Hämgruppe hin getestet. Der Austausch des Tyrosin₁₃₅ gegen Alanin oder Phenylalanin sowie des Arginin₁₃₉ gegen Alanin oder Leucin führten zu dem erwarteten Aktivierungsprofil hämfreier sGC: Ein fast vollständiger Wirkungsverlust von NO und dem Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 sowie keine weitere ODQ-induzierte Potenzierung der Wirkung von BAY 58-2667. Daraus lässt sich schließen, dass die OH-Gruppe des Tyrosin₁₃₅ sowie die positive Ladung des Arginin₁₃₉ essenziell an der Bindung des Häms über dessen Propionatgruppen beteiligt zu sein scheinen. Eine vergleichbare Interaktion zwischen den Propionaten des Häms und den Aminosäuren Tyrosin, bzw. Arginin, ist für zahlreiche Hämproteine beschrieben (Paoli *et al.*, 1999; Contzen *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2000; Popovic *et al.*, 2001).

Um die Bedeutung des Tyrosin₁₃₅ und des Arginin₁₃₉ für die Bindung der Hämgruppe der sGC zu verifizieren, wurde WT-, $\beta\text{Y}_{135}\text{F}$ - und $\beta\text{R}_{139}\text{L}$ -sGC in CHO-Zellen exprimiert und das Zellysats anschließend in PPIX-Rekonstitutionsstudien eingesetzt. Da die eisenfreie Vorstufe des Häms den Nitrosyl-Häm-Komplex imitiert, führt die Rekonstitution der sGC mit PPIX zu einer Aktivierung des Enzyms (Ignarro *et al.*, 1982, 1984; Friebe *et al.*, 1998; Stasch *et al.*, 2002a). Dadurch kann die mit steigender PPIX-Konzentration zunehmende Rekonstitution an der PPIX-induzierten Enzymaktivierung

abgelesen werden. Dem Ansatz wurde darüber hinaus Tween-20 und BAY 41-2272 zugesetzt, um einerseits den Austausch des nativen Häms gegen PPIX zu erleichtern (Förster *et al.*, 1996), und andererseits die PPIX-induzierte sGC-Aktivierung zu verstärken (Friebe *et al.*, 1998; Stasch *et al.*, 2002a). In Übereinstimmung mit den Daten des cGMP-Readout-Systems zeigte das WT-Enzym in Gegenwart von BAY 41-2272, BAY 58-2667, NO und ODQ das charakteristische Aktivierungsprofil hämhaltiger sGC und konnte durch Zugabe von PPIX rekonstituiert werden. Im Gegensatz dazu wurden die β Y₁₃₅F- und β R₁₃₉L-Mutanten als hämfreie Enzyme exprimiert und zeigten auch durch Zugabe mikromolarer Konzentrationen an PPIX keinerlei Erhöhung der Aktivität. Dieses Ergebnis unterstreicht die essenzielle Bedeutung der beiden identifizierten Aminosäuren Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉ für die Bindung der Hämgruppe.

Zusammenfassend kann damit gesagt werden, dass in dieser Arbeit die bereits vor zwei Dekaden postulierten Ankeraminosäuren der Häm-Propionate identifiziert werden konnten (Ignarro *et al.*, 1984). Dies wurde möglich durch die Verwendung der neuen cGMP-Reporterzelllinie sowie des kürzlich identifizierten Häm-unabhängigen sGC-Aktivators BAY 58-2667. Zusammen mit der gut charakterisierten Bindung des Häms an das Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit (Wedel *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1998, Martin *et al.*, 2001) ergibt sich das in Abbildung 4.1 dargestellte Modell. Die prosthetische Hämgruppe der sGC ist dabei komplexiert in einer hydrophoben Bindungstasche zwischen dem Histidin₁₀₅, Tyrosin₁₃₅ und dem Arginin₁₃₉. Eine vergleichbare Interaktion zwischen den Häm-Propionaten und positiv geladenen bzw. polaren Aminosäuren, wie Tyrosin oder Arginin, ist in der Literatur für verschiedene Hämproteine beschrieben (Paoli *et al.*, 1999; Contzen *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2000; Popovic *et al.*, 2001).

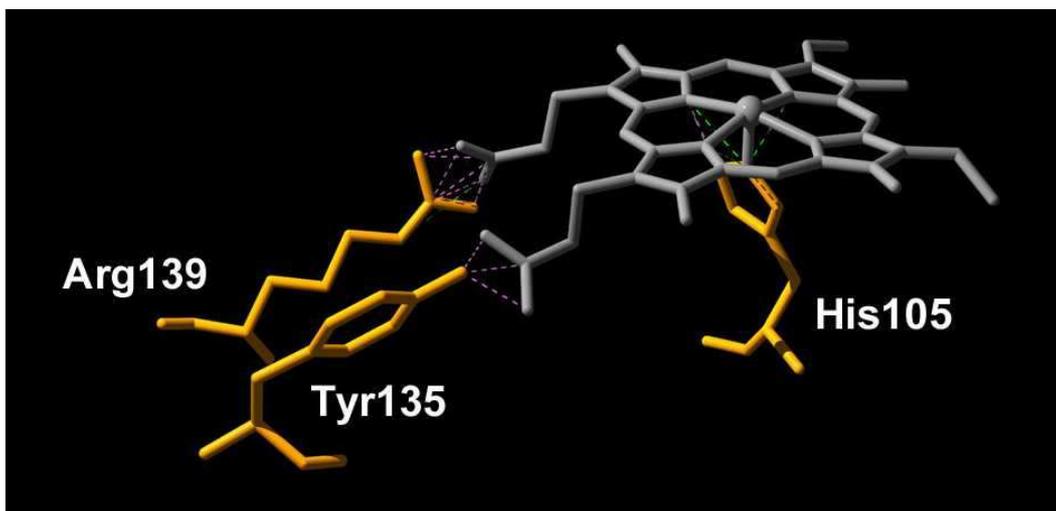


Abbildung 4.1 : Dargestellt ist ein Modell der postulierten Interaktion der prosthetischen Hämgruppe der sGC mit dem axialen Fe-Liganden Histidin₁₀₅ und den beiden in dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉ der β -Untereinheit der sGC.

Die anderen nach dem Sequenzalignment konstruierten Mutanten $\beta S_{56}A$, $\beta R_{116}A$, $\beta K_{129}A$, $\beta S_{137}A$, $\beta Q_{155}A$, $\beta Q_{156}A$ und $\beta H_{158}A$ zeigten ein dem WT-Enzym vergleichbares Aktivierungsprofil und wurden aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

Interessanterweise war das Ausmaß der sGC-Aktivierung durch BAY 58-2667 abhängig von den Mutationen der Ankeramino­säuren β Tyrosin₁₃₅ und β Arginin₁₃₉. Der Austausch des β Tyrosin₁₃₅ gegen Alanin oder Phenylalanin führte zu einer ca. 30-fachen, das Ersetzen des β Arginin₁₃₉ gegen Leucin oder Alanin zu einer 100- bzw. 500-fachen Erhöhung des EC₅₀-Wertes für BAY 58-2667. Überraschenderweise besteht mit den negativ geladenen Propionaten des Häms und den negativen Carboxylgruppen von BAY 58-2667 eine strukturelle Gemeinsamkeit beider Liganden. Die Lage und Lokalisation der Carboxylgruppen des Häms sind essenziell für die Bindung dieser prosthetischen Gruppe an die sGC (Ignarro *et al.*, 1984). Darüber hinaus konnte durch Struktur-Wirkungs-Beziehungen die Bedeutung einerseits des Vorhandenseins beider Carboxylgruppen sowie andererseits deren Anordnung im chemischen Grundkörper von BAY 58-2667 klar belegt werden (Alonso-Alija *et al.*, 2001). Diese überraschende Übereinstimmung, sowie der gleichzeitige Verlust sowohl der Hämbindung als auch der Wirkung von BAY 58-2667, ließ eine Konkurrenz beider Liganden um das Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉ wahrscheinlich erscheinen. Unter der Annahme einer räumlichen Übereinstimmung der jeweiligen beiden negativen Ladungen wurde das in der folgenden Abbildung dargestellte putative räumliche Modell für BAY 58-2667 berechnet.

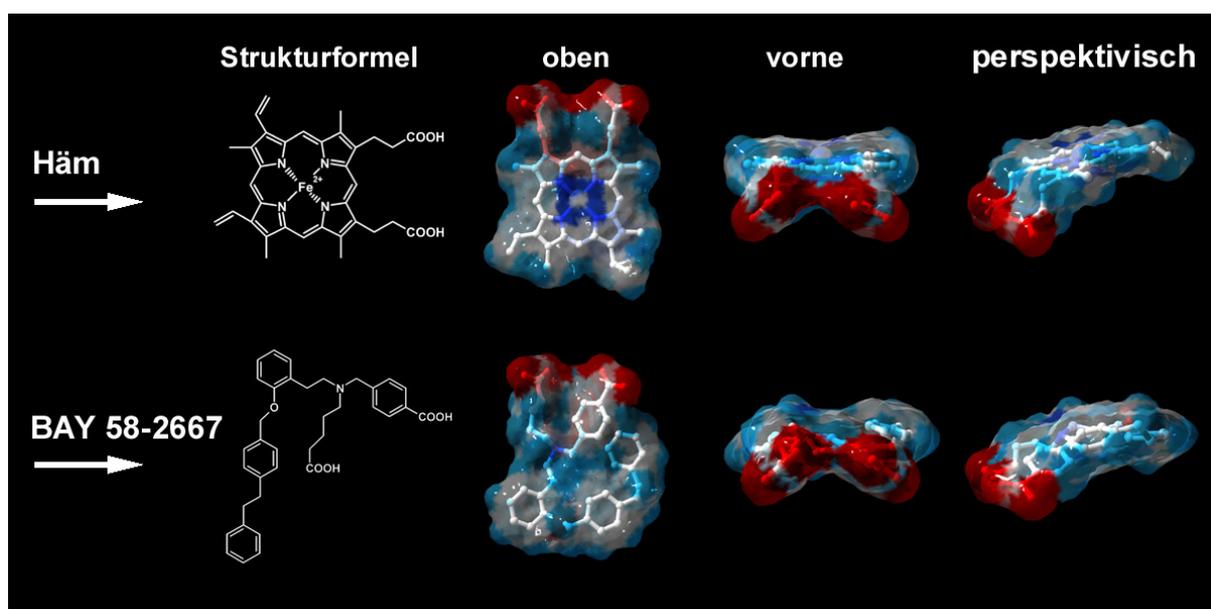


Abbildung 4.2: Dargestellt sind die Strukturformeln der Hämgruppe und BAY 58-2667 sowie ein mögliches räumliches Alignment beider sGC-Liganden. Die räumliche Struktur von BAY 58-2667 wurde auf der Basis einer Konkurrenz beider Liganden um die Aminosäuren β Tyr₁₃₅ und β Arg₁₃₉ berechnet.

Das in Abbildung 4.2 dargestellte Modell zeigt, dass BAY 58-2667 die prosthetische Hämgruppe der sGC ersetzen könnte und dadurch zur Aktivierung des Enzyms führt. Allerdings wurde in den zu Anfang beschriebenen spektroskopischen Untersuchungen eine solche Verdrängung nicht beobachtet. Der Grund dafür war das nach der Verdrängung weiterhin im Testansatz verbliebene Häm, das mit den spektroskopischen Messungen interferierte. Konsequenterweise wurde die sGC zur Detektion einer möglichen Verdrängung des Häms mittels Anionenaustauschern von freiem Häm separiert und die Präsenz des am Enzym gebundenen Häms anschließend spektroskopisch nachgewiesen. Um die vermutete Konkurrenz zwischen der Hämgruppe und BAY 58-2667 um dieselbe Bindungsstelle zu zeigen, wurde die sGC mit verschiedenen Konzentrationen BAY 58-2667 in An- und Abwesenheit von ODQ inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass BAY 58-2667 in Konzentrationen bis 10 μM keinen Einfluss auf die Bindung der reduzierten nativen Hämgruppe hatte, während das oxidierte Häm durch BAY 58-2667 vollständig vom Enzym verdrängt wurde. Durch Inkubation mit einer 10-fach höheren Konzentration BAY 58-2667 konnte schließlich auch die reduzierte Hämgruppe vom Enzym verdrängt werden. Diese Befunde belegten die Konkurrenz beider sGC-Liganden um die Häm-Bindungstasche. ODQ scheint somit die Bindungsstärke des nativen reduzierten Häms an die sGC durch Oxidation drastisch zu reduzieren (Hobbs, 2000), und damit den Austausch der Hämgruppe durch BAY 58-2667 stark zu erleichtern. Diese erleichterte Verdrängung des oxidierten Häms führte zu der mit steigender Konzentration an BAY 58-2667 beobachteten sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Aktivitätsassay. Im Gegensatz dazu konnte für das reduzierte Enzym ein biphasischer Verlauf gezeigt werden, dessen zweiter Schritt bei hohen mikromolaren Konzentrationen an BAY 58-2667 auf die Verdrängung des fest gebundenen reduzierten Häms vom Enzym hindeutet. Der erste Aktivierungsschritt der biphasischen Aktivierungskurve bei nanomolaren Konzentrationen könnte durch die Besetzung einer hochaffinen Häm-unabhängigen Bindungsstelle erklärt werden. Daneben wäre auch eine partielle Aktivierung einer hämfreien Subpopulation der sGC-Präparation möglich. Die Lokalisierung der BAY 58-2667-Bindungsstelle in der Häm-Bindungstasche, sowie der Aktivierungsmechanismus der sGC über die Verdrängung des Häms und eine Interaktion von BAY 58-2667 mit den Ankeramino-säuren Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉, kann jedoch als gesichert betrachtet werden.

4.8 Neues Modell der sGC-Aktivierung

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in einem neuen Modell der sGC-Aktivierung zusammenfassen. Als gesichert kann die Verankerung der prosthetischen Hämgruppe der sGC an die drei Aminosäuren Histidin₁₀₅, Tyrosin₁₃₅ sowie Arginin₁₃₉ der β -Untereinheit gelten. Der Austausch des β Tyr₁₃₅ sowie des β Arg₁₃₉ führt nicht nur zur Expression hämfreier sGC, sondern verhindert auch eine Rekonstitution der Apo-Enzymmutanten mit PPIX (siehe 3.7.3). Die Interaktion zwischen den für die Bindung des Häms essenziellen Häm-Carboxylgruppen (Ignarro *et al.*, 1984) und den beiden in dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉ ist somit für die Bindung des Häms von zentraler Bedeutung (Abb. 4.1, 4.3A).

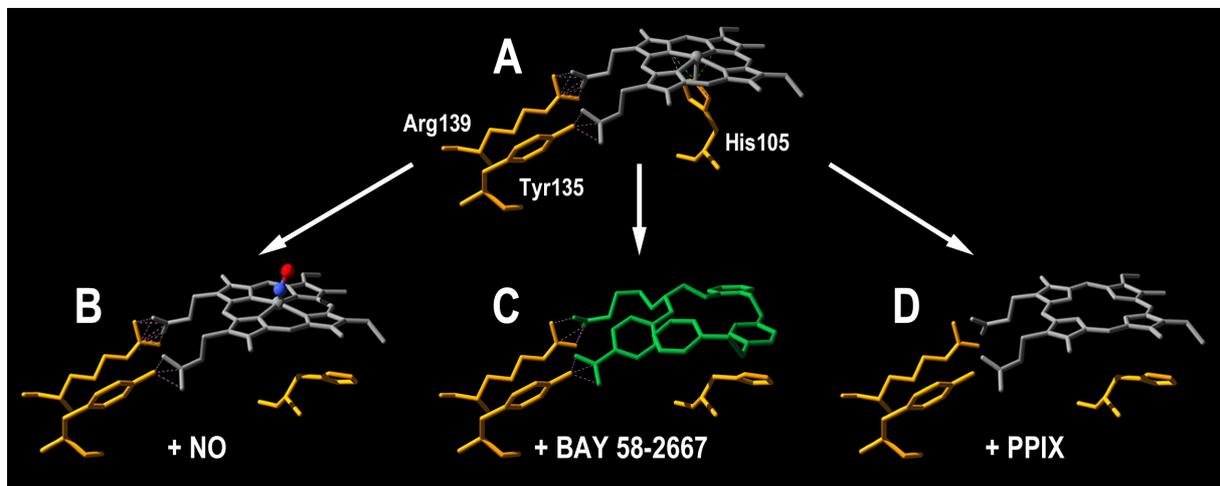


Abbildung 4.3 : Dargestellt ist das Modell der Bindung der verschiedenen sGC-Aktivatoren NO (A), BAY 58-2667 (B) und PPIX (C) an die sGC. Gemeinsam ist allen drei Aktivatoren eine Lösung der Histidyl-Häm-Bindung.

In diesem Modell greift BAY 58-2667, ebenso wie PPIX, am Häm der sGC an, und führt letztendlich zu dessen Verdrängung (Abb. 4.3C-D). Diese Konkurrenz ist aufgrund der Ähnlichkeit der möglichen räumlichen Struktur von BAY 58-2667 und der Hämgruppe plausibel (Abb. 4.2) und konnte durch die gezeigten spektroskopischen Befunde bestätigt werden (siehe 3.1.2). Durch die Oxidation der Hämgruppe durch ODQ wird die Affinität des Häms zur sGC drastisch reduziert (Hobbs, 2000), wodurch die sonst erst bei hohen Konzentrationen an BAY 58-2667 einsetzende Verdrängung des Häms vom Enzym ermöglicht wird. Durch diese erleichterte Verdrängung der Hämgruppe lässt sich sowohl die beobachtete Steigerung der Bindung von BAY 58-2667 an die sGC als auch andererseits die daraus resultierende Potenzierung der Enzymaktivität durch Zugabe von ODQ gut erklären (siehe 3.2.1; 3.7.4).

Der axiale Ligand des Hämeisens, das Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit, scheint nicht an einer Interaktion mit BAY 58-2667 beteiligt zu sein, da dessen Austausch keine Auswirkung auf die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung hat (siehe 3.7.2). Die Verdrängung der Hämgruppe durch BAY 58-2667 (siehe 3.1.2) würde deshalb, wie beim PPIX, zum Lösen der Histidyl-Häm-Bindung führen und dadurch die sGC durch imitieren des Nitrosyl-Häm-Komplexes aktivieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese führt BAY 58-2667, ebenso wie NO, zu einer Steigerung der maximalen katalytischen Rate (siehe 3.2.2). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die beiden Aminosäuren Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉ nicht nur der reinen Bindung des Häms, bzw. von BAY 58-2667, dienen, sondern aktiv in die intramolekulare Signalweiterleitung, die zur Aktivierung der sGC führt, involviert sind. Änderungen im Häm-Status und der Porphyringeometrie könnten nach diesem Modell über das Histidin₁₀₅, Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉ an die katalytische Domäne weitergegeben werden. Für einen solchen Mechanismus, wie er bereits für andere Hämproteine gezeigt werden konnte, spricht der Wirkverlust von BAY 58-2667 an den jeweiligen Austauschmutanten der beiden Aminosäuren (Gong *et al.*, 2000). Dieses Modell kann die relativ schwache Wirkung von PPIX im Vergleich zu NO durch Unterschiede in der jeweiligen Geometrie des Porphyrins erklären. Dies ist durch das bestehende Modell, basierend auf dem Lösen der Histidyl-Häm-Bindung als molekularem Schalter, nicht möglich (Abb. 4.4).

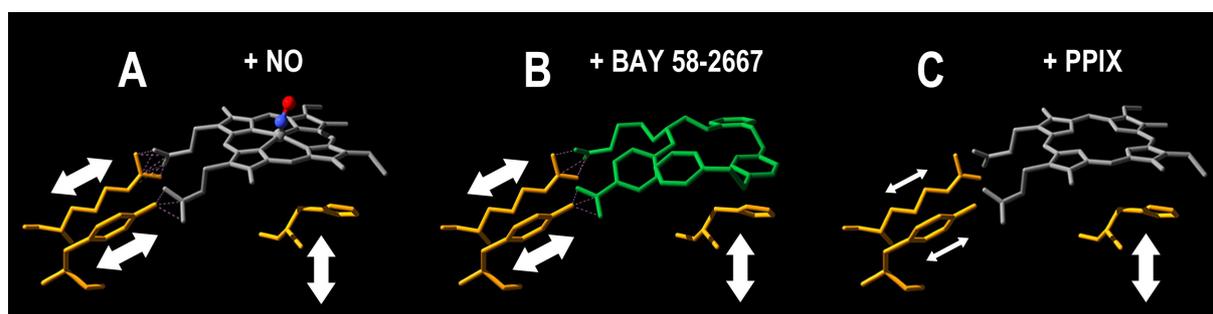


Abbildung 4.4 : Gezeigt ist das Modell der intramolekularen Signalweiterleitung über den Zustand des Häms der sGC. Alle drei Klassen von sGC-Aktivatoren führen durch das Lösen der Histidyl-Häm-Bindung zu einer Aktivierung des Enzyms (A-C). Darüber hinaus können NO (A), BAY 58-2667 (B) als auch PPIX (C) über das Tyrosin₁₃₅ und Arginin₁₃₉ mit der sGC wechselwirken (symbolisiert durch die weißen Pfeile), und dadurch zu einer weiteren Aktivierung des Enzyms beitragen. Dieser Signalweg wäre beim PPIX (C), aufgrund seiner Porphyringeometrie, nur in geringerem Maße möglich, was die schwache Aktivierung der sGC durch PPIX erklären kann.

Damit konnte in dieser Arbeit die Interaktion zwischen BAY 58-2667 und der sGC nahezu vollständig aufgeklärt werden, und zwar von der Bestimmung der enzymatischen Charakteristika, über die Konkurrenz mit der Hämgruppe bis hin zur Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Darüber hinaus könnte das hier postulierte allgemeine Modell sGC-Aktivierung möglicherweise einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der sGC-Aktivierung leisten.

5. Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind in den westlichen Industrienationen nach wie vor die häufigste Todesursache. Aus diesem Grund ist man bemüht, Wirkmechanismen zu identifizieren, die die Möglichkeit neuer Behandlungen eröffnen, oder unerwünschte Nebenwirkungen bekannter Medikationen beseitigen. Mit dem neuen Wirkprinzip der NO-unabhängigen Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase könnten sich diese Hoffnungen erfüllen. Nach fast 130 Jahren der Anwendung des Nitroglycerins ist mit BAY 58-2667 erstmals eine Substanz in der klinischen Entwicklung, die ein ähnliches hämodynamisches Profil besitzt wie die organischen Nitrate. Dadurch hat man die Chance, die von unerwünschten Effekten, wie z.B. der Toleranzentwicklung und dem Nitratkopfschmerz, begleitete Nitrattherapie zu substituieren.

In dieser Arbeit wurde die NO-unabhängige Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 sowie den erst kürzlich entdeckten Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 molekularbiologisch und biochemisch untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Klärung des bisher unbekanntem Aktivierungsmechanismus durch BAY 58-2667.

Es konnte gezeigt werden, dass die NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren BAY 41-8543 und BAY 58-2667 sich grundlegend im Mechanismus der Enzymaktivierung von NO unterscheiden, da sie, im Gegensatz zu NO, nicht mit dem zentralen Eisen der prosthetischen Hämgruppe der sGC interagierten. Die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren, wie BAY 41-2272 oder BAY 41-8543, zeigten eine konzentrationsabhängige Aktivierung der sGC, die durch ODQ gehemmt und in Gegenwart von NO stark potenziert wurde. Die Entfernung des Häms führte zum fast vollständigem Verlust der Wirkung von BAY 41-2272 bzw. BAY 41-8543. Demgegenüber zeigte der Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 nur einen additiven Effekt mit NO, dafür aber einen Synergismus mit dem sGC-Inhibitor ODQ auf die Aktivierung der sGC. Die Entfernung der Hämgruppe der sGC führte zu einer Verstärkung der Wirkung von BAY 58-2667. Diese charakteristischen Aktivierungsprofile beider Substanzklassen spiegelten sich in den enzymkinetischen Untersuchungen der sGC in Form einer Steigerung der maximalen katalytischen Aktivität wieder. Im Gegensatz dazu veränderte sich die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat GTP nach Inkubation mit BAY 41-8543 oder BAY 58-2667 kaum. Der beobachtete starke Synergismus der Häm-abhängigen Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 mit NO ist über die beobachtete Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes durch diese Substanzen erklärbar. Im

Gegensatz dazu bewirkte BAY 58-2667 keine Veränderung der Halbwertszeit dieses Komplexes, was den rein additiven Effekt dieser Substanz mit NO im sGC-Aktivitätsassay erklärt.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Rezeptorbindungsstudie für die sGC etabliert werden. Durch diese Rezeptorbindungsuntersuchungen konnte eine hochaffine Bindungsstelle von BAY 58-2667 an der sGC identifiziert werden. Des Weiteren ließ sich die maximale Bindung von BAY 58-2667 durch Oxidation des Häms verdoppeln; ein Indiz für eine mögliche zweite Bindungsstelle für BAY 58-2667. Der Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 war nicht in der Lage, BAY 58-2667 vom Enzym zu verdrängen, was die Präsenz unterschiedlicher und voneinander unabhängiger Bindungsstellen für beide Klassen NO-unabhängiger sGC-Aktivatoren belegt.

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte die Expression eines löslichen 200 Aminosäuren langen N-terminalen Fragments der β -Untereinheit der sGC in *E. Coli* gezeigt werden. Das exprimierte Proteinfragment konnte im Westernblot detektiert werden, und kann für zukünftige Untersuchungen zur Bindung und Wechselwirkung von BAY 58-2667 mit dieser hämbindenden Domäne der sGC verwendet werden.

Mit Hilfe eines Tritiumhaltigen Photoaffinitätslabels für NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren vom BAY 58-2667 Typ konnte eine spezifische Markierung beider Untereinheiten der gereinigten sGC gezeigt werden. Durch BrCN-Spaltung, 2D-PAGE sowie Sequenzierung der Peptidfragmente beider Untereinheiten konnte das Tyrosin₃₇₁ der α -Untereinheit sowie der Bereich der Aminosäuren 231-310 der β -Untereinheit als Position, an welcher das Photoaffinitätslabel kovalent gebunden war, identifiziert werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von ODQ auf die Bindung von BAY 58-2667 an die sGC wurde eine einfache und verlässliche chromatographische Methode zur Entfernung der prosthetischen Hämgruppe entwickelt. In vergleichenden Untersuchungen hämhaltiger und hämfreier sGC konnte gezeigt werden, dass die Oxidation des Häms durch ODQ (oder andere unspezifische Oxidationsmittel) zur erhöhten Bindung von BAY 58-2667 an die sGC führt, und dies kausal für die Potenzierung der BAY 58-2667-induzierten Enzymaktivierung durch ODQ verantwortlich ist.

Durch Sequenzalignments und Mutageneseuntersuchungen konnten mit dem Tyrosin¹³⁵ und Arginin¹³⁹ der β -Untereinheit der sGC die bereits Anfang der 80er Jahre postulierten Ankeraminosäuren der Häm-Propionate an der sGC identifiziert werden. Die prosthetische Hämgruppe des Enzyms ist demnach durch das Histidin¹⁰⁵, Tyrosin¹³⁵ und Arginin¹³⁹ der β -Untereinheit am Enzym gebunden.

Es konnte eine Konkurrenz von BAY 58-2667 mit der Hämgruppe um die beiden identifizierten Ankeraminosäuren Tyrosin¹³⁵ und Arginin¹³⁹ gezeigt werden. Der Austausch dieser Aminosäuren führte nicht nur zu einem Verlust der Hämbindung, sondern ebenfalls zu einem Verlust der BAY 58-2667-induzierten sGC-Aktivierung. Mit der spektroskopisch nachgewiesenen Verdrängung des Häms durch BAY 58-2667 und der starken Homologie der räumlichen Strukturen der Hämgruppe und BAY 58-2667 konnte ein Modell der Enzymaktivierung entwickelt werden. In diesem Modell führt BAY 58-2667 durch Imitation des Nitrosyl-Häm-Komplexes zur Lösung der Histidyl-Häm-Bindung und damit zur Aktivierung der sGC. Die potenzierende Wirkung von ODQ ist in diesem Modell durch die extrem reduzierte Affinität der sGC zur oxidierten Hämgruppe erklärbar, wodurch deren Verdrängung durch BAY 58-2667 deutlich erleichtert wird. Darüber hinaus eröffnet das hier postulierte neue Modell der sGC-Aktivierung, basierend auf der intramolekularen Signalweiterleitung über das Histidin¹⁰⁵, Tyrosin¹³⁵ und das Arginin¹³⁹, eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Charakteristika der Enzymaktivierung durch NO, PPIX und BAY 58-2667.

Die hier erhobenen Befunde sind ein entscheidender Beitrag zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen BAY 58-2667 und der löslichen Guanylatcyclase. Die weitreichende Aufklärung der Interaktion zwischen Substanz und Enzym eröffnet die Möglichkeit einer gezielten Synthese weiterer NO- und Häm-unabhängiger sGC-Aktivatoren. Diese Verbindungen könnten die klassischen NO-Donoren vom Typ der organischen Nitrate ersetzen und so eine Basis für neue, nebenwirkungsärmere Ansätze bei der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen liefern.

6. Literatur

- Akaike T**, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, Miyazaki K, Ueda S, Maeda H. *Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor / NO through a radical reaction*. *Biochemistry*. (1993) **32**: 827-832.
- Alonso-Alija C**, Heil M, Flubacher D, Stasch JP, Wunder F, Dembowsky K, Perzborn E, Stahl E. *Novel derivatives of dicarboxylic acid having pharmaceutical properties*. (2001) WO-119780-A 2001.03.22.
- Arnold WP**, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations*. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1977) **74**: 3203-3207.
- Ashman DF**, Lipton R, Melicow MM, Price TD. *Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosin 3',5'-monophosphate from rat urine*. *Biochem Biophys Res Commun*. (1963) **11**: 330-334.
- Bainbridge SA**, Farley AE, McLaughlin BE, Graham CH, Marks GS, Nakatsu K, Brien JF, Smith GN. *Carbon monoxide decreases perfusion pressure in isolated human placenta*. *Placenta*. (2002) **23**: 563-569.
- Ballou DP**, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA. *Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect*. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2002) **99**: 12097-12101.
- Becker EM**, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiß U, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Schröder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. *NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272*. *BMC Pharmacol*. (2001) **1**: 13.
- Becker EM**, Wunder F, Kast R, Robyr C, Hoenicka M, Gerzer R, Schroder H, Stasch JP. *Generation and characterization of a stable soluble guanylate cyclase-overexpressing CHO cell line*. *Nitric Oxide*. (1999) **3**: 55-66.
- Bellamy TC**, Wood J, Garthwaite J. *On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide*. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2002) **99**: 507-510.
- Biel M**, Sautter A, Ludwig A, Hofmann F, Zong X. *Cyclic nucleotide-gated channels - mediators of NO:cGMP-regulated processes*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. (1998) **358**: 140-144.
- Bradford MM**. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*. (1976) **72**: 248-54.
- Broillet MC**, Firestein S. *Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation*. *Ann N Y Acad Sci*. (1999) **868**: 730-740.
- Cary SP**, Marletta MA. *The case of CO signaling: why the jury is still out*. *J Clin Invest*. (2001) **107**: 1071-1073.
- Clark JE**, Naughton P, Shurey S, Green CJ, Johnson TR, Mann BE, Foresti R, Motterlini R. *Cardioprotective Actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule*. *Circ Res*. (2003) **93**: e2-8.
- Contzen J**, Jung C. *Changes in secondary structure and salt links of cytochrome P-450_{cam} induced by photoreduction: a Fourier transform infrared spectroscopic study*. *Biochemistry*. (1999) **38**: 16253-16260.
- Craven PA**, DeRubertis FR. *Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation*. *J Biol Chem*. (1978) **253**: 8433-8443.
- Demoliou-Mason CD**, Barnard EA. *Solubilization in high yield of opioid receptors retaining high-affinity delta, μ and kappa binding sites*. *FEBS Lett*. (1984) **170**: 378-382.
- Denninger JW**, Marletta MA. *Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway*. *Biochim Biophys Acta*. (1999) **1411**: 334-350.

- Denninger JW**, Schelvis JP, Brandish PE, Zhao Y, Babcock GT, Marletta MA. *Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies*. *Biochemistry*. (2000) **39**: 4191-4198.
- Dupriez VJ**, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, Detheux M. *Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors*. *Receptors Channels*. (2002) **8**: 319-330.
- Elfering SL**, Sarkela TM, Giulivi C. *Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase*. *J Biol Chem*. (2002) **277**: 38079-38086.
- Feelisch M**, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HH. *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*. (1999) **56**: 243-253.
- Förster J**, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Kösling D. *A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of α_1 and β_1 subunits*. *Eur J Biochem*. (1996) **240**: 380-386.
- Friebe A**, Kösling D. *Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase*. *Mol Pharmacol*. (1998) **53**: 123-127.
- Friebe A**, Kösling D. *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. *Circ Res*. (2003) **93**: 96-105.
- Friebe A**, Schultz G, Kösling D. *Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme*. *EMBO J*. (1996) **15**: 6863-6868.
- Friebe A**, Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Schultz G, Kösling D. *Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase*. *Biochemistry*. (1997) **36**: 1194-1198.
- Furchgott RF**, Zawadzki JV. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*. (1980) **288**: 373-376.
- Garthwaite J**, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. *Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*. *Mol Pharmacol*. (1995) **48**: 184-188.
- Ghafourifar P**, Richter C. *Nitric oxide synthase activity in mitochondria*. *FEBS Lett*. (1997) **418**: 291-296.
- Ghofrani HA**, Schermuly RT, Rose F, Wiedemann R, Kohstall MG, Kreckel A, Olschewski H, Weissmann N, Enke B, Ghofrani S, Seeger W, Grimminger F. *Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension*. *Am J Respir Crit Care Med*. (2003) **167**: 1139-1141.
- Goldberg ND**, Dietz SB, O'Toole AG. *Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine*. *J Biol Chem*. (1969) **244**: 4458-4466.
- Gong W**, Hao B, Chan MK. *New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL*. *Biochemistry*. (2000) **39**: 3955-3962.
- Green LC**, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR. *Nitrate biosynthesis in man*. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1981) **78**: 7764-7768.
- Gruetter CA**, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. *Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite*. *Can J Physiol Pharmacol*. (1981) **59**: 150-156.
- Gupta G**, Kim J, Yang L, Sturley SL, Danziger RS. *Expression and purification of soluble, active heterodimeric guanylyl cyclase from baculovirus*. *Protein Expr Purif*. (1997) **10**: 325-330.
- Hardman JG**, Sutherland EW. *Guanylyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosin 3',5'-monophosphate from guanosin triphosphate*. *J Biol Chem*. (1969) **244**: 6363-6370.
- Harteneck C**, Kösling D, Soling A, Schultz G, Bohme E. *Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits*. *FEBS Lett*. (1990) **272**: 221-223.

- Hastings JW**, Mitchell G, Mattingly PH, Blinks JR, Van Leeuwen M. *Response of aequorin bioluminescence to rapid changes in calcium concentration.* Nature. (1969) **222**: 1047-1050.
- Hevel JM**, White KA, Marletta MA. *Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein.* J Biol Chem. (1991) **266**: 22789-22791.
- Hobbs AJ**. *Soluble Guanylate Cyclase.* Emerg Therap Targets. (2000) **4**: 735-749.
- Hobbs AJ**. *Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited.* Br J Pharmacol. (2002) **136**: 637-640.
- Hoenicka M**, Becker EM, Apeler H, Sirichoke T, Schroder H, Gerzer R, Stasch JP. *Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide.* J Mol Med. (1999) **77**: 14-23.
- Hoffmüller U**, Russwurm M, Kleinjung F, Ashurst J, Oschkinat H, Volkmer-Engmert R, Kösling D, Schneider-Mergener J. *Interaction of a PDZ protein domain with a synthetic library of all human protein C termini.* Angew Chem Int Ed Engl (1999) **38**, 2000–2004.
- Hofmann F**, Ammendola A, Schlossmann J. *Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases.* J Cell Sci. (2000) **113**: 1671-1676.
- Humbert P**, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Kösling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Böhme E. *Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method.* Eur J Biochem. (1990) **190**: 273-278.
- Ignarro LJ**, Adams JB, Horwitz PM, Wood KS. *Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms.* J Biol Chem. (1986) **261**: 4997-5002.
- Ignarro LJ**, Ballot B, Wood KS. *Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins.* J Biol Chem. (1984) **259**: 6201-6207.
- Ignarro LJ**, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.* Proc Natl Acad Sci USA. (1987) **84**: 9265-9269.
- Ignarro LJ**, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. *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. (1982) **718**: 49-59.
- Ignarro LJ**, Wood KS, Wolin MS. *Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX.* Proc Natl Acad Sci USA. (1982) **79**: 2870-2873.
- Katsuki S**, Arnold W, Mittal C, Murad F. *Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine.* J Cyclic Nucleotide Res. (1977) **3**: 23-35.
- Kaupp UB**, Seifert R. *Cyclic nucleotide-gated ion channels.* Physiol Rev. (2002) **82**: 769-824.
- Kharitonov VG**, Russwurm M, Magde D, Sharma VS, Kösling D. *Dissociation of nitric oxide from soluble guanylate cyclase.* Biochem Biophys Res Commun. (1997) **239**: 284-286.
- Ko FN**, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. *YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase.* Blood. (1994) **84**: 4226-4233.
- Koglin M**, Behrends S. *A functional domain of the α_1 subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding.* J Biol Chem. (2003) **278**: 12590-12597.
- Laemmli UK**. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. (1970) **227**: 680-685.

- Lawson DM**, Stevenson CE, Andrew CR, George SJ, Eady RR. *A two-faced molecule offers NO explanation: the proximal binding of nitric oxide to haem*. *Biochem Soc Trans.* (2003) **31**: 553-557.
- Lohmann SM**, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. *Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases*. *Trends Biochem Sci.* (1997) **22**: 307-312.
- Lucas KA**, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. *Pharmacol Rev.* (2000) **52**: 375-414.
- Luchsinger BP**, Rich EN, Gow AJ, Williams EM, Stamler JS, Singel DJ. *Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the beta subunits*. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2003) **100**: 461-466.
- Marletta MA**, Karow D, Pellicena P, Kuriyan J, Pan D, Mathies R. *Characterization of heme protein sensors provides a basis for functional differences such as ligand recognition*. *BMC Meeting Abstracts: 1st International Conference on cGMP. NO/sGC Interaction and its Therapeutic Implications* (2003) **1**: op020.
- Marletta MA**. *Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents*. *Chem Res Toxicol.* (1988) **1**: 249-257.
- Mayer B**, Andrew P. *Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* (1998) **358**: 127-133.
- Mayer B**, Kösling D. *cGMP signalling beyond nitric oxide*. *Trends Pharmacol Sci.* (2001) **22**: 546-548.
- Mehats C**, Andersen CB, Filopanti M, Jin SLC, Conti M. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling*. *Trends Endocrinol Metab.* (2002) **13**: 29-35.
- Mergia E**, Russwurm M, Zoidl G, Kösling D. *Major occurrence of the new $\alpha_2\beta_1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain*. *Cell Signal.* (2003) **15**: 189-195.
- Merril CR**, Goldman D, Van Keuren ML. *Gel protein stains: silver stain*. *Methods Enzymol.* (1984) **104**: 441-447.
- Morita T**, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. *Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP*. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1995) **92**: 1475-1479.
- Morley D**, Keefer LK. *Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators*. *J Cardiovasc Pharmacol.* (1993a) **22**: 3-9.
- Morley D**, Maragos CM, Zhang XY, Boignon M, Wink DA, Keefer LK. *Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators*. *J Cardiovasc Pharmacol.* (1993b) **21**: 670-676.
- Namiki S**, Hirose K, Iino M. *Mapping of heme-binding domains in soluble guanylyl cyclase β_1 subunit*. *Biochem Biophys Res Commun.* (2001) **288**: 798-804.
- Nisoli E**, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. *Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide*. *Science.* (2003) **299**: 896-899.
- Olesen SP**, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Busse R, Mülsch A. *Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase*. *Br J Pharmacol.* (1998) **123**: 299-309.
- Palmer RM**, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. *Nature.* (1987) **327**: 524-526.
- Paoli M**, Anderson BF, Baker HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN. *Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains*. *Nat Struct Biol.* (1999) **6**: 926-931.
- Pinney K**, Katzenellenbogen JA. *Synthesis of Tetrafluoro-Substituted Aryl Azide and Its Protio Analogue as Photoaffinity Labeling Reagents for the Estrogen Receptor*. *J Org Chem.* (1991) **56**: 3125-3133.

- Pitari GM**, Zingman LV, Hodgson DM, Alekseev AE, Kazerounian S, Bienengraeber M, Hajnoczky G, Terzic A, Waldman SA. *Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer*. Proc Natl Acad Sci USA. (2003) **100**: 2695-2699.
- Popovic DM**, Zanic SD, Rabenstein B, Knapp EW. *Artificial cytochrome b: computer modeling and evaluation of redox potentials*. J Am Chem Soc. (2001) **123**: 6040-6053.
- Rall TW**, Sutherland EW. *Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles*. J Biol Chem. (1958) **232**: 1065-1076.
- Russwurm M**, Behrends S, Harteneck C, Kösling D. *Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase*. Biochem J. (1998) **335**: 125-130.
- Russwurm M**, Mergia E, Müllershausen F, Kösling D. *Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for the sensitizing effect of YC-1*. J Biol Chem. (2002) **277**: 24883-24888.
- Russwurm M**, Wittau N, Kösling D. *Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha_2\beta_1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes*. J Biol Chem. (2001) **276**: 44647-4452.
- Ryter SW**, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. *Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance*. Mol Cell Biochem. (2002) **234-235**: 249-263.
- Schlossmann J**, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. *Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β* . Nature. (2000) **404**: 197-201.
- Schrammel A**, Behrends S, Schmidt K, Kösling D, Mayer B. *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. (1996) **50**: 1-5.
- Schultz G**, Böhme E, Munske K. *Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity*. Life Sci. (1969) **8**: 1323-1332.
- Schultz K**, Schultz K, Schultz G. *Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens*. Nature. (1977) **265**: 750-751.
- Scott CW**, Gomes BC, Hubbs SJ, Koenigbauer HC. *A filtration-based assay to quantitate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor binding*. Anal Biochem. (1995) **228**: 150-154.
- Serfass L**, Burstyn JN. *Effect of heme oxygenase inhibitors on soluble guanylyl cyclase activity*. Arch Biochem Biophys. (1998) **359**: 8-16.
- Shimomura O**, Johnson FH. *Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in aequorin bioluminescence*. Nature. (1970) **227**: 1356-1357.
- Shu, A.Y.L.**, Heys, J.R. *Extension of organoiridium catalyzed hydrogen isotope exchange: photoaffinity labels and paclitaxel*. (2000) In Proceedings of the 7th International Symposium (Pleiss U., Voges R., Eds.) **7**, pp 68-70, John Wiley & Sons, Dresden, Germany.
- Smolenski A**, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, Walter U. *Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. (1998) **358**: 134-139.
- Stasch JP**, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Minuth T, Perzborn E, Schramm M, Straub A. *Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies*. Br J Pharmacol. (2002a) **135**: 333-343.
- Stasch JP**, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. *NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase*. Nature. (2001) **410**: 212-215.

- Stasch JP**, Dembowsky K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M. *Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies*. Br J Pharmacol. (2002b) **135**: 344-355.
- Stasch JP**, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schroder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. *NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle*. Br J Pharmacol. (2002c) **136**: 773-783.
- Stone JR**, Marletta MA. *Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase*. Biochemistry. (1995) **34**: 14668-14674.
- Stone JR**, Marletta MA. *Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states*. Biochemistry. (1994) **33**: 5636-5640.
- Stone JR**, Marletta MA. *Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide*. Biochemistry. (1996) **35**: 1093-1099.
- Stone JR**, Marletta MA. *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. (1998) **5**: 255-261.
- Stone JR**, Marletta MA. *The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane*. Biochemistry. (1995) **34**: 16397-16403.
- Stone JR**, Sands RH, Dunham WR, Marletta MA. *Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase*. Biochem Biophys Res Commun. (1995) **207**: 572-577.
- Stone JR**, Sands RH, Dunham WR, Marletta MA. *Spectral and ligand-binding properties of an unusual hemoprotein, the ferric form of soluble guanylate cyclase*. Biochemistry. (1996) **35**: 3258-3262.
- Straub A**, Benet-Buchholz J, Fröde R, Kern A, Kohlsdorfer C, Schmitt P, Schwarz T, Siefert HM, Stasch JP. *Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase*. Bioorg Med Chem. (2002) **10**: 1711-1717.
- Straub A**, Stasch JP, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Ducke B, Feuer A, Furstner C. *NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase*. Bioorg Med Chem Lett. (2001) **11**: 781-784.
- Sunahara RK**, Beuve A, Tesmer JJ, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG. *Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases*. J Biol Chem. (1998) **273**: 16332-16338.
- Tesmer JJ**, Sprang SR. *Structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase*. Curr Opin Struct Biol. (1998) **8**: 713-9.
- Tesmer JJ**, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. *Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs α .GTP γ S*. Science. (1997) **278**: 1907-1916.
- Thomas R**, Pfeuffer T. *Photoaffinity labeling of GTP-binding proteins*. Methods Enzymol. (1991) **195**: 280-286.
- Venter JC**. *The sequence of the human genome*. Science. (2001) **291**: 1304-1351.
- Wagner DA**, Young VR, Tannenbaum SR. *Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment*. Proc Natl Acad Sci USA. (1983) **80**: 4518-4521.
- Wedel B**, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G, Kösling D. *Mutation of His-105 in the beta1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci USA. (1994) **91**: 2592-2596.
- Wessel D**, Flügge UI. *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem. (1984) **138**: 141-143.

- Wolin MS**, Wood KS, Ignarro LJ. Guanylate cyclase from bovine lung. *A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme*. J Biol Chem. (1982) **257**: 13312-13320.
- Wu CC**, Ko FN, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. *YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase*. Br J Pharmacol. (1995) **116**: 1973-1978.
- Wunder F**, Alonso-Alija C, Lohrmann E, Hüser J, Stasch JP. *An automated aequorin luminescence-based functional assay used to identify BAY 58-2667, a new NO-independent soluble guanylate cyclase activator*. BMC Meeting Abstracts: 1st International Conference on cGMP. NO/sGC Interaction and its Therapeutic Implications. (2003) **1**: p0059.
- Zhao Y**, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA. *A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci USA. (1999) **96**: 14753-14758.
- Zhao Y**, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. *Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ*. Biochemistry. (2000) **39**: 10848-10854.
- Zhao Y**, Marletta MA. *Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase*. Biochemistry. (1997) **36**: 15959-15964.
- Zhao Y**, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. *Identification of histidine 105 in the β_1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand*. Biochemistry. (1998) **37**: 4502-4509.

7. Eigene Publikationen

Originalarbeiten:

- Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, Stasch JP. *The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets.* J Cardiovasc Pharmacol. (2000) **35**: 390-397.
- Janssen-Bienhold U, Schultz K, Gellhaus A, Schmidt P, Ammermüller J, Weiler R. *Identification and localization of connexin26 within the photoreceptor-horizontal cell synaptic complex.* Vis Neurosci. (2001) **18**: 169-178.
- Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiß U, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Schröder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. *NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272.* BMC Pharmacol. (2001) **1**: 13.
- Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiß U, Schramm M, Schröder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. *NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle.* Br J Pharmacol. (2002) **136**: 773-783.
- Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch JP. *Receptor binding assay for nitric oxide- and heme-independent activators of soluble guanylate cyclase.* Anal Biochem. (2003) **314**: 162-165.
- Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch JP. *Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase.* Eur J Pharmacol. (2003) **468**: 167-174.
- Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch JP. *Preparation of heme-free soluble guanylate cyclase.* Prot Expr Purif. (2003) **31**: 42-46.
- Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch JP. *A missing link in sGC activation: Identification of residues crucially involved in forming a signal transmission triad.* **submitted.**

Publizierte Abstracts von Postern und Vorträgen:

- Becker EM, Schmidt P, Schröder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, Stasch JP. *VASP: A mediator of YC-1 an NO effects in human and rat platelets*. Acta Physiol Scand. (1999) **167** (Suppl, 645): 64.
- Becker EM, Wunder F, Schmidt P, Kast R, Robyr C, Hoenicka M, Gerzer R, Schröder H, Schramm M, Stasch JP. *Characterization of a new stable soluble guanylate cyclase overexpressing CHO cell line by NO donors and YC-1*. J Mol Med. (2000) **78**: B50.
- Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Walter U, Gerzer R, Stasch JP. *VASP: a mediator of YC-1 and NO effects in human and rat platelets*. J Mol Med. (2000) **78**: B49.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiß U, Schmidt P, Schröder H, Schröder W, Steinke W, Straub A, Schramm M. *NO-independent regulatory site of direct sGC-stimulators like YC-1 and BAY 41-2272*. Nitric Oxide. (2002) **6**: 467.
- Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch JP. *Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase*. BMC Meeting Abstracts: 1st International Conference on NO/sGC Interaction and its Therapeutic Implications. (2003) **1**: p0047.
- Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch JP. *Potentiation of BAY 58-2667-induced sGC activation by ODQ*. BMC Meeting Abstracts: 1st International Conference on NO/sGC Interaction and its Therapeutic Implications. (2003) **1**: p0048.
- Stasch JP, Schmidt P. *NO- and heme-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and therapeutic implications*. BMC Meeting Abstracts: 1st International Conference on NO/sGC Interaction and its Therapeutic Implications. (2003) **1**: op032.
- Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, Müller H, Schmidt P, Sickmann A, Stasch JP, Schmidt HHHW. *Redox-dependent regulation of sGC protein and activity*. BMC Meeting Abstracts: 1st International Conference on NO/sGC Interaction and its Therapeutic Implications. (2003) **1**: op027.

Anhang

Die Tabelle enthält die Primersequenzen für die unter 3.7 durchgeführten Mutagenesen.

Mutation	Mutageneseprimer (5'-3')
$\beta S_{56}A$	GACTTGGTGGCTGCTGCGGCCAAAGTCCTCAACCTCAATGCTGG
$\beta H_{105}F$	GCAGAACCTCGACGCCCTGTTTCGACCACCTCGCCACC
$\beta R_{116}A$	GCCACCATCTACCCAGGGATGGCCGCACCTTCCTTCCGGTGC
$\beta K_{129}A$	GCACCGATGCAGAAAAAGGCGCAGGGCTCATTCTGCACTAC
$\beta Y_{135}A$	GCAAAGGGCTCATTCTGCACGCCTACTCGGAAAGAGAGGGGC
$\beta Y_{135}F$	GCAAAGGGCTCATTCTGCACTTCTACTCGGAAAGAGAGGGGC
$\beta S_{137}A$	GGGCTCATTCTGCACTACTACGCGGAAAGAGAGGGGCTTC
$\beta R_{139}A$	CATTCTGCACTACTACTCGGAAGCAGAGGGGCTTCAGGACATTG
$\beta R_{139}L$	CATTCTGCACTACTACTCGGAACTAGAGGGGCTTCAGGACATTG
$\beta Q_{155}A$	GGATTATCAAGACTGTAGCTGCACAGATCCATGGCACTG
$\beta Q_{156}A$	GATTATCAAGACTGTAGCTCAAGCGATCCATGGCACTGAG
$\beta H_{158}A$	GACTGTAGCTCAACAGATCGCTGGCACTGAGATAGAC
$\beta Y_{135}A + \beta R_{139}A$	GCAAAGGGCTCATTCTGCACGCCTACTCGGAAGCAGAGGGGC
$\beta Y_{135}F + \beta R_{139}L$	GCAAAGGGCTCATTCTGCACTTCTACTCGGAACTAGAGGGGC

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, all denen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, zu danken. Ohne sie wäre diese Arbeit in der jetzigen Form nicht möglich gewesen.

An erster Stelle sei hier unser ehemaliger Institutsleiter Matthias Schramm erwähnt, der meine Arbeit durch das Entfernen bürokratischer Hürden und vor allem durch die Spende von ca. 693 Litern Institutskaffees stark erleichtert hat.

Meinem Betreuer an der Uni-Halle, Prof. Henning Schröder, der alle Veröffentlichungen sehr gewissenhaft und schnell korrigiert hat, und gerade bei den englischen Papern viele sprachliche Kanten abgeschliffen hat. Darüber hinaus hatte ich bei den zwar regelmäßigen, wenn auch seltenen Besuchen in Halle das Gefühl, mehr als nur ein Gast zu sein. Für diese angenehme menschliche Komponente gebührt Ihm, als auch seinem Labor, ein besonderer Dank.

Meinen lieben Kollegen aus unserem Labor, Yvonne, Anja, Ralf, Christine und Bernhard, die mir von der Biochemie bis zu den isolierten Organen unzählige praktische Kniffe zeigen konnten. Dabei möchte ich besonders Ralf und Christine für die feinfühligsten Gespräche danken, die ich mit ihnen führen durfte ☺. Auch sei an dieser Stelle noch einmal Anja für die praktische Unterstützung in unzähligen Experimenten gedankt. Den Pharmaziepraktikanten Armin, Claudia, Imke und vor allem Birgit danke ich für die ganzen Nerven, die sie mich gekostet haben ☺, aber in erster Linie vor allem für die praktische Arbeit, die sie mir abgenommen haben.

Den folgenden Laboren möchte ich für ihre Mitarbeit danken: Für die Synthese der verschiedenen sGC-Aktivatoren und des Photoaffinitätslabels, sowie deren Tritiummarkierung sei hier den Laboren Härter, Hahn und Pleiß gedankt. Für die Bereitstellung der aufgereinigten sGC geht ein Dank an Heiner Apeler und Torsten Minuth. Für die Sequenzierung diverser Peptide, die Hilfe bei der HPLC und dass sie mich so lange als Gast in ihrem Labor erduldet haben ☺, ein herzliches Dankeschön an das Labor Werner Schröder, insbesondere an Rita Dömer. Ein besonderer Dank geht an das gesamte Labor Wunder für die Bereitstellung der cGMP-Reporterzelllinie und der Hilfe an der Lumibox. Ein Dankschön auch an Eva und Raimund für die ganzen guten Tipps und netten Gespräche, gerade, wenn irgendwelche Versuche total daneben gegangen sind. Meiner Büroflamme Ingo einen Dank für prima Zeit mit ihm, die Kaffchen und die Einblicke in das Landleben ☺.

Meiner Nachbarin Susanne und meiner Freundin Anja, die sich erbarnt haben, meine (leicht) verbesserungswürdige ☺ Rechtschreibung zu korrigieren. Und natürlich einen ganz besonderes Dankeschön noch einmal an Anja, dafür, dass Sie in Stresszeiten mir die nötige Zeit freigeschaufelt hat und meine nicht immer ganz sonnige Laune nicht nur ertragen, sondern stark verbessert hat. Danke!

Last but not least gebührt meinem Doktorvater Johannes-Peter Stasch ein großer Dank, nicht nur für die übliche „Überlassung dieses fruchtbaren Themas“, sondern in erster Linie für die erstklassige Betreuung. In der gesamten Zeit meiner Arbeit hat es, trotz des permanenten Telefonklingelns und des Besucheranstroms in seinem Büro, nicht einen Tag gegeben, an dem er für Fragen, Korrekturen oder einfach nur zum Klönen keine Zeit gehabt hätte. Auch werden mir sicher die zahlreichen Züge durch die Hallensischen Kneipen und die am nächsten Tag zu betreuenden Praktika in sehr guter Erinnerung verbleiben ☺. Hier hat alles gestimmt. Ein Betreuer, der dem Namen Doktorvater alle Ehre macht.

Alles Gute für die Zukunft an alle, die ich aufgezählt und auch an alle, die ich vergessen habe. Es war eine schöne Zeit hier bei euch, die ich sicher nie vergessen werde. Danke.

Lebenslauf

Name: Peter Manuel Schmidt

Geburtsdatum: 22.7.1972

Adresse: Käthe-Kollwitz-Weg 15, 40724 Hilden

Geburtsort: 26954 Nordenham

Eltern: Peter Sebastian Schmidt, Elektriker
Elena Schmidt, geb. Huerta-Tuñon, Krankenschwester

Schulischer Werdegang:

1979 – 1983: St.-Willehad Grundschule in Nordenham

1983 – 1985: Orientierungsstufe Mitte in Nordenham

1985 – 1992: Gymnasium Nordenham
Abitur: Mai 1992

Beruflicher Werdegang:

Juli 1992 – Oktober 1993: Zivildienst „Essen auf Rädern“, Arbeiterwohlfahrt in Nordenham

Oktober 1993 – Mai 2000: Biologiestudium an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg
Diplom: Mai 2000
Diplomarbeit: *„Klonierung von Connexintranskripten und deren Lokalisation in der Retina mittels in situ Hybridisierung“*

Februar 1997 – April 1997: Werkstudent, Bayer Crop Science, Projektplanung
August 1997 – Oktober 1997: Werkstudent, Bayer Crop Science, Projektplanung

Februar 1998 – April 1998: Werkstudent, Bayer Health Care, Herz-Kreislauf-Forschung
August 1998 – Oktober 1998: Werkstudent, Bayer Health Care, Herz-Kreislauf-Forschung

Januar 1997 – Dezember 2000: Netzwerk- und EDV-Betreuung, FB Biologie, Universität Oldenburg
April 1999 – Mai 2000: EDV-Schulungen, Procon GmbH, Oldenburg

Mai 2000 – August 2003: Doktorand, Bayer Health Care, Wuppertal, Herz-Kreislauf-Forschung
Die Arbeit mit dem Thema *„Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur NO-unabhängigen Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase“* wurde betreut von PD Dr. J.P. Stasch und Prof. Dr. H. Schröder im Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.