

Untersuchungen zur Aktivierung der hämfreien Guanylatcyclase

D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Linda Sarah Hoffmann
geboren am 23.01.1982 in Herdecke

Gutachter/Innen:

1. Prof. Dr. rer. nat. Johannes-Peter Stasch
2. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Langner
3. Prof. Dr. med. Franz Hofmann

Halle (Saale), 16.07.2010

Für meine Lieben:
Stefan, Nikola und meine Eltern

Inhalt

Abkürzungen	6
1. Einleitung	9
1.1 Der NO/sGC/cGMP-Signalweg im Herz-Kreislauf-System	9
1.1.1 Historischer Überblick.....	9
1.1.2 cGMP-Effektorsysteme.....	10
1.2 Guanylatcyclasen	11
1.2.1 Membranständige Guanylatcyclasen.....	12
1.2.2 Lösliche Guanylatcyclasen.....	13
1.3 Redoxregulation und allosterische Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase	16
1.3.1 Stimulierung der nativen hämhaltigen sGC: NO-unabhängige und hämabhängige Stimulatoren.....	17
1.3.2 Aktivierung der hämfreien sGC: NO- und hämunabhängige Aktivatoren ...	18
1.4 Fragestellung	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Geräte	22
2.2 Materialien und Chemikalien	24
2.3 Substanzen	26
2.4 Lösungen und Medien	27
2.5 Plasmide	31
2.6 Molekularbiologische Methoden	32
2.7 Biochemische Methoden	36
2.8 Zellkultur	42
2.9 Konfokale Laserscanning Mikroskopie	43
2.10 Ganzkörper-Autoradiographie	45
2.11 Langzeitstudie mit BAY 58-2667 an salzbelasteten Dahl/ss Ratten	47
2.12 Statistik	50

3.	Ergebnisse	51
3.1	Aktivierung und Stabilisierung der sGC unter hämoxidierenden Bedingungen	51
3.1.1	Inhibition der sGC-Aktivität durch Zink-Protoporphyrin	51
3.1.2	Bindung von BAY 58-2667 und HMR1766 an das aufgereinigte Enzym ...	51
3.1.3	sGC-Proteinlevel in WT-sGC-cGMP-Reporterzellen unter hämoxidierenden Bedingungen	52
3.1.4	Einfluss der Hämoxidation auf sGC-Proteinlevel in Endothelzellen	54
3.1.5	sGC-Aktivität in WT-sGC-cGMP-Reporterzellen	56
3.1.6	sGC-Aktivität in Endothelzellen	57
3.1.7	Aktivität der β_1 H105F-sGC und der β_1 Y135A/R139A-sGC.....	59
3.1.8	Proteinlevel der β_1 H105F-sGC und der β_1 Y135A/R139A-sGC.....	60
3.2	Nachweis der hämfreien sGC durch Fluoreszenzdequenching	63
3.2.1	Identifizierung einer geeigneten Position für das Tetracystein-Motiv	63
3.2.2	Optimierung der Bedingungen für die Hämoxidation.....	67
3.2.3	Einfluss der Hämoxidation auf die Fluoreszenz von FIAsH-gelabelter TC4-WT-sGC.....	68
3.2.4	Einfluss von NS 2028 auf FIAsH-gelabelte, hämfreie TC4-Y135A/R139A-sGC und ReAsH-gelabelte TC4-WT-sGC	68
3.2.5	Einfluss von NS 2028 und Rotenon auf die Aktivität der TC4-WT-sGC	70
3.2.6	Einfluss von NS 2028 und Rotenon auf die Proteinlevel von TC4-WT-sGC.....	70
3.3	Ganzkörper-Autoradiographie an Ratten mit ^{14}C-BAY 58-2667	72
3.3.1	Ganzkörper-Autoradiographie an normotensiven Ratten unter hämoxidierenden Bedingungen	72
3.3.2	Ganzkörper-Autoradiographie an normotensiven und hypertensiven Ratten	73
3.4	Langzeitwirkung von BAY 58-2667 an hypertensiven Ratten	76
3.4.1	<i>In vivo</i> -Parameter	76
3.4.2	Plasma- und Urinparameter	77
3.4.3	Organgewichte	78
3.4.4	Profibrotische und proinflammatorische Biomarker	79
4.	Diskussion	82
4.1	Aktivierung und Stabilisierung der sGC unter hämoxidierenden Bedingungen	82
4.2	<i>In vitro</i>-Detektion der hämfreien sGC durch Fluoreszenzdequenching	88
4.3	^{14}C-BAY 58-2667-Ganzkörper-Autoradiographie zum indirekten <i>in vivo</i>-Nachweis der hämfreien sGC	93

4.4	Langzeitaktivierung der hämfreien sGC in hypertensiven Ratten	94
5.	<i>Zusammenfassung</i>	98
6.	<i>Literatur</i>	101
7.	<i>Eigene Publikationen</i>	113
	<i>Danksagung</i>	114
	<i>Erklärung</i>	115
	<i>Lebenslauf</i>	116

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
ALB	Albumin
ALT	Alaninaminotransferase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartatdehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis[2-hydroxyethyl]iminotris[hydroxymethyl]-methan
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bpm	Schläge pro Minute
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
Cafty	Calcium-freie Tyrode
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charge coupled device
CFP	Cyan fluorescent protein
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO-Zelle	Chinesische Hamster Ovarienzelle
CK	Creatininkinase
CNG	Cyclic nucleotide-gated
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO	Kohlenstoffmonoxid
cpm	Zählereignisse pro Minute
Da	Dalton
Dahl/ss	Salzsensitive Dahl Ratten
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Abkürzungen

EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIAsH	Fluorescein arsenical helix binder
FN-1	Fibronectin-1
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GC	Guanylatcyclase(n)
GFP	Green fluorescent protein
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's buffered salt solution
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
H-NOX	Heme-nitric oxide and oxygen binding familiy
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
i.v.	Intravenös
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
KIM-1	Kidney injury molecule-1
LDH	Laktatdehydrogenase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase(n)
Ns	<i>Nostoc sp.</i>
OPN	Osteopontin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per/Ant/Sim
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDE	Phosphodiesterase(n)
PEG	Polyethylenglykol

Abkürzungen

pGC	Membranständige Guanylatcyclase(n)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIX	Protoporphyrin IX
ppm	Parts per million
PVP	Polyvinylpyrrolidone
ReAsH	Resofurin arsenical helix binder
RIA	Radioimmuno-Assay
ROI	Region of interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RpL32	Ribosomales Protein L32
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
sGC	Lösliche Guanylatcyclase(n)
TBS	Trisgepufferte Saline
TC	Tetracystein
TEA-HCl	Triethanolamin-Hydrochlorid
TNC	Tenascin-C
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
<i>Tt</i>	<i>Thermoanaerobakter tengcongensis</i>
Tween	Polyoxyethylensorbidan-Monolaurat
U	Enzymeinheit
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
WT	Wildtyp
Zn-PPIX	Zink-Protoporphyrin IX

1. Einleitung

1.1 Der NO/sGC/cGMP-Signalweg im Herz-Kreislauf-System

Der NO/sGC/cGMP-Signalweg ist verantwortlich für verschiedenste physiologische Funktionen in nahezu sämtlichen Organen. Besonders gut wurde seine Rolle im Herz-Kreislauf-System charakterisiert. Hier werden durch die Stickstoffmonoxid (NO)-vermittelte Produktion von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zytoprotektive und antiatherogene Effekte erzielt, wie die Vasodilatation, Inhibition der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, Blockade der Leukozyteninfiltration und Inhibition der Thrombozytenaggregation (Schmidt *et al.*, 1993; Hobbs und Ignarro, 1996; Hobbs, 2002). Der löslichen Guanylatcyclase (sGC) kommt als primäre Quelle von cGMP eine Schlüsselrolle in diesem essentiellen Signalweg zu. Die Dysfunktion des NO/sGC/cGMP-Signalweges ist an der Entstehung vieler schwerwiegender Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie Bluthochdruck und Atherosklerose beteiligt (Hobbs *et al.*, 1999; Melichar *et al.*, 2004). Die systemischen Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen gelten als Haupttodesursachen in westlichen Industrienationen (Santos *et al.*, 2008).

1.1.1 Historischer Überblick

Im Jahre 1998 wurde Robert F. Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro der Nobelpreis in Physiologie oder Medizin für die Entdeckung von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System verliehen (Furchgott, 2003; Ignarro, 2003; Murad, 2003). Ihre Forschungen begannen Mitte der 70er Jahre und ihre Ergebnisse überraschten die wissenschaftliche Welt, weil NO vorwiegend als Umweltgift bekannt war und nicht als zentraler Mediator essentieller Funktionen im Herz-Kreislauf-System. Im Nachhinein erscheint dies besonders verwunderlich, da NO schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts in Form von Nitroglyzerin oder Amylnitrit zur Therapie der Angina pectoris, dem durch myokardiale Ischämie hervorgerufenen Brustschmerz, eingesetzt wurde (Marsh und Marsh, 2000). Zu dieser Zeit war jedoch nicht bekannt, dass dieses kleine Gasmolekül der Wirkstoff war. Von diesen anfänglichen Therapieerfolgen war es ein langer Weg bis zur Entdeckung von NO und der Aufklärung des nachgeschalteten NO/sGC/cGMP-Signalweges.

Donald F. Ashman wies 1963 erstmals cGMP in Rattenurin nach (Ashman *et al.*, 1963). Sechs Jahre später wurde die sGC als cGMP-generierendes Enzym beschrieben (Hardman und Sutherland, 1969). In den 70er Jahren wurde unabhängig

voneinander beschrieben, dass sowohl Calcium als auch Acetylcholin zu einer Erhöhung der cGMP-Spiegel führen und dass die sGC von NO aktiviert wird. In den 80er Jahren wurde der „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) entdeckt, welcher cGMP-Spiegel erhöhte und als endogener Nitrovasodilator vorgeschlagen wurde. Zudem zeigte EDRF eine starke chemische und pharmakologische Ähnlichkeit zu NO (Kots *et al.*, 2009). Schließlich wurde nachgewiesen, dass es sich bei EDRF um NO handelte (Ignarro *et al.*, 1988). Fast zeitgleich wurden die NO-Synthasen (NOS) als endogene NO-Quellen identifiziert (Marletta, 1988). Diese Befunde fügten sich schließlich zu dem Signalweg der NO-vermittelten Vasodilatation zusammen: In Endothelzellen bindet Acetylcholin an muskarinische Rezeptoren und führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, wodurch die Calmodulin-abhängige NO-Synthase aktiviert wird. NO diffundiert in die glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert dort wiederum die sGC. Erhöhte cGMP-Spiegel aktivieren die cGMP-abhängige Proteinkinase und setzen eine Signalkaskade in Gang, die über die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration sowie Dephosphorylierung der leichten Myosin-Kette schließlich zur Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen führt.

1.1.2 cGMP-Effektorsysteme

cGMP ist als „second messenger“ an Prozessen im gesamten Organismus beteiligt. Das Signalmolekül reguliert neben der Relaxation und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen auch Entzündungsprozesse, Thrombozytenadhäsion und -aggregation, neuronale Signaltransduktion und den Sehprozess. Diese Mannigfaltigkeit wird über die cGMP-Effektorsysteme der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK), cGMP-regulierten Phosphodiesterasen (PDE) und cGMP-gesteuerten Ionenkanäle vermittelt (Lucas *et al.*, 2000).

Die cGK-Isoformen cGKI α und cGKI β werden in glatten Gefäßmuskelzellen, Thrombozyten und verschiedenen neuronalen Bereichen, wie Neuronen des Hippocampus, exprimiert und relaxieren unter anderem Gefäßmuskelzellen oder inhibieren die Thrombozytenaggregation (Hofmann *et al.*, 2009). cGKII wird in sekretorischen Epithelien, wie zum Beispiel juxta-glomerulären Zellen der Niere, exprimiert und inhibiert die Reninsekretion (Hofmann *et al.*, 2009). Die cGKs liegen als Homodimere vor und haben den gleichen strukturellen Aufbau aus einem Amino-Terminus, zwei cGMP-Bindungsstellen verschiedener Affinität und einer katalytischen Domäne (Pfeifer *et al.*, 1999).

Die cGMP-vermittelte Signaltransduktion wird durch Veränderungen der intrazellulären cGMP-Konzentration reguliert. Cyclische Nukleotide, wie cGMP, werden durch PDEs abgebaut. In Säugern wurden bis heute 11 PDE-Familien (PDE 1-11) identifiziert, die in zahlreichen Splicevarianten vorkommen und gewebespezifisch exprimiert werden (Kleppisch, 2009). Aufgrund ihrer Substratspezifität lassen sich die PDEs in drei Kategorien unterteilen: die cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-spezifischen PDE 4, 7 und 8, die cGMP-spezifischen PDE 5, 6 und 9 und die PDE 1, 2, 3, 10 und 11 mit dualer Enzymaktivität. PDEs schaffen durch Komplexierung mit regulatorischen Proteinen oder Signalproteinen dreidimensionale Mikrodomänen für die Signaltransduktion der cyclischen Nukleotide (Bender und Beavo, 2006). PDEs können die cyclischen Nukleotidspiegel genau einstellen und ermöglichen so eine, auf die physiologische Situation abgestimmte, Signaltransduktion.

Cyclisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle werden durch die Bindung von cGMP oder cAMP geöffnet und bewirken Änderungen des Membranpotentials durch Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Sie werden aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus in zwei Klassen unterteilt: „cyclic nucleotide-gated“ (CNG)-Kanäle sind an der Signalübertragung im sensorischen System beteiligt und „hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated“ (HCN)-Kanäle können Schrittmacherzellen im Herzen beeinflussen (Biel und Michalakis, 2009).

1.2 Guanylatcyclasen

Guanylatcyclasen gehören, wie Adenylatcyclasen, zur Familie der Nukleotidcyclasen und katalysieren die Umwandlung ihres Substrats, Guanosintriphosphat (GTP) respektive Adenosintriphosphat (ATP), zum jeweiligen cyclischen Nukleotid, cGMP bzw. cAMP. Nukleotidcyclasen weisen eine hochkonservierte katalytische Domäne auf, die aus zwei, in Kopf-Schwanz Konformation einander gegenüberliegenden, Untereinheiten zusammengesetzt ist (Tesmer *et al.*, 1997; Denninger und Marletta, 1999). Aufgrund der hohen Homologie der katalytischen Domänen von Adenylat- und Guanylatcyclasen wird ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung vermutet. Bereits der Austausch von nur drei Aminosäuren reicht aus, um die Substratspezifität zwischen GTP und ATP auszutauschen (Sunahara *et al.*, 1998). Adenylatcyclasen sind als Monomere katalytisch aktiv, da beide katalytischen Domänen in einem Protein vorliegen (Denninger und Marletta, 1999). Im Gegensatz dazu müssen lösliche Guanylatcyclasen als Heterodimere vorliegen, um katalytisch aktiv zu sein (Lucas *et al.*, 2000). Guanylatcyclasen lassen sich aufgrund ihrer zellulären Lokalisation in zwei

Klassen einteilen, die membranständigen (pGC) und die löslichen Guanylatcyclasen (sGC).

1.2.1 Membranständige Guanylatcyclasen

Sieben membranständige Guanylatcyclasen (GC-A bis GC-G) wurden bis heute identifiziert (Garbers und Lowe, 1994). Ihnen ist der Aufbau aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer kurzen Transmembranregion und einer intrazellulären Domäne mit der katalytischen Region gemein. Die intrazelluläre Domäne enthält eine sogenannte Kinase-Homologie Domäne, die an der Regulation von Aktivität und Sensitivität der GCs beteiligt ist (Potter und Hunter, 2001). Die extrazelluläre Domäne legt zwar nahe, dass alle pGCs als Rezeptoren fungieren, aber bisher konnten nur Liganden für GC-A bis GC-D identifiziert werden.

GC-A wird durch atriales (ANP) und B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) aktiviert und ist an der Regulation des arteriellen Blutdrucks, der Volumenhomöostase und an lokalen antihypertrophen und antifibrotischen Prozessen im kardiovaskulären System beteiligt. In neueren Untersuchungen wurde die physiologische Rolle des ANP/GC-A-Systems mit verschiedenen genetischen Mausmodellen belegt. Die Deletion von ANP oder GC-A führt zu schwerer chronischer arterieller Hypertonie, Hypervolämie und kardialer Hypertrophie (Kuhn, 2009). Im Gegensatz dazu wird durch Überexpression von ANP oder GC-A der Blutdruck gesenkt (Steinhilber *et al.*, 1990; Oliver *et al.*, 1998). Für BNP wird angenommen, dass es auch im Herzen als lokaler parakriner antifibrotischer Faktor wirkt (Kuhn, 2009). Das rekombinante humane BNP Nesiritide (Natreacor[®]) ist in den USA zur Behandlung der akut dekompensierten Herzinsuffizienz zugelassen, doch vermehrte Hinweise auf eine mögliche Nierentoxizität und eine erhöhte Mortalität haben die Sicherheit der Therapie in Frage gestellt (Boerrigter *et al.*, 2009; Potter *et al.*, 2009).

C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) aktiviert GC-B. Beide wurden in vielen Geweben nachgewiesen, vor allem jedoch in vaskulären Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, im Gehirn, in Knochen und in Fibroblasten (Olney, 2006). Es gibt Hinweise für eine Beteiligung der CNP/GC-B-Signaltransduktion an der Angiogenese, da CNP die Proliferation von Endothelzellen stimuliert, die Teilung glatter Gefäßmuskelzellen hingegen inhibiert (Komatsu *et al.*, 1996; Yamahara *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2004). Im Herzen inhibiert CNP durch Aktivierung der GC-B die

Proliferation von Fibroblasten und die Hypertrophie von Myozyten (Pagel-Langenickel *et al.*, 2007).

GC-C ist der Rezeptor für Guanylin und Uroguanylin und ist am interstitiellen Elektrolyt- und Wassertransport sowie am Wachstum und Differenzierung der interstitiellen Epithelzellen beteiligt (Kuhn, 2009). GC-E und GC-F kommt eine wichtige Rolle in der Photorezeption zu. Es wurde gezeigt, dass rezessive Mutationen im GC-E-kodierenden Gen zur Erblindung führen (Perrault *et al.*, 1996). Bei GC-D und GC-G scheint es sich beim Menschen um Pseudogene zu handeln, in Nagern wird GC-D jedoch im Riechepithel exprimiert und übernimmt hier wahrscheinlich chemosensorische Funktionen (Kuhn, 2009). GC-D wird, wie GC-C, von Guanylin und Uroguanylin aktiviert. Der Ligand und die physiologische Funktion der GC-G sind bisher noch nicht identifiziert.

1.2.2 Lösliche Guanylatcyclasen

Die löslichen Guanylatcyclasen (sGC) sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die vier bekannten Isoformen α_1 , α_2 , β_1 und β_2 zeichnen sich durch eine hohe Sequenzhomologie aus (Garbers, 1979; Yuen *et al.*, 1990; Harteneck *et al.*, 1991). Die α -Untereinheiten weisen eine Homologie von 48 % und die β -Untereinheiten eine Homologie von 41 % auf (Derbyshire und Marletta, 2009). Die C-Termini beider Untereinheiten, die das katalytische Zentrum der sGC beherbergen, sind weitaus stärker konserviert als die übrigen Domänen des Enzyms (Koesling *et al.*, 1990).

α_1/β_1 -sGC wird ubiquitär in den meisten Geweben exprimiert und wird daher als die physiologisch relevanteste sGC angesehen (Budworth *et al.*, 1999). Das Molekulargewicht der α_1 -Untereinheit beträgt 82 kDa und das der β_1 -Untereinheit 70 kDa (Nakane *et al.*, 1990). Die Untereinheiten sind aus vier verschiedenen Domänen aufgebaut: Der N-terminalen regulatorischen Domäne, einer darauf folgenden „Per/Ant/Sim“ (PAS)-Domäne, der nachfolgenden α -Helix und einer C-terminalen katalytischen Domäne (Lucas *et al.*, 2000; Cary *et al.*, 2006). Die PAS-Domäne und die α -Helix sind an der Dimerisierung der beiden Untereinheiten beteiligt (Cary *et al.*, 2006; Rothkegel *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008). Innerhalb der katalytischen Domäne konnten die für die Umsetzung von GTP zu cGMP entscheidenden Aminosäuren α_1 D485, α_1 D429, α_1 R573, β_1 N548, β_1 E473, β_1 C541 und β_1 R552 identifiziert werden (Derbyshire und Marletta, 2009). Die regulatorische Domäne der β_1 -

Untereinheit bildet eine konservierte Hämbindungsdomäne (Iyer *et al.*, 2003; Nioche *et al.*, 2004; Pellicena *et al.*, 2004; Karow *et al.*, 2005).

Die sGC ist der einzige bekannte Rezeptor für das Signalmolekül NO, das endogen von NO-Synthasen bei der Umsetzung von L-Arginin zu Citrullin freigesetzt wird (Mayer und Andrew, 1998; Murad, 2006). Die reduzierte prosthetische Hämgruppe ist für die NO-vermittelte sGC-Aktivierung unerlässlich. Sie weist eine charakteristische Soret-Bande bei 431 nm des UV/Vis-Spektrums auf, welche durch die Bindung von NO nach 389 nm verschoben wird (Stone und Marletta, 1994). Das Häm ist über den proximalen Liganden H105 und das Hämbindungsmotiv aus Y135-x-S137-x-R139 an die β_1 -Untereinheit gebunden (Wedel *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2004; Rothkegel *et al.*, 2006). Aufgrund ihrer Hämgruppe wird die sGC in die Proteinfamilie der „heme-nitric oxide and oxygen binding family“ (H-NOX) eingeordnet (Boon und Marletta, 2005). Der Vergleich der Kristallstrukturen der H-NOX-Proteine des obligat anaeroben Bakteriums *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tt*) und des Cyanobakteriums *Nostoc sp.* (*Ns*) mit der Aminosäuresequenz der sGC machte Rückschlüsse auf die Struktur der sGC möglich. Diese *in silico*-Untersuchungen wiesen daraufhin, dass die sGC aufgrund struktureller Eigenschaften durch NO 50-mal stärker aktiviert wird als durch CO (Martin *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die O₂-Bindung der *Tt* H-NOX-Domäne durch die Mutation I75F/L144F vermindert wird (Weinert *et al.*, 2009). In der Sequenz der sGC liegt an Position 75 ein Phenylalanin vor und könnte dafür verantwortlich sein, dass die sGC kein O₂ bindet.

Die Basalaktivität der sGC kann durch die Bindung des endogenen Liganden NO bis zu 200-fach erhöht werden (Wolin *et al.*, 1982). Die basalaktivierte sGC enthält einen an die vier Stickstoffatome des Häms und H105 gebundenen, und somit fünffach koordinierten, Histidyl-Häm-Komplex. Es existieren zwei Modellvorstellungen, wie die NO-Bindung an die Hämgruppe und die dadurch induzierten Veränderungen der Hämkoordination zur Aktivierung der sGC führen: Die erste nimmt an, dass ein klassischer Liganden-Rezeptor-Komplex zur sGC-Aktivierung führt (Bellamy *et al.*, 2002). Hierbei ersetzt NO den axialen Liganden H105 des Häms durch einen Kompetitionsmechanismus auf der proximalen Seite des Enzyms (Ignarro *et al.*, 1981; Stone und Marletta, 1995; Stone *et al.*, 1995; Hobbs und Stasch, 2009). Übereinstimmend mit diesem Aktivierungsmodell führt die Bindung von Protoporphyrin IX (PPIX, ohne zentrales Eisenatom) zu einer sGC-Aktivierung, die kinetisch nicht von der NO-induzierten Aktivierung unterscheidbar ist (Wolin *et al.*, 1982). Die zweite Vorstellung geht von einem binären Aktivierungsmodell aus (Cary *et al.*, 2006).

Durch Bindung von NO wird ein sechsfach koordiniertes Histidin-Häm-NO-Intermediat gebildet. Dieses Intermediat zerfällt rasch in einen fünffach koordinierten NO-Häm-Komplex, da das Histidin vom Eisenatom der Hämgruppe abdissoziiert. Durch die Lösung der Eisen-Histidin-Bindung wird die sGC aktiviert. Der Übergang des Histidyl-Häm-Komplexes zum NO-Häm-Komplex ist spektroskopisch durch die Verschiebung der Soret-Bande in den kürzerwelligen Bereich nachweisbar (Russwurm und Koesling, 2004; Cary *et al.*, 2006). Die Geschwindigkeit, mit der das Histidin-Häm-NO-Intermediat zum aktivierten NO-Häm-Komplex zerfällt, ist von der Konzentration an freiem NO abhängig (Zhao *et al.*, 1999; Ballou *et al.*, 2002; Bellamy *et al.*, 2002). NO ermöglicht so einen basalaktivierten sowie einen vollständig aktivierten Zustand der sGC. Im Ruhezustand werden im Gewebe niedrige NO-Konzentrationen synthetisiert, die in Gegenwart von GTP oder ATP zur basalen sGC-Aktivierung führen (Russwurm und Koesling, 2004; Cary *et al.*, 2006). Die Hämgruppe der sGC ist in diesem Zustand aufgrund ihrer hohen Affinität für NO bereits durch die basalen nanomolaren NO-Spiegel gesättigt (Cary *et al.*, 2006). Durch einen plötzlichen Anstieg der NO-Synthese wird die NO-Konzentration im Gewebe erhöht, wodurch die sGC maximal aktiviert wird (Cary *et al.*, 2006). Da die Hämgruppe schon durch basales NO belegt ist, weisen diese Untersuchungen und Befunde mit N-Butyl-Isocyanid als alternativen Hämliganden auf eine zweite NO-Bindungsstelle außerhalb der Hämdomäne hin (Derbyshire und Marletta, 2007). Kürzlich konnten Cysteine in der α_1 - und β_1 -Untereinheit als mögliche Kandidaten für die zweite Bindungsstelle von NO identifiziert werden (Fernhoff *et al.*, 2009).

Die α_2 -Untereinheit wird vor allem in Gehirn, Lunge, Kolon, Herz, Milz, Uterus und Plazenta exprimiert (Russwurm *et al.*, 1998; Budworth *et al.*, 1999; Bellingham und Evans, 2007). Das α_2/β_1 -Heterodimer weist eine, der α_1/β_1 -sGC ähnliche, Ligandenvermittelte Aktivität auf und ist vermutlich an der synaptischen Übertragung im Gehirn beteiligt (Russwurm *et al.*, 2001; Russwurm *et al.*, 1998). Die β_2 -Untereinheit wird hauptsächlich in der Niere und Leber exprimiert (Yuen *et al.*, 1990). Sie bildet katalytisch aktive Homodimere. Katalytisch aktive Heterodimere konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden (Koglin *et al.*, 2001). Die physiologische Relevanz der β_2 -Untereinheit ist bisher noch nicht aufgeklärt.

1.3 Redoxregulation und allosterische Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase

Oxidativer Stress ist ein Risikofaktor für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und durch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) charakterisiert (Melichar *et al.*, 2004; Grossman, 2008). ROS, wie das Superoxidanion O_2^- , sind Sauerstoffverbindungen mit einem ungepaarten und daher sehr reaktiven Elektron. Oxidativer Stress greift an mehreren Stellen schädigend in den NO/sGC/cGMP-Signalweg ein und trägt somit zur endothelialen Dysfunktion bei:

1. ROS-Produktion durch NADPH-Oxidasen.
NADPH-Oxidasen können durch pathologische Stimuli wie Angiotensin II, oxidiertes „Low density protein“ und hohe Glukose- und Calciumkonzentrationen aktiviert werden, wodurch die zelluläre ROS-Konzentration ansteigt (Armitage *et al.*, 2009).
2. Entkopplung der NO-Synthase.
ROS können den Kofaktor Tetrahydrobiopterin der NOS oxidieren und die NOS entkoppeln, wodurch diese ROS anstatt NO bildet (Pou *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 2008).
3. Verminderte Bioverfügbarkeit von NO.
NO reagiert mit O_2^- zu einem der wohl reaktivsten ROS, Peroxynitrit ($ONOO^-$), wodurch NO abgefangen wird. Peroxynitrit schädigt Zellen und Organe durch Oxidation oder Nitrierung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (Beckman, 2009).
4. Oxidation/Verlust der Hämgruppe.
ROS oxidieren das zentrale Fe^{2+} der sGC-Hämgruppe (Wedgwood *et al.*, 2005; Gladwin, 2006; Stasch *et al.*, 2006). NO ist nicht mehr in der Lage die oxidierte sGC zu aktivieren. Als Folge der Oxidation kann es zum Verlust der Hämgruppe von der sGC kommen (Evgenov *et al.*, 2006; Stasch und Hobbs, 2009). Der genaue Mechanismus oder die Voraussetzungen, die zum Hämverlust führen, sind noch nicht bekannt.

Durch den therapeutischen Einsatz von NO-Donoren und organischen Nitraten kann die verminderte Verfügbarkeit von NO zum Teil ausgeglichen werden. Allerdings wurde auch gezeigt, dass organische Nitrate die sGC direkt oxidieren können (Artz *et al.*, 2002, Münzel *et al.*, 2005; Münzel *et al.*, 2007). Die hämfreie sGC ist nicht nur insensitiv gegenüber NO, sondern wird außerdem ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, wie in *in vitro*-Untersuchungen gezeigt wurde (Stasch *et al.*,

2006; Meurer *et al.*, 2009). Auch *in vivo* sind die sGC-Proteinlevel unter oxidativen Stressbedingungen vermindert (Bauersachs *et al.*, 1998; Ruetten *et al.*, 1999; Kloss *et al.*, 2000).

Die Hämgruppe spielt nicht nur eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der sGC, sondern unterliegt auch einer Redoxregulation. Dadurch kann die sGC in mehreren Formen vorliegen: In der nativen reduzierten NO-aktivierbaren Fe²⁺-Form, sowie der NO-insensitiven oxidierten Fe³⁺-Form und letztlich der hämfreien Form. In den letzten Jahren konnten Substanzen identifiziert werden, welche die verschiedenen Redoxformen der sGC spezifisch adressieren. Sie stellen vielversprechende Therapieoptionen für Erkrankungen dar, die durch eine Schädigung des NO/sGC/cGMP-Signalweges hervorgerufen werden.

1.3.1 Stimulierung der nativen hämhaltigen sGC: NO-unabhängige und hämabhängige Stimulatoren

sGC-Stimulatoren sind in der Lage die sGC NO-unabhängig zu stimulieren, wobei das Vorhandensein der reduzierten Hämgruppe die Voraussetzung für ihre Wirkung ist. YC-1 war die erste Substanz, für die eine NO-unabhängige sGC-Stimulierung nachgewiesen werden konnte (Ko *et al.*, 1994; Friebe *et al.*, 1996; Mülsch *et al.*, 1997; Hönicka *et al.*, 1999). Allerdings zeigte YC-1 nur eine schwache Wirksamkeit an der sGC und darüber hinaus eine geringe Spezifität. Diese äußerte sich durch eine Inhibition der PDE 5 und verschiedener Tyrosinkinase (Stasch und Hobbs, 2009). Zudem wurden cGMP-unabhängige Wirkungen von YC-1 nachgewiesen, wie die Stimulierung Calcium-sensitiver Kaliumkanäle oder Natriumpumpen (Stasch und Hobbs, 2009). YC-1 diente als Leitstruktur für die Synthese und Auffindung der wirkstärkeren und spezifischeren sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 (Straub *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2002a; Stasch *et al.*, 2002b; Bischoff und Stasch, 2004; Evgenov *et al.*, 2006). Beide Substanzen stimulieren die sGC direkt und weisen durch Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes einen starken Synergismus mit NO auf (Stasch *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2002b). Eine direkte Interaktion der sGC-Stimulatoren mit der Hämgruppe wird nicht angenommen, da Raman-Resonanzspektren keine Hinweise auf eine solche Interaktion lieferten und die Soret-Bande in Anwesenheit von BAY 41-2272 nicht verschoben wird (Denninger *et al.*, 2000; Stasch *et al.*, 2001). Zudem wurde durch ein „Photoaffinity Labeling“ mit BAY 41-2272 eine Bindung an C238 und C243 der α_1 -Untereinheit demonstriert (Stasch *et al.*, 2001). BAY 41-2272 und BAY 41-8543 bewirkten in verschiedenen

experimentellen Modellen eine starke Vasodilatation, Inhibition der Thrombozytenaggregation und antiproliferative Effekte (Hobbs und Stasch, 2009). Die schlechten metabolischen als auch pharmakokinetischen Eigenschaften beider sGC-Stimulatoren machten eine weitere Optimierung hinsichtlich ihrer therapeutischen Anwendung notwendig, die schließlich zu der Entdeckung von Riociguat führte (BAY 63-2521; Straub *et al.*, 2002; Mittendorf *et al.*, 2009). Durch Langzeitbehandlung mit BAY 63-2521 konnte eine, durch Hypoxie oder Monocrotalin induzierte, pulmonale Hypertonie an Mäusen und Ratten, eine Rechtsherzhypertrophie sowie ein krankheitsassoziierter Umbau der Gefäße vermindert werden (Schermyly *et al.*, 2008). BAY 63-2521 befindet sich derzeit in der klinischen Phase III zur Behandlung der pulmonal arteriellen Hypertonie und der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (Mittendorf *et al.*, 2009; Stasch und Hobbs, 2009).

1.3.2 Aktivierung der hämfreien sGC: NO- und hämunabhängige Aktivatoren

sGC-Aktivatoren aktivieren im Gegensatz zu sGC-Stimulatoren selektiv die hämfreie sGC. Sie wurden mittels eines „High-Throughput Screenings“ unter Verwendung einer cGMP-Reporterzelllinie aus inzwischen mehr als 2.300.000 Substanzen des Bayer-Substanzpools identifiziert. Die gezielte Derivatisierung eines „Screening-Hits“ führte zu BAY 58-2667 (Cinaciguat; Stasch *et al.*, 2002c; Wunder *et al.*, 2005). BAY 58-2667 zeigt an der nativen sGC eine flache Konzentrationswirkungskurve mit einer geringen sGC-Aktivierung (Stasch *et al.*, 2002c). Interessanterweise kommt es durch die Zugabe des spezifischen sGC-Oxidanz ODQ zu einer starken Potenzierung der BAY 58-2667-vermittelten sGC-Aktivierung (Stasch *et al.*, 2002c). ODQ inhibiert die Wirkung von NO und sGC-Stimulatoren durch Oxidation des zentralen Fe²⁺ der sGC-Hämgruppe (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000). Hämfreie isolierte sGC wird durch BAY 58-2667 bis zu 200-fach direkt aktiviert wird, genau wie nach Zugabe von ODQ (Stasch *et al.*, 2002c; Schmidt *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2008). Untersuchungen am hämfreien isolierten Enzym zeigten außerdem, dass BAY 58-2667 mit Metalloporphyrinen um die Bindung in der Hämtasche konkurriert (Stasch *et al.*, 2006).

Die Aktivierung des hämfreien Enzyms lässt sich auf Erkrankungsmodelle übertragen. In Blutgefäßen von spontan hypertensiven Ratten, hyperlipidämischen Kaninchen und Mäusen (Modellen für Atherosklerose) sowie von Typ 2 Diabetikern konnte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgefäßen gezeigt werden, dass BAY 58-2667 in den erkrankten Gefäßen deutlich stärker wirkt (Stasch *et al.*, 2006). In

spontan hypertensiven Ratten konnte im Vergleich zu normotensiven Kontrolltieren durch BAY 58-2667 ein stärkerer und länger anhaltender blutdrucksenkender Effekt erzielt werden (Stasch *et al.*, 2006). In Tiermodellen für pulmonale Hypertonie senkte eine Behandlung mit BAY 58-2667 den rechtsventrikulären Druck, verminderte die Hypertrophie des rechten Ventrikels, verbesserte strukturelle Veränderungen der Lungengefäße und verminderte die assoziierte Lungenfibrose (Dumitrascu *et al.*, 2006; Dunkern *et al.*, 2007). BAY 58-2667 verbesserte die Herzleistung und die Nierendurchblutung in einem Modell für Herzinsuffizienz (Boerrigter *et al.*, 2007). In einem Modell für chronisches Nierenversagen konnte durch eine Behandlung mit BAY 58-2667 eine therapeutische Wirkung erzielt werden (Kalk *et al.*, 2006). BAY 58-2667 befindet sich derzeit in der klinischen Entwicklung zur Behandlung der akut dekompensierten Herzinsuffizienz. In einer Phase IIa Studie konnte eine deutliche Verbesserung der Herzleistung nachgewiesen werden (Lapp *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009).

HMR1766 (Ataciguat) ist ein weiterer sGC-Aktivator, der keine strukturellen Gemeinsamkeiten mit BAY 58-2667 aufweist, jedoch das gleiche pharmakologische Profil zeigt (Schindler *et al.*, 2006; Hobbs und Stasch, 2009). Die Wirkung von HMR1766 an der sGC wird durch Zugabe von ODQ verstärkt. HMR1766 konkurriert wie BAY 58-2667 mit Metalloporphyrinen um die Bindung in der Hämbindungstasche (Schindler *et al.*, 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass die *in vitro*-Wirkung von HMR1766 unter oxidativen Stressbedingungen stärker ist als unter Kontrollbedingungen (Zhou *et al.*, 2008). In experimentellen Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und des Nierenversagens zeigte HMR1766 eine therapeutische Wirksamkeit (Schäfer *et al.*, 2004; Benz *et al.*, 2007).

1.3.2.1 Hämfreie sGC

BAY 58-2667 interagiert mit den Hämankeraminosäuren Y135 und R139 der Hämbindungstasche, die durch das Entfernen der Hämgruppe freigegeben werden (Schmidt *et al.*, 2004). Als Hämmimetikum kann BAY 58-2667 die native prosthetische Hämgruppe ersetzen und induziert ähnliche Konformationsänderungen der sGC wie sie auch durch die Bindung von NO an der Hämgruppe erzeugt werden (Schmidt *et al.*, 2004). Das einzigartige pharmakologische Profil von BAY 58-2667, selektiv die hämfreie sGC zu aktivieren, machte es erstmals möglich die hämfreie Form der sGC indirekt nachzuweisen. Vor der Entdeckung von BAY 58-2667 wurde angenommen,

dass die reduzierte hämhaltige sGC die einzige physiologische Form des Enzyms darstellt. Hämfreie sGC in Präparationen wurde als Artefakt der Aufreinigung betrachtet und durch die Zugabe von reduzierenden Agenzien wurde versucht, die sGC im vermeintlich einzigen nativen reduzierten Zustand zu bewahren (Hönicka *et al.*, 1999). Durch die Verwendung von BAY 58-2667 wurde deutlich, dass nahezu alle Enzympräparationen, Zellen oder Gewebe einen Anteil hämfreier sGC aufweisen (Schmidt *et al.*, 2004; Gladwin, 2006; Rothkegel *et al.*, 2006; Stasch *et al.*, 2006). Da sGC-Aktivatoren selektiv die hämfreie sGC aktivieren, führten diese Befunde zu der Annahme, dass der Anteil an hämfreier sGC unter pathologischen Bedingungen, wie oxidativen Stress, erhöht ist (Roy *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009). Die hämfreie sGC wird durch Ubiquitinierung proteasomal abgebaut. Interessanterweise wird dieser Abbau in Anwesenheit von BAY 58-2667 verhindert (Stasch *et al.*, 2006; Meurer *et al.*, 2009). Durch ihre porphyrine Struktur sind Zink-Protoporphyrin IX (Zn-PPIX) und BAY 58-2667 in der Lage, die sGC vor oxidativ-induziertem Abbau zu schützen (Stasch *et al.*, 2006). Thoonen *et al.* (2009) generierten kürzlich H105F-Knockin Mäuse, die aufgrund der eingefügten Mutation hämfreie sGC exprimieren und *in vivo*-Untersuchungen der hämfreien sGC möglich machen.

1.4 Fragestellung

Die sGC existiert in einem dynamischen Gleichgewicht aus reduzierter, oxidierter und hämfreier sGC und unterliegt einer Redoxregulation (Hobbs und Stasch, 2009). In jüngster Zeit sind insbesondere die hämfreie sGC und ihre pathophysiologische Bedeutung in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Es existierte keine Methode zum direkten Nachweis der hämfreien sGC in zellulären Systemen. Bisher konnte die hämfreie sGC in lebenden Zellen nur indirekt mit Hilfe der hämabhängigen sGC-Stimulatoren und der hämunabhängigen sGC-Aktivatoren nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Aktivierung der hämfreien sGC mit folgenden Fragestellungen näher untersucht werden:

- ***Welche strukturellen Voraussetzungen führen zu einer Aktivierung und Stabilisierung der hämfreien sGC unter hämoxidierenden Bedingungen?***

Das biochemische Profil der sGC-Aktivatoren legte die Vermutung nahe, dass alle hämunabhängigen sGC-Aktivatoren die hämfreie sGC wie BAY 58-2667 gegen den Oxidation-induzierten Abbau schützen könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen und im Weiteren den grundlegenden Mechanismus aufzuklären, der zur Stabilisierung der sGC-Proteinlevel führt, wurde der Einfluss der beiden strukturell unterschiedlichen

sGC-Aktivatoren BAY 58-2667 und HMR1766 unter hämoxidierenden Bedingungen untersucht.

- ***Kann hämfreie sGC mit bildgebenden Verfahren in Zellen nachgewiesen werden?***

Zur intrazellulären Detektion der hämfreien sGC sollte eine auf Fluoreszenz-quenching basierende Methode etabliert werden. Hierzu wurde die sGC in lebenden Zellen mit den biarsenischen Farbstoffen "fluorescein arsenical helix binder" (FIAsH) und "resorufin arsenical helix binder" (ReAsH; Griffin *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2002) gelabelt.

- ***Kann hämfreie sGC mit bildgebenden Verfahren in vivo nachgewiesen werden?***

Als bildgebendes Verfahren zum indirekten *in vivo*-Nachweis der hämfreien sGC sollte die Ganzkörper-Autoradiographie an gesunden und hypertonen Ratten angewandt werden. Mit der Ganzkörper-Autoradiographie kann die Verteilung von radioaktiv markierten Substanzen in Organen und Geweben von Tieren sichtbar gemacht werden. Die Grundlage für diese Versuche bildete die Eigenschaft von BAY 58-2667 selektiv an der hämfreien sGC zu binden (Stasch *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2008). Daraus wurde die Arbeitshypothese entwickelt, dass ¹⁴C-BAY 58-2667 überall dort in der Ganzkörper-Autoradiographie nachgewiesen werden könnte, wo auch hämfreie sGC vorliegt.

- ***Führt eine chronische Aktivierung der hämfreien sGC in einem experimentellen Hypertoniemodell zu einer therapeutischen Wirkung?***

Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich in einer chronischen Studie an hypertensiven Dahl/ss Ratten eine therapeutische Wirkung durch eine Langzeitaktivierung der hämfreien sGC mit BAY 58-2667 nachweisen lässt. Eine Hochsalzbelastung (8 % NaCl) führt bei Dahl/ss Ratten zu einer Schädigung der Nieren und des Herzens und zu einem Anstieg des Blutdrucks (Stasch *et al.*, 1997). Diese pathologischen Veränderungen gehen mit erhöhtem oxidativen Stress und möglicherweise auch einer Zunahme der hämfreien sGC einher (Meng *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2006).

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Agarosegelkammer	OWL B1A EasyCast Mini Gel	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Agarosegelkammer	Agagel™ Standard	Biometra, Göttingen
Analysegerät für Elektrolyte	Elektrolyt Analyzer	Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA
Analysegerät für Plasmen und Urine	Multichannel Autoanalyzer Synchron CX7	Beckmann, Hamburg
Blutdruckmonitor	TSE Blutdruckmonitor Serie 9000	TSE, Bad Homburg
Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Heraeus, Düsseldorf
CCD-Kamera	Eigenbau	Bayer HealthCare, Wuppertal
Densitometer	GS-710 Calibrated Imaging Densitometer™	BioRad, München
ELISA-Reader	SLT Spectra Elisa Reader	SLT, Crailsheim
Flüssig-Szintillations- und Lumineszenz-Counter	1450 Micro Beta TRILUX	Wallac, Turku, Finnland
Flüssig-Szintillations-Counter	PW 4700 liquid scintillation counter	Philips Ray Test, Straubenhardt
Fotoentwickler	AGFA Curix 60™	AGFA, Köln
Gefriermikrotom	CM 3600	Leica Microsystems, Nussloch
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz
Gelscanner	Gel Doc 2000	BioRad, München
Homogenisierungsapparat	FastPrep	MP Biochemicals, Echwege
HPLC	2300 HLC System	Cohesive Technologies, Waltham, MA, USA

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Imaging Platte	BAS-SR 2025	Fuji Photo Film, Tokyo, Japan
Konfokales Laserscanning Mikroskop	LSM 510 Meta	Zeiss, Jena
Laserscanner	BAS 5000	Fuji Photo Film, Tokyo, Japan
Mikroskop	Axiovert 100, Olympus BH-2	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Siemens 900W	Siemens-Electrogeräte, München
PCR-Cycler	UNO-Thermoblock™	Biometra, Göttingen
pH-Meter	pH-Meter 765 Kalimatic	Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
SDS PAGE-Kammer	XCell Sure Lock, Novex Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Spectrophotometer	NanoDrop ND 100 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
SpeedVac	Bachofer Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Stromversorgungsgerät für Elektrophorese-Apparaturen	Mini Protean II cell Power PAC 200/1000	BioRad, München
TaqMan-Gerät	7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Ultraschallbad	Transsonic TS 540	Faust Elma, Singen
Ultraschallspitze	Branson Sonifier 250	Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Waage	Waage PM 400	Mettler Toledo, Giessen
Waage	Feinwaage Mettler AX205 DeltaRange™	Mettler Toledo, Giessen
Wasserbad	Julabo 19A mit Thermostat	Julabo, Seelbach
Western Blot-Apperatur	iBlot® Transfer Device	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge	Biofuge A Heraeus Sepatech	Heraeus, Düsseldorf

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Zentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Cryofuge 5000 Heraeus Sepatech	Heraeus, Düsseldorf

2.2 Materialien und Chemikalien

Material	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Anti-Rabbit HRP-Detektkit	Vectastain™ ABC	Vectorlabs, Wiesbaden
ECL-Kit	ECL-Chemilumineszens-Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
ELISA-Kit	Quantikine® Mouse Osteopontin Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Farbreagenz	Protein Assay	BioRad, München
FIAsH	Lumio™ Green In-Cell Detection Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Gelladepuffer	6 x Loading Dye	Fermentas, Leon-Rot
Glasfaserfilterplatten	Multiscreen®HTS, FB	Millipore, Billerica, MA, USA
iBlot-Kits	iBlot® Western Detection Stacks (Regular)	Invitrogen, Karlsruhe
Klonierungs-Kits	pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, Mammalian Lumio™ Gateway® Vectors with Dual Lumio™ Red and Green In-Cell Detection Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Maxi-Prep Kit	QIAprep™ Spin Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Mini-Prep Kit	Invisorb Spin Plasmid Two Kit	Invitek, Berlin
Mutagenesekit	QuickChange™ Mutageneskit XL	Stratagene, La Jolla, CA, USA
PCR-Mix	qPCR MasterMix Plus	Eurogentech, Seraing, Belgien
ReAsH	Lumio™ Red In-Cell Detection Kit	Invitrogen, Karlsruhe

Material	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Reverse Transkriptions-System	ImProm-II Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RIA-Kit	ANP-RIA Kit	Biotrend, Köln
RIA-Kit	cGMP-RIA Kit	IBL, Hamburg
RNA-Isolations-Reagenz	TRIzol [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Röntgenfilme	ECL-Hyperfilm [™]	Amersham Biosciences, Freiburg
Standard für Agarosegele	500 bp ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Standard für SDS Gele	Precision Plus Protein Standard Dual Color	BioRad, München
Szintillationsgefäße	20 ml Propylengefäße	Zinsser Analytic, Frankfurt
Szintillator	Ultima Gold	Packard BioScience, Groningen, Niederlande
Transfektionsreagenzien	Lipofectamin [™] , Plus [™] , Lipofectamin2000 [™]	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Glycin-Gel	ProGel Tris-Glycin 10 %	Anamed, Darmstadt
UV-Einwegküvetten	UVette [™]	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturmaterial	175 cm ² Zellkulturflaschen; 6-Well-, 24-Well- und 96-Well-Zellkulturplatten	Costar, Cambridge, MA, USA
Zellkulturmaterial	Neubauer Zählkammer	Costar, Cambridge, MA, USA
Zellkulturmaterial	Mediumfiltriereinheiten (0,22 µM)	Costar, Cambridge, MA, USA
Zellkultur-Objektträger	LabTek II Chambered Coverglas	NalgeNunc, Naperville, IL, USA
Zellschaber	Cell Scraper	BD Falcon, Bedford, OH, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, im höchsten Reinheitsgrad von Calbiochem (Bad Soden), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Steinheim) bezogen. [$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP (spezifische Aktivität: 29,6 TBq/mmol) wurde von Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim) bezogen.

2.3 Substanzen

sGC-Aktivatoren

BAY 58-2667 (4-(((4-carboxybutyl){2-4-phenethylbenzyl}oxy]phenethyl)amino)methyl-[benzoic]säure) und HMR1766 (5-chloro-2-(5-chloro-thiophene-2-sulfonylamino-*N*-(4-(morpholine-4-sulphonyl)-phenyl)-benzamid Natriumsalz) wurden für *in vitro*-Untersuchungen mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und anschließend in den jeweiligen Testpuffern verdünnt (Stasch *et al.*, 2002c; Schindler *et al.*, 2006; Abbildung 1). Für *in vivo*-Untersuchungen wurde BAY 58-2667 in Transcutol/Cremophor EL/PBS (10/10/80 v/v/v) gelöst.

sGC-Stimulator

BAY 41-2272 (5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamin) wurde mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und in den jeweiligen Testpuffern verdünnt (Straub *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2001; Abbildung 1).

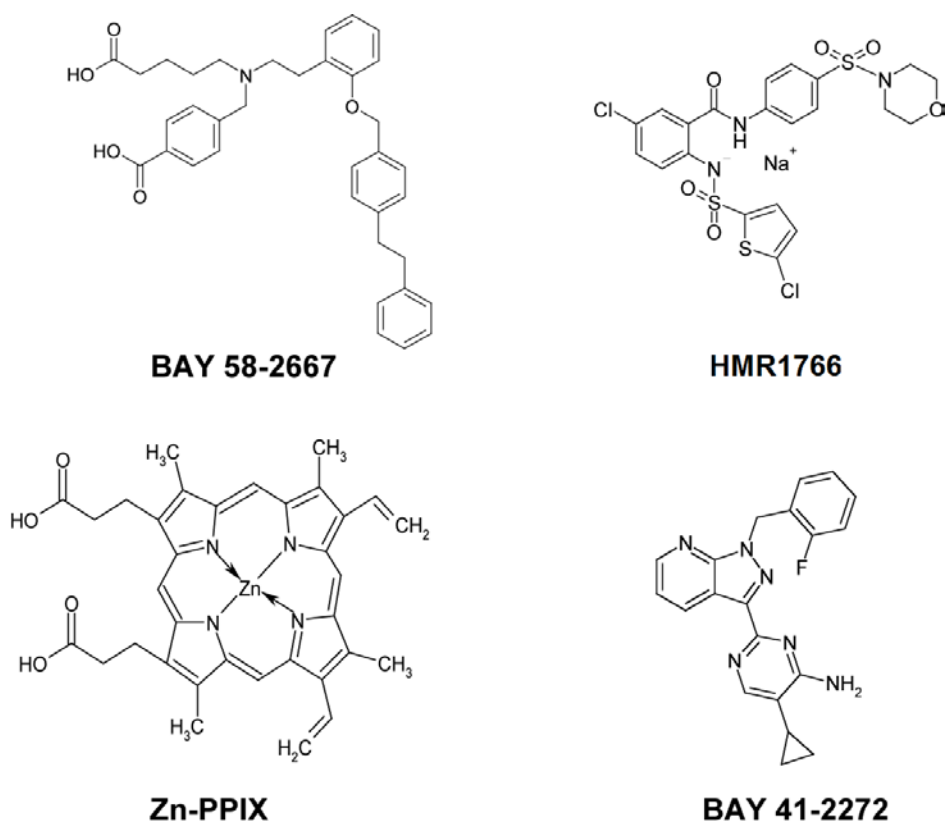


Abbildung 1: Chemische Strukturen der sGC-Aktivatoren BAY 58-2667 und HMR1766, des sGC-Stimulators BAY 41-2272 und des Hämtaschenliganden Zink-Protoporphyrin IX (Zn-PPIX).

Zink-Protoporphyrin IX (Zn-PPIX)

Zn-PPIX (Sigma, Steinheim) wurde mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und anschließend in den jeweiligen Testpuffern verdünnt.

NO-Donor

Als NO-Donor wurde DEA/NO (2-(N,N-Diethylamino)-diazennolat-2-oxid; Axxora, Lörrach) eingesetzt, welches bei neutralem pH und RT eine Halbwertszeit von 2 min aufweist (Morley und Keefer, 1993). Um einen frühzeitigen Zerfall von DEA/NO zu vermeiden, wurde unmittelbar vor jedem Test eine 10 mM DEA/NO-Stammlösung in 10 mM NaOH auf Eis hergestellt und in den jeweiligen Testpuffern auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

sGC-Inhibitoren

ODQ (1H-[1,2,4]-Oxadiazolo[4,3a]-quinoxazin-1-one; Tocris Bioscience, Avonmouth, UK) und NS 2028 (4H-8-Bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazin-1-one; Axxora) wurden für *in vitro*-Untersuchungen zu 10 mM in DMSO gelöst und in den jeweiligen Testpuffern verdünnt. Für *in vivo*-Untersuchungen wurde ODQ in Glycerin/H₂O/PEG 400 (60/100/949=w/w/w) gelöst.

Rotenon

Rotenon ((2R,6aS,12aS)-2-isopropenyl-8,9-dimethoxy-1,2,12,12a-tetrahydrochromeno [3,4-b]furo[2,3-h]chromen-6(6aH)-one; Sigma) wurde als 10 mM Lösung in DMSO angesetzt und in den jeweiligen Testpuffern verdünnt.

2.4 Lösungen und Medien

2.4.1. Lösungen für molekularbiologische Methoden

TAE-Puffer (10 x):	48,4 g Tris 11,42 g Essigsäure 20 ml 0,5 mM EDTA, pH 8,0 ad 1000 ml H ₂ O (MilliQ-Qualität)
Agaroselösung:	Für große Gele: 1 g Agarose (Molekularbiologie Qualität) 100 ml 1 x TAE-Puffer In der Mikrowelle aufkochen, anschließend abkühlen lassen

10 µl Ethidiumbromid hinzugeben

Für kleine Gele:

0,4 g Agarose (Molekularbiologie Qualität)

40 ml 1 x TAE-Puffer

In der Mikrowelle aufkochen, anschließend abkühlen lassen

5 µl Ethidiumbromid hinzugeben

2.4.2. Lösungen für biochemische Methoden

2.4.2.1. SDS-PAGE

SDS-Laufpuffer: 100 mM Tris (ohne pH-Einstellung)

100 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

Zelllyse-Puffer: 2 mM Bis-Tris

0,1 mM EDTA

0,5 mM DTT

9 mM NaCl

1 µg/ml Pepstatin A

10 µg/ml PMSF

10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin

16 µg/ml Benzamidin

Laemmli-Probenpuffer: 5 x konzentriert

312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

250 mM DTT

10 % (w/v) SDS

50 % (v/v) Glycerin

0,025 % (w/v) Bromphenolblau

2.4.2.2. Western Blot

TBS: 140 mM NaCl

8 mM KCl

25 mM Tris, pH 7,5

TBS-T: TBS mit 0,5 % (v/v) Tween 20

TBS-T 3 % BSA: TBS-T mit 3 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA)

ECL-Lösung: ECL-Lösung 1 (Peroxidsalzlösung) und
ECL-Lösung 2 (Luminol und Verstärker)
im Verhältnis 1:1 mischen

2.4.2.3. sGC-Aktivitäts-Assays

Isoliertes Enzym

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 MgCl₂
12,5 mM Creatinphosphat
31,25 U/ml Creatinphosphokinase

Substratlösung: 200 µM GTP mit ca. 100.000 cpm [α -³²P]-GTP je Ansatz

cGMP-Readout-System

Cafty Calcium-freie Tyrode (PAA, Paching, Österreich)

Coelenterazin-Lösung 5 mg/ml Coelenterazin (pjk, Kleinblittersfeld) in DMSO
30 µM Gluthation

IBMX-Lösung 500 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthine in DMSO

CaCl₂-Lösung 1 M CaCl₂ in H₂O

cGMP-RIA

Stimulationspuffer 2 mM Pyruvat
30 U/ml Superoxiddismutase
10 µg/ml Katalase
500 µM L-Glutamin
25 mM HEPES
5 mM Glukose
0,15 % (w/v) BSA

1 mM MgCl₂
0,5 mM IBMX
2 mM L-Arginin
in Ringerlösung, pH 7,4 (Sigma)

2.4.2.4. sGC-Rezeptorbindungsstudien

Beschichtungslösung: 0,5 % (w/v) PVP (360 kDa)
0,1 % (v/v) Tween-20
Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,2
100 mM NaCl
5x Inkubationspuffer: 250 mM TEA/HCl, pH 7,5
500 µM EDTA
5 mM DTT
15 mM MgCl₂
IgG-Puffer: 1 % IgG in 1x Inkubationspuffer
PEG-Puffer: 35 % PEG 8000 in 1x Inkubationspuffer

2.4.3. Medien und Lösungen für die Zellkultur

E. Coli: LB-Broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
SOC-Medium (Invitrogen)
Ampicillin (Sigma)
Kanamycin (Invitrogen)
Agarplatten: 15 g Agar
1 l LB-Broth
In der Mikrowelle aufkochen und abkühlen lassen. 1000 µl Ampicillin (100 mg/ml) bzw. 1000 µl Kanamycin (50 mg/ml) hinzupipettieren und die Agarlösung in sterile Petrischalen geben (Greiner Bio-One, Frickenhausen).
cGMP-Reporterzelllinie: MEM Alpha-Medium (Best.-Nr.: 22571-020, Invitrogen)
FCS (Best.-Nr.: 10500-064, Invitrogen)
L-Glutamin 200 mM (Best.-Nr.: 25030-024, Invitrogen)
Zeocin 100 mg/ml (Best.-Nr.: 801935, Invitrogen)
Cell-Dissociation Buffer (Best.-Nr.: 13150-016, Invitrogen)
Endothelzellen: Medium:
Medium 199 mit Earl's Salzen, L-Glutamin, 25 mM HEPES, L-Aminosäuren (Best.-Nr: 22340-020, Invitrogen)

Amphotericin B 250 µg/ml (Best.-Nr.: 15290-026, Invitrogen)
 Penicillin/ Streptomycin 500 U/ml (Best.-Nr.: 15070-063, Invitrogen)
 Kanamycin 1000 µg/ml (Best.-Nr.: 15160-047, Invitrogen)
 Gentamycin 50 mg/ml (Best.-Nr.: 15750-045, Invitrogen)
 Trypsin/EDTA 0,05 % (Best.-Nr.: 25300-054, Invitrogen)
 Waschpuffer:
 500 ml Dulbecco's PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (Best.-Nr.: D8537, Sigma, Steinheim)
 2,5 µg/ml Amphotericin B
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
 0,05 µg/ml Kanamycin
 0,05 µg/ml Gentamycin
 Kollagenaselösung:
 100 ml Endothelzellen-Medium
 140 mg Kollagenase Typ CLSII (Best.-Nr.: C3-28, Biochrom, Berlin)

2.5 Plasmide

Verwendung	Bezeichnung	Referenz	Selektionsmarker
Vektor zur Expression der α_1 -sGC-Untereinheit	pcDNAI/Amp- α_1 -sGC	Invitrogen, Becker <i>et al.</i> , 1999	AmpR
Vektor zur Expression der β_1 -sGC-Untereinheit	pRC/CMV- β_1 -sGC	Invitrogen, Becker <i>et al.</i> , 1999	AmpR
Vektor zur Generierung des „Entry Clones“ für Gateway™ Cloning	pENTR/D-TOPO	Invitrogen	KanR
Vektor zur Generierung des N-terminalen Lumio™-tags	pcDNA6.2/nLumio-DEST	Invitrogen	AmpR
Vektor zur Generierung des C-terminalen Lumio™-tags	pcDNA6.2/cLumio-DEST	Invitrogen	AmpR

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von 1:50 verdünnten DNA-Lösungen wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm (Biophotometer, Eppendorf) in Einwegküvetten (Uvette, Eppendorf) bestimmt.

2.6.2. Mutagenese

Die Mutationen der β_1 -sGC-Untereinheit wurden mit dem QuickChangeTMXL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Als Template wurden jeweils 20 ng des zu mutierenden Plasmids eingesetzt und eine Elongationszeit von 1 min je kb Plasmid gewählt. Die für die Mutationen verwendeten Primer (Tabelle 1) wurden bei Eurofins (Ebersberg) bestellt.

2.6.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, abgekühlt und mit Ethidiumbromid versetzt (siehe 2.4.1). Die DNA-Proben wurden mit 6 x Gel-ladepuffer (Fermentas, Leon-Rot) gemischt, aufgetragen und bei einer Spannung von 80 bis 100 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde eine 500 bp-Leiter (500 bp ladder, Invitrogen) benutzt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht auf einem Gelscanner (GelDoc 2000, BioRad, München) mit der Software Quantity One (Version 4.23, BioRad).

β_1 H105F	5'-gcagaacctcgacgcctgt <u>tc</u> gaccacctcgccacc-3'
β_1 Y135A/R139A TC4-Y135A/R139A	5'-gcaaagggctcattctgcacgc <u>ct</u> actcggaagcagaggggc-3'
TC aa243-248 β_1 L243C β_1 Q244G β_1 K247C	5'-cagagtgtccccagtgccagcctgggaagtgcagccttctgtctgtc-3' 5'-cagagtgtccccagtgctgc <u>ct</u> gggaagtgcagccttctgtctgtc-3' 5'-cagagtgtccccagtgctgc <u>ct</u> gggtgctgcagccttctgtctgtc-3'
TC aa239-244 (TC4) β_1 V239C β_1 L240C β_1 Q242G β_1 L243C β_1 Q244C	5'-gaaatgctatctacagatgc <u>ct</u> ccccagctccagcctgggaagtgcagcc-3' 5'-ggaaatgctatctacagatgctgc <u>ct</u> ccccagctccagcctgggaagtgcagcc-3' 5'-ggaaatgctatctacagatgctgccccgggctccagcctgggaagtgcagcc-3' 5'-ggaaatgctatctacagatgctgccccgggtgc <u>ct</u> ccccagcctgggaagtgcagcc-3' 5'-ggaaatgctatctacagatgctgccccgggtgctgc <u>ct</u> ccccagcctgggaagtgcagcc-3'
TC aa257-262 β_1 V257C β_1 R258C β_1 H260G β_1 I261C β_1 D262C	5'-ctgtctgtcttctctgtg <u>cc</u> gcctcatattgacatcagttccacggg-3' 5'-ctgtctgtcttctctgtgctgc <u>ct</u> catattgacatcagttccacggg-3' 5'-ctgtctgtcttctctgtgctgc <u>ct</u> ggtattgacatcagttccacggg-3' 5'-ctgtctgtcttctctgtgctgc <u>ct</u> ggtgcatcagttccacggg-3' 5'-ctgtctgtcttctctgtgctgc <u>ct</u> ggtgctgc <u>ct</u> catcagttccacggg-3'
TC aa170-175 β_1 R170C β_1 S171C β_1 E172P β_1 E173G β_1 E175C	5'-ggttattcagcaatgtagtgagaagtgtgatcatacccaattttaattg-3' 5'-ggttattcagcaatgttgaagaagtgtgatcatacccaattttaattg-3' 5'-ggttattcagcaatgtgtccagaaagtgtgatcatacccaattttaattg-3' 5'-ggttattcagcaatgtgtccagcatgtgatcatacccaattttaattg-3' 5'-ggttattcagcaatgtgtccagcatgtgcatatacccaattttaattg-3'
TC aa111-116	5'-gaccacctcgccacctgctg <u>cc</u> agggtgctg <u>cc</u> gaccttctccgggtg-3'
TC C-tag Zusätzliches M β_1 C-6 β_1 C-5 β_1 G-3 β_1 C-2 β_1 C-1	5'-cgaaattaatacgactcatgatagggagaccaagcttggtacc-3' 5'-cgactcatgatatgttagaccaagcttggtaccgagctc-3' 5'-ctcatgatatgttgc <u>cc</u> aaagcttggtaccgagctc-3' 5'-ctcatgatatgttgtcccgggcttggtaccgagctc-3' 5'-ctcatgatatgttgtcccgggtgtggtaccgagctcggatc-3' 5'-tcatgatatgttgtcccgggtgtg <u>ct</u> accgagctcggatc-3'

Tabelle 1: Für die Mutagenese verwendete Primer. Die mutierten Basen sind unterstrichen. Da die verwendeten Primer revers-komplementär waren, sind nur die Forward-Primer aufgelistet. TC: Tetracystein.

2.6.4. Transformation von *E.coli*

Zur Plasmidgewinnung wurden 10 pg bis 100 ng der jeweiligen Plasmid-DNA nach Herstellerangaben in OneShot[®]TOP10 (Invitrogen) chemisch kompetente Zellen wie folgt transformiert.

- 1 Portion der *E.coli* auftauen
- 10 pg bis 100 ng DNA in 1 bis 5 µl hinzugeben
- 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock: 30 s 42°C, 2 min auf Eis
- 250 µl SOC-Medium hinzugeben
- 1 h bei 37°C und 300 rpm inkubieren
- 150 µl der Transformationslösung auf Agarplatten mit dem jeweiligen Selektionsmarker ausstreichen
- Platten über Nacht bei 37°C inkubieren

2.6.5. Plasmidpräparation

Von jeder Mutagenese wurden 3 bis 5 Klone von der Agarplatte gepickt und eine 2 ml Flüssigkultur (LB-Medium mit jeweiligem Selektionsmarker) angeimpft und für 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two Kit (Invitex, Berlin) nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Mutationen wurden mittels Sequenzierung (Invitex, Berlin) überprüft. Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurden 200 ml Flüssigkulturen mit einem sequenzierten Klon oder aus einem Glycerolstock (800 µl Bakterienkultur + 200 µl Glycerol 87 %) angeimpft. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurde die Plasmid-DNA mit dem Qiaprep[™] Spin Maxi Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die Konzentration wurde auf 1 µg/µl eingestellt.

2.6.6. Klonierung mittels der Gateway[™] Technologie

Um die β_1 -sGC-Untereinheit N- oder C-terminal mit dem Lumio[™] Tag (Tetracystein (TC)-Motiv aus CCPGCC) zu versehen wurde das Gateway[™] System (Invitrogen) verwendet. Im ersten Schritt wurde ein sogenannter „Entry“-Vektor mit der für die β_1 -Untereinheit kodierenden Sequenz erstellt. Die β_1 -sGC wurde dazu mit den Primern β_1 4TOPO_F 5'-caccatgtacgggtttgtgaac-3' und β_1 4TOPO_R 5'-gttttcatcctggtttgttcctc-3' amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels der Topoisomerase I vermittelten TOPO[®]-Cloning Reaktion in den pENTR/D-TOPO Vektor kloniert (Cheng und Shuman, 2000).

Die korrekte Insertion der β_1 -sGC in den TOPO-Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft. Mit Hilfe der LR-Rekombinationsreaktion, die sich die gerichtete Rekombination des Lambda-Bakteriophagens zu Nutze macht (Landy, 1989), wurde die β_1 -sGC vom pENTR/D-TOPO-Vektor in den pcDNA6.2/cLumio-DEST für das C-terminale Tag oder in den pcDNA6.2/nLumio-DEST für das N-terminale Tag kloniert. Die Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft.

2.6.7. Transiente Kotransfektion der sGC-Untereinheiten in die cGMP-Reporterzelllinie

cGMP-Readout-System

Am ersten Tag wurden cGMP-Reporterzellen mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Well in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Am zweiten Tag wurden die Zellen nach folgendem optimierten Protokoll mit den jeweiligen α_1 -sGC und β_1 -sGC-Expressionsvektoren (siehe 2.5) transient transfiziert. Dazu wurden die Transfektionsreagenzien LipofectaminTM und PlusTM (Invitrogen) benutzt.

DNA-Lösung	1 Well	96er Platte
α_1 -sGC :	18,75 ng	1,8 μ g
β_1 -sGC:	18,75 ng	1,8 μ g
Opti [®] MEM I:	2,5 μ l	240 μ l
Plus TM -Reagenz:	0,125 μ l	12 μ l
<hr/>		
Mischen		
Komplexierung der DNA mit dem Plus TM -Reagenz 15 min bei RT		
Lipofectamin TM -Lösung	1 Well	96er Platte
Lipofectamin TM :	0,8 μ l	75 μ l
Opti [®] MEM I:	11,7 μ l	1120 μ l
<hr/>		
Lipofectamin TM -Lösung zur DNA/Plus TM -Lösung geben und mischen		
Komplexierung der DNA mit Lipofectamin TM 30 min bei RT		
<hr/>		
Verdünnung mit Opti [®] MEM I-	1 Well	96er Platte
Medium		
Opti [®] MEM I:	93,8 μ l	9 ml
<hr/>		
Medium aus den 96er Platten entfernen		
100 μ l der Transfektionslösung je Well pipettieren		
3 h bei 37°C inkubieren		
Transfektionsmedium entfernen		
100 μ l Kulturmedium ohne Selektionsmarker je Well zugeben		

Um eine ausreichende transiente Expression des Enzyms zu gewährleisten, wurden die Zellen für 24 h in Kulturmedium ohne Selektionsmarker inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Danach wurden die Zellen zur Messung des cGMP-Gehaltes vorbereitet (siehe 2.7.6).

Western Blot

6x10⁵ cGMP-Reporterzellen wurden in 2 ml Medium in ein Well einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und nach dem oben beschriebenen Protokoll am zweiten Tag transfiziert. Folgende Mengen wurden pro Well eingesetzt: 0,75 µg α₁-sGC-Plasmid, 0,75 µg β₁-sGC-Plasmid, 2,5 µl PlusTM Reagenz und 23,3 µl LipofectaminTM in 2 ml Opti[®]MEM I. Am dritten Tag wurden die Proteine aufgearbeitet (siehe 2.7.2).

Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Am ersten Tag wurden 2x10⁴ cGMP-Reporterzellen pro Well eines LabTekTMII Kammer-Zellkulturobjektträgers ausgesät und nach 24 h transient transfiziert. Es wurde LipofectaminTM2000 (Invitrogen) verwendet, da es in Vortests im Vergleich zu anderen Transfektionsreagenzien eine höhere Transfektionseffizienz zeigte.

0,5 µl LipofectaminTM2000 in 58 µl Opti[®]MEM I verdünnen und 5 min bei RT inkubieren

0,5 µg α₁-sGC und 0,5 µg β₁-sGC in 58 µl Opti[®]MEM I mischen und zu der LipofectaminTM2000-Lösung geben

Die Mischung 20 min bei RT inkubieren und 115 µl in das Well gegeben

Nach 4 h Inkubation bei 37°C das Transfektionsmedium gegen Kulturmedium ohne Zeocin tauschen

Die Zellen wurden am dritten Tag für die konfokale Laserscanning Mikroskopie vorbereitet (siehe 2.9).

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte durch ein Farbreagenz (Protein Assay, BioRad, München), basierend auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976). 10 µl Probe wurden mit 200 µl Farbstofflösung in einer 96-Well-Platte gemischt und 10 min bei RT zur stabilen Ausbildung des Farbstoff-Protein-Komplexes inkubiert. Im ELISA-

Reader wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen und die Werte gegen eine BSA-Eichgerade kalibriert.

2.7.2. Gesamtprotein-Extraktion

Zur Analyse der sGC-Proteinexpression wurden die Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen transient transfiziert (siehe 2.6.7) und mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in jedes Well wurden 50 μ l Zellysepuffer (siehe 2.4.2) gegeben. Die Zellen wurden von den 6-Well-Zellkulturplatten mit einem Zellschaber abgelöst und jeweils 3 Wells wurden in einem Reaktionsgefäß gepoolt. Durch Ultraschallbehandlung (30 s) wurden die Zellmembranen zerstört. Die löslichen Proteine wurden mittels Zentrifugation (60 min, 4°C, 13.000 rpm) von unlöslichem Zelldebris getrennt. Die Konzentration der im Überstand befindlichen Gesamtproteine wurde mittels Bradford-Assay (siehe 2.7.1) bestimmt und auf 0,5 μ g/ μ l oder 1 μ g/ μ l eingestellt, damit gleiche Proteinmengen in der Gelelektrophorese (siehe 2.7.3) aufgetrennt werden konnten.

2.7.3. Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Für die Untersuchung von Proteinen wurden diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamid Minigele nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. SDS bewirkt die Entfaltung der Proteine und maskiert deren Eigenladung, wodurch eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von Faltung und Ladung möglich ist. Glycin wird in diesem System als Trägerion eingesetzt. Es wurden 10 %ige Tris-Glycin Gele (ProGel, Anamed, Darmstadt) verwendet. Das Gel wurde in der vertikalen Kammer des Gelsystems X Cell Sure Lock (Invitrogen) fixiert und die Kammer wurde mit Laufpuffer (siehe 2.4.2) befüllt. Die Proteinproben wurden mit Laemmli-Probenpuffer (siehe 2.4.2) versetzt und anschließend 5 min bei 95°C denaturiert. Unlösliche Proteine und Zellbestandteile wurden unmittelbar vor dem Auftragen abzentrifugiert (10.000 rpm, 3 min). 30 μ g Protein wurden pro Bahn aufgetragen und bei 200 V für 90 min im Kühlraum aufgetrennt.

2.7.4. Western Blot

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach einer von Towbin entwickelten Methode auf eine Nitrocellulose-Membran passender Größe transferiert

(Towbin *et al.*, 1992). Dazu wurde das iBlot[®] Dry Blotting System (Invitrogen) mit iBlot[®] Western Detection Stacks (Regular; Invitrogen) verwendet. Das Gel wurde auf den unteren Stack mit der mitgelieferten Membran gelegt, mit einem mit Wasser befeuchteten Filterpapier und anschließend mit dem oberen Stack abgedeckt. Die Proteine wurden innerhalb von 6 min auf die Membran geblottet und konnten anschließend wie unter 2.7.5 beschrieben detektiert werden.

2.7.5. Immundetektion

Die von Harlow und Lane (1988) entwickelte Methode des „Immuno-Sandwich-Assays“ basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierzu wurde die Nitrocellulose-Membran nach erfolgtem Proteintransfer 60 min bei RT in TBS-T/3 % (w/v) BSA, zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen, inkubiert. Die sGC-Untereinheiten wurden mit polyklonalen Antikörper separat detektiert. Der Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit (Sigma) wurde 1:2.000, der Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit 1:750 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) in TBS-T/3 % (w/v) BSA verdünnt. Aktin wurde als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung mit einem 1:8.000 verdünnten Antikörper (Sigma) nachgewiesen. Die Membran wurde nach der Blockierung mit BSA über Nacht bei 4°C im Rundumschüttler mit der jeweiligen Antikörperlösung inkubiert und anschließend dreimal in TBS-T gewaschen (5 min), um überschüssigen Erstantikörper zu entfernen. Der biotinylierte Zweitantikörper, anti-Kaninchen-IgG-Biotin (Vectastain ABC Kit, Vectorlabs, Wiesbaden) für α_1 -sGC und anti-Kaninchen-IgG biotinyliert (Dako, Glostrup, Denmark) für die β_1 -sGC, wurde 1:250 bzw. 1:2.000 in TBS-T verdünnt und die Membran 60 min darin inkubiert. Nach dreimaligen Waschen (5 min) mit TBS-T wurde die Membran 60 min in einer Lösung aus 1:222 verdünntem Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (Vectastain ABC Kit, Vectorlabs, Wiesbaden) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 30 min in TBS ohne Tween gewaschen. Tween wurde in diesem Schritt nicht mehr zugesetzt, um den Hintergrund zu verringern. Durch die Zugabe von ECL-Reagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde Chemilumineszenz erzeugt. ECL Hyperfilme[™] (Amersham Biosciences, Freiburg) wurden in der Dunkelkammer auf die Membran gelegt und durch die Chemilumineszenz konnten die Proteinbanden detektiert werden. Die Filme wurden am Densitometer eingescannt und mit Hilfe der Software Quantity-One (BioRad, München) ausgewertet.

2.7.6. sGC-Aktivitäts-Assays

Isoliertes Enzym

Nach einer von Hönicka entwickelten Methode wurde die Aktivität der isolierten sGC über die Bildung von $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ zu $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$ gemessen (Hönicka *et al.*, 1999). Die sGC-Präparation wurde gegebenenfalls, je nach spezifischer Aktivität, vor dem Assay in Probenpuffer verdünnt. Um die Aktivität hämfreier sGC-Präparationen zu bestimmen, wurde das Enzym in Probenpuffer (siehe 2.4.2.3) mit 0,5 % Tween-20 inkubiert, was zu einem Verlust der prosthetischen Hämgruppe führt (Hönicka *et al.*, 1999). Um eine Rekonstitution der sGC während des Testes zu verhindern, wurde dem Inkubationspuffer ebenfalls 0,5 % Tween-20 hinzugefügt.

Assayansatz:

- 40 μl Inkubationspuffer
- 20 μl sGC-Präparation
- 20 μl Substanzlösung
- 20 μl Substratlösung

Alle Bestandteile, außer der Substratlösung, wurden auf Eis zusammenpipettiert und anschließend für 3 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl radioaktiver GTP-Substratlösung gestartet und nach weiterer Inkubation für 10 min bei 37°C durch Zugabe von 400 μl Zinkacetat (100 mM) und 500 μl Natriumcarbonat (120 mM) gestoppt. Zinkcarbonat bildet mit nicht umgesetzten GTP einen weißen Niederschlag der im Anschluss abzentrifugiert wurde (5 min, 2.800 rpm, 4°C). Um in der Probe verbliebenes GTP abzutrennen, wurde der Überstand über eine mit Tris-HCl (100 mM, pH 7,5) äquilibrierte Aluminiumoxidsäule (Säulenbett: 1 ml) chromatographiert. Das gebildete cGMP wurde mit 10 ml Tris-HCl (100 mM, pH 7,5) mit einer Ausbeute von 60 % eluiert und in 20 ml Szintillationsgefäßen aufgefangen und mit Szintillator versetzt. Im Anschluss wurde die Aktivität der Proben in einem Flüssigkeits-Szintillations-Counter gemessen und die spezifische Aktivität der Proben nach folgender Gleichung bestimmt:

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

W = Wiederfindungsrate (0,6)

P = Enzymmenge (μg)

t = Zeitdauer des Assays (min)

cGMP-Readout-System

Ein intrazelluläres cGMP-Messsystem wurde durch stabile Transfektion einer CHO-Zelle mit Aequorin, einem Protein der pazifischen Leuchtqualle *Aequorea forskalea*, und dem Calcium-leitenden cyclischen Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal CNG2A generiert (Wunder *et al.*, 2005). Das Messsystem dieser cGMP-Reporterzellen beruht darauf, dass Aequorin in Gegenwart seiner Kofaktoren Coelenterazin und Calcium eine messbare Biolumineszenz emittiert, die direkt proportional zur intrazellulären cGMP-Konzentration ist. Die cGMP-Reporterzellen wurden mit den kodierenden Plasmiden für die α_1 -sGC und die Wildtyp oder mutierten β_1 -sGC Untereinheiten transient oder stabil kotransfiziert (siehe 2.6.7). Je nach Fragestellung wurden die Zellen für 24 h mit 10 μ M ODQ oder 90 min mit NS 2028 oder Rotenon vorinkubiert. Die Zellen wurden vor der sGC-Aktivitätsmessung für 3 h mit Coelenterazin (Cafty mit 200 mM IBMX und 0,83 μ g/ml Coelenterazin) bei 37°C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurde die exprimierte sGC durch Zugabe der zu testenden Substanz für 10 min bei RT stimuliert. Durch Zugabe von 10 mM Calciumchlorid-Lösung in einer lichtdichten CCD-Kamera wurde die Biolumineszenz initiiert und über einen Zeitraum von 60 s aufgenommen. Mit diesem Testsystem konnte der Einfluss von Mutationen oder Vorinkubationen mit Oxidantien auf die Aktivierbarkeit des Enzyms durch sGC-aktivierende Substanzen untersucht werden.

Messung des cGMP-Gehaltes mittels Radioimmuno-Assay (RIA)

Die cGMP-Konzentrationen in primären Schweineendothelzellen wurde mittels eines kommerziell erhältlichen RIA-Kits (IBL, Hamburg; Stasch *et al.*, 2002c) gemessen. Dazu wurden die Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert, für 24 h mit 10 μ M ODQ oder Vehikel inkubiert und vor dem Test zweimal mit Ringer-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden anschließend 30 min mit verschiedenen Konzentrationen BAY 58-2667, HMR1766 oder Zn-PPIX oder für 15 min mit verschiedenen Konzentrationen BAY 41-2272 inkubiert. Die Substanzen waren in Stimulationspuffer gelöst. Nach der Inkubation wurde der Puffer abgenommen und die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l eiskalter Ethanol:Ringer-Lösung (10:1) gestoppt. Die Platten wurden anschließend zur Kryoextraktion von cGMP bei -20 °C eingefroren und getrocknet. Die cGMP-Konzentration wurde schließlich mit dem RIA-Kit nach Herstellerangaben gemessen. Dazu wurden die Zellrückstände in den Kulturplatten in 500 μ l cGMP-Puffer pro Well resuspendiert und 100 μ l davon unverdünnt in den RIA eingesetzt.

2.7.7. Rezeptorbindungsstudien

Homologe und heterologe Kompetitionsbindungsstudien wurden nach dem Protokoll von Schmidt *et al.* (2003) durchgeführt. Die Trennung von gebundenem und freiem radioaktiven Liganden erfolgte hierbei mittels Vakuumfiltration über 96-Well-Glasfaserfilterplatten (Multiscreen[®]HTS, FB, Millipore, Billerica, MA, USA). Die Filter wurden mit PVP beschichtet, um die unspezifische Bindung von ³H-BAY 58-2667 auf unter 1 % der eingesetzten Radioaktivität zu reduzieren. Die Glasfaserfilterplatten wurden dazu mit 200 µl PVP-Beschichtungslösung (siehe 2.4.2.4) pro Well befüllt und für mindestens 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Wells 6-mal mit 200 µl eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Zur Erstellung einer homologen Verdrängungskurve wurden 10⁻⁷ M ³H-BAY 58-2667 mit 10⁻¹¹ M bis 10⁻⁴ M BAY 58-2667 inkubiert. Heterologe Verdrängungskurven wurden durch Inkubation von 10⁻⁷ M ³H-BAY 58-2667 mit 10⁻¹¹ M bis 10⁻⁴ M HMR1766 bzw. 10⁻¹¹ M bis 3 x 10⁻⁶ M Zn-PPIX erstellt. Zur schnellen Einstellung eines Gleichgewichts, aus Assoziation und Dissoziation des sGC-Aktivators an das Enzym, wurden radioaktiver und nicht-radioaktiver Ligand 10-fach konzentriert vorher zusammen in Acetonitril (ACN):H₂O (60:40) angesetzt und gemeinsam in den jeweiligen Ansatz pipettiert („Ligandenmix“). Die Zusammensetzung einer Probe war wie folgt:

20 µl 5 x Inkubationspuffer, pH 7,5

1 µl sGC (1 µg/µl)

69 µl H₂O

10 µl Ligandenmix

Zur Einstellung eines Bindungsgleichgewichtes wurden die Proben 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend für weitere 10 min auf Eis gekühlt. Die Fällung der sGC erfolgte durch Zugabe von 15 µl eiskaltem IgG-Puffer (0,75 µg/µl IgG im Ansatz) und anschließender Präzipitation durch Zugabe von 85 µl eiskaltem PEG-Puffer gefolgt von 30 min Inkubation auf Eis. Das präzipitierte Protein wurde auf die Filterplatte gegeben, ungebundener Ligand durch Anlegen eines Vakuums abgesaugt und die Proben wurden zweimal mit eiskaltem 1 x Inkubationspuffer gewaschen. Die Filter wurden anschließend aus der Platte entfernt und für 1 h in 500 µl ACN:H₂O (60:40) bei 35°C und 1.000 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Diese Lösungen wurden dann mit den Filtern in 20 ml Szintillationsgefäße 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.

Die unspezifische Bindung wurde durch die Zugabe von 1.000-fachem Überschuss an nicht radioaktiv-markiertem BAY 58-2667 in jedem Assay gemessen und von den Total-Werten abgezogen.

2.8 Zellkultur

2.8.1. Prokaryotische Zellen

Der *E.coli* Stamm OneShot®TOP10 (Invitrogen) wurde für die Transformation von Plasmiden und die Vermehrung von DNA verwendet. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten (siehe 2.4.3).

2.8.2. Eukaryotische Zellen

cGMP-Reporterzellen

Zur Untersuchung des Aktivitätsprofils der sGC-Mutanten und der TC-Motiv-Konstrukte wurde eine auf CHO-Zellen basierende cGMP-Reporterzelllinie verwendet (Wunder *et al.*, 2005). Das Medium für die Reporterzelle war folgendermaßen zusammengesetzt:

500 ml Alpha-MEM-Medium

10 % FCS

1 % L-Glutamin

0,25 mg/ml Zeocin

Bei stabil transfizierten Zellen wurde außerdem 2 % Geneticin hinzugefügt

Sterilfiltration mit einem 0,22 µm Sterilfilter

Die Zellen wurden alle drei Tage mit Zelldissoziationspuffer aus den 175 cm²-Kulturfalschen abgelöst, 1:10 in Medium verdünnt und in neue Flaschen passagiert.

cGMP-Reporterzellen, die stabil mit WT-sGC transfiziert waren, werden im Weiteren WT-sGC-cGMP-Reporterzellen genannt. cGMP-Reporterzellen, die stabil mit α_1 WT- und β_1 Y135A/R139A-sGC transfiziert waren, werden im Folgenden Y135A/R139A-sGC-cGMP-Reporterzellen genannt. cGMP-Reporterzellen, die stabil mit α_1 WT- und β_1 H105F-sGC transfiziert waren, werden hier H105F-sGC-cGMP-Reporterzellen genannt.

Primäre Schweinendothelzellen

Primäre Schweinendothelzellen wurden aus frischen Schweineaorten gewonnen (Stasch *et al.*, 2002a). Dazu wurden die Aorten von umgebendem Gewebe frei präpariert, entlang der Gefäßansätze aufgeschnitten und mit der Intima nach oben in ein Gestell (Eigenbau, Bayer Schering Pharma, Wuppertal) eingespannt und mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 20 ml einer sterilen 0,14 %igen Kollagenase-Lösung (Biochrom, Berlin) auf die luminale Oberfläche der Aorten gegeben und nach 15 min Inkubation bei RT konnten die Endothelzellen von der Oberfläche abgekratzt werden. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz bei 37°C und 5 % CO₂ mit folgendem Medium kultiviert:

500 ml Medium 199 mit Earle´s Salzen (Invitrogen) mit
25 mM HEPES
10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS
100 U/ml Penicillin / Streptomycin
0,05 mg/ml Kanamycin
0,05 mg/ml Gentamycin
Sterilfiltration mit einem 0,22 µm Sterilfilter
2,5 µg/ml Amphotericin B (nach der Filtration zugeben)

Zum Passagieren wurden die Zellen mit 10 ml Trypsin/EDTA abgelöst, im Verhältnis 1:5 gesplittet oder in 24-Well-Platten ausgesät.

2.9 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde 1955 von Marvin Minsky entwickelt und wird unter anderem zur Detektion fluoreszierender Proteine auf zellulärer Ebene verwendet (Minsky, 1988). Für die Messung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen in LabTek™II Kammer-Zellkulturobjektträgern (NuncNalgene, Naperville, IL, USA) kultiviert und transient mit der α_1 -sGC-Untereinheit und den jeweiligen TC- β_1 -sGC-Untereinheit-Konstrukten transfiziert (siehe 2.6.7). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit FIAsh oder ReAsH gelabelt (siehe 2.9.1) und die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen wurde gemessen (siehe 2.9.2).

2.9.1. Fluoreszenzlabeling der TC-sGC mit den Farbstoffen FIAsH und ReAsH

Die biarsenischen Farbstoffe FIAsH und ReAsH wurden als 2 mM Stocklösungen bezogen (Invitrogen). Das Labeling der transfizierten Zellen (siehe 2.6.7) mit FIAsH und ReAsH erfolgte nach einem optimierten Protokoll nach Zürn *et al.* (2009). Um eine vollständige Komplexierung der Farbstoffe mit 1,2-Ethandithiol (EDT) zu gewährleisten wurde eine Portion des Farbstoffes für 10 min bei RT mit 25 mM EDT vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen dreimal mit „Hank's buffered salt solution“ (HBSS; ohne Phenolrot, Invitrogen) mit 1 g/l Glukose gewaschen und 100 µl HBSS/Glukose wurden in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde die Farbstoff/EDT Mischung 1:100 in einem Zehntel des Volumens der benötigten Färbelösung in HBSS verdünnt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Diese Färbelösung wurde 1:10 in HBSS/Glukose verdünnt und jeweils 100 µl wurden in jedes Well pipettiert, wodurch eine finale Konzentration von 0,5 µM FIAsH bzw. ReAsH und 12,5 µM EDT erreicht wurde. Die Zellen wurden 1 h bei RT gelabelt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 250 µM EDT gewaschen, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit HBSS/Glukose gewaschen, um EDT zu entfernen.

2.9.2. Messung der residualen Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen wurde mit dem konfokalen Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss, Jena) gemessen, um zu untersuchen ob ein Verlust der Hämgruppe an der sGC zu einem Dequenching der Fluoreszenz von FIAsH oder ReAsH führt. FIAsH wurde mit 488 nm angeregt und bei 505 bis 545 nm detektiert (dazu wurde der Hauptfarbteiler für 488/543 nm und der NebenfARBteiler für 545 nm in Kombination mit einem Longpass Filter von 505 nm benutzt). ReAsH wurde mit 543 nm angeregt und dessen Fluoreszenz wurde über den Hauptfarbteiler für 488/543 nm und einen Longpass Filter von 560 nm detektiert. Für alle Messungen wurden die gleichen Einstellungen für Kontrast- und Rauschunterdrückung und ein Ölimmersions-Objektiv (63-fach) verwendet.

Die Fluoreszenzintensität wurde in einer Zeitreihe aus 120 Laserscans, die gleichmäßig über die Inkubationszeiten von 90 min verteilt waren, gemessen. Der Mittelwert aus den ersten drei Scans wurde als Startwert zur Berechnung der residualen Fluoreszenzintensität benutzt. Vor dem vierten Scan wurde das zu untersuchende Oxidanz (NS 2028 oder Rotenon) hinzugegeben und die Zellen wurden die verbleibenden 117 Scans mit der jeweiligen Substanz inkubiert. Durch Bleicheffekte

nahm die Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen über die Zeitreihe ab. Da die α und β Banden des Absorptionsspektrums der Hämgruppe mit dem Emissionsspektrum von FIASH überlappen (Abbildung 2), wurde die Hypothese erstellt, dass die Fluoreszenz von FIASH unter Kontrollbedingungen (also vor Zugabe des Oxidanz) von der Hämgruppe gequencht und dadurch vermindert würde. Nach Oxidation des zentralen Fe^{2+} und dem folgenden Verlust der Hämgruppe an der sGC, sollte die residuale Fluoreszenzintensität höher sein als bei unbehandelten Zellen mit hämhaltiger sGC. Die Bilder wurden mit einer integrierten Kamera aufgenommen und mit der LSM Image Software (Carl Zeiss, Jena) verarbeitet. Der Startwert wurde als 100 % gesetzt und die residuale Fluoreszenzintensität der behandelten und unbehandelten Zellen wurde berechnet.

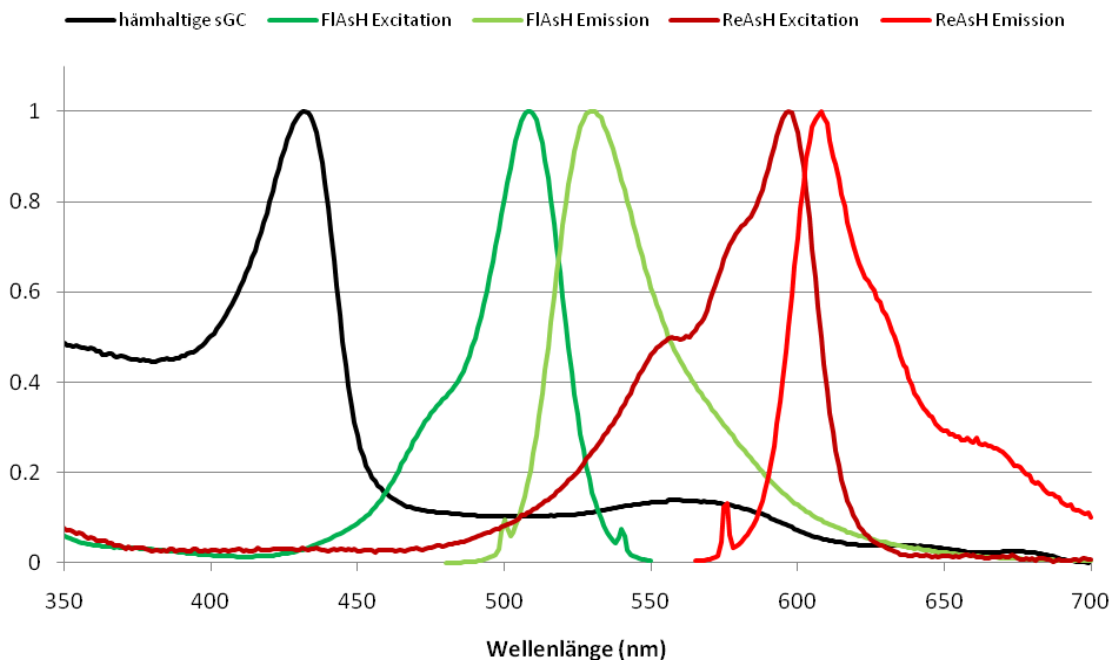


Abbildung 2: Spektren der biarsenischen Farbstoffe FIASH und ReAsH sowie der Fe^{2+} -hämhaltigen sGC. Die Daten der relativen Fluoreszenzintensität von FIASH und ReAsH wurden von der Webseite von Roger Tsien's Arbeitsgruppe (www.tsienlab.ucsd.edu/Documents) übernommen. Das Absorptionsspektrum der reduzierten sGC wurde von Schmidt et al. (2004) übernommen.

2.10 Ganzkörper-Autoradiographie

Die Ganzkörper-Autoradiographie von Ratten, denen ^{14}C -BAY 58-2667 intravenös (i.v.) verabreicht wurde, wurde nach Ullberg durchgeführt, modifiziert wie in Curtis et al. (1981) beschrieben. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mittels der Radioluminographie-Methode bestimmt (Maas et al., 2000; Steinke et al., 2000).

In **Studie A** wurden Wistar Kyoto Ratten (WKY/NHsd, Harlan, Paderborn) nach folgendem Schema behandelt:

	0 min	10 min	25 min
Tier 1 A	Placebo	BAY 58-2667	Versuchsende
Tier 2 A	ODQ	BAY 58-2667	Versuchsende

In **Studie B** wurden salzsensitive Dahl/ss Ratten (SS/JrHsdMcwiCrl, Charles River, Wilmington, MA, USA) verwendet und nach folgendem Schema behandelt:

		0 min	10 min	25 min
Tier 1 B	normotensiv	Placebo	BAY 58-2667	Versuchsende
Tier 2 B	normotensiv	ODQ	BAY 58-2667	Versuchsende
Tier 3 B	hypertensiv	Placebo	BAY 58-2667	Versuchsende
Tier 4 B	hypertensiv	ODQ	BAY 58-2667	Versuchsende

Den Tieren wurde 17 h vor Versuchsbeginn das Futter entzogen (*Wasser ad libitum*). Am Versuchstag wurden die Tiere mit 100 mg/kg Thiopental (Trapanal[®], 5 ml/kg, intraperitoneal) betäubt und in die rechte *Vena femoralis* wurde ein Katheter für die Substanzapplikation gelegt. In beiden Studien wurde ¹⁴C-BAY 58-2667 in Transcutol/Cremophor EL/PBS (10/10/80 v/v/v) gelöst und mit einer Dosis von 100 µg/kg (in 1 ml/kg) i.v. verabreicht. Die spezifische Aktivität von ¹⁴C-BAY 58-2667 betrug 3,6 MBq/mg und eine Radiodosis von 0,36 MBq/kg wurde erreicht. ODQ wurde in einer Lösung aus Glycerin/H₂O/PEG 400 (60/100/949=w/w/w) gelöst und mit einer Dosis von 2 mg/kg (in 0,1 ml/kg) i.v. gegeben.

Nach den oben angegebenen Zeiten wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation schmerzfrei getötet und in Dichlormethan (Sigma) bei -70°C eingefroren. Die Körper wurden dann mit Röhrchen als Platzhalter für interne Kalibrationsstandards in Carboxymehtylcellulose (50 g/l) eingebettet und bei -70°C gelagert. Nach Entnahme der Röhrchen wurden die Kalibrationsstandards in die Vertiefungen eingefüllt und die eingebetteten Tierkörper wurden bei -25°C gelagert. Die Standards werden zur Kalibrierung der Radioluminographie benötigt und aus Blut hergestellt, das eine mittlere, gewebespezifische Selbstabsorption für β-Radioaktivität aufweist. Zur Herstellung der Standards wird dasselbe Isotop wie in der Studie verwendet und hohe, mittlere und niedrige Konzentrationen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in Blut hergestellt.

50 µm dicke, sagittale Ganzkörperschnitte wurden mit einem Gefriermikrotom (CM 3600, Leica Microsystems, Nussloch) angefertigt, auf Folie geklebt (Filmolux® 609, Neschen, Bückeberg), mit BandAid® (Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt) fixiert und gefriergetrocknet. Dabei sollten die verschiedenen Organe, Drüsen und Gewebetypen möglichst auf drei verschiedenen Schnitten vorhanden sein, damit 2 bis 3 Messungen durchgeführt werden konnten. Zur Detektion der Radioaktivität wurden die Schnitte 14 Tage auf Imaging Platten (BAS-SR 2025, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) gelegt. Die Platten enthalten Europium-aktivierte Barium-Fluorobromid-Kristalle, welche die radioaktive Energie der durch den radioaktiven Zerfall von ¹⁴C-BAY 58-2667 ausgesendeten β-Teilchen aufnehmen und speichern. Die Platten wurden mit einem Laserscanner (BAS 5000, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) ausgelesen und die Daten wurden mit der AIDA-Software (AIDA, Version 3.5, Raytest, Straubenhardt) analysiert. Dabei wurden die zu analysierenden Organe mit sogenannten „regions of interest“ (ROI) markiert und die radioaktive Organkonzentration wurde anhand der internen Standards ermittelt. Die Hintergrundradioaktivität wurde ebenfalls gemessen und von allen Werten abgezogen. Die Daten wurden in äquivalente Konzentrationen bezogen auf das Organgewicht (µg-eq/g) angegeben.

2.11 Langzeitstudie mit BAY 58-2667 an salzbelasteten Dahl/ss Ratten

7 Wochen alte Dahl/ss Ratten (SS/JrHsdMcwiCrI, Charles River, Wilmington, MA, USA) wurden nach ihrem Körpergewicht randomisiert in 2 Gruppen aufgeteilt. Die Placebogruppe (n=20) erhielt eine Hochsalzdiät mit 8 % NaCl. Die Tiere der BAY 58-2667-Gruppe (n=17) erhielten zusätzlich 1000 ppm BAY 58-2667 im Futter der Salzdiät. Dies entspricht einer Substanzaufnahme von etwa 15 mg/Tag/Tier bei einer Futteraufnahme von 15 g pro Tag. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umgebungsbedingungen (20°C Lufttemperatur, 96 % Luftfeuchtigkeit, Lichtperiode von 6:00 bis 18:00 Uhr) gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Das Körpergewicht der Tiere wurde alle drei Wochen überprüft. In der 19. Woche wurde der Urin über 6 Stunden in Stoffwechsellkäfigen gesammelt. Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden vor Behandlungsbeginn und in den Wochen 6, 9, 12, 15, und 21 nicht-invasiv mit der indirekten „tail-cuff“ Methode bestimmt (Hochoer *et al.*, 2000). Die Tiere wurden dazu in Wärmekäfige gesetzt. Die Druckmanschette des TSE Blutdruck-Monitors Serie 9000 (TSE, Bad Homburg) wurde zur Messung des systolischen Blutdrucks und zur Aufzeichnung der Herzfrequenz um den Schwanz gelegt.

Die Studie wurde in Woche 21 beendet, nachdem die Hälfte der in der Placebogruppe eingesetzten Tiere gestorben war. Die überlebenden Tiere wurden mit Isofluran betäubt und Blutproben wurden in EDTA- oder Lithium-Heparin entnommen. Anschließend wurden die Tiere schmerzfrei getötet. Herz, linker Ventrikel und beide Nieren wurden entnommen und gewogen. Die Herzspitze und ein Pol der linken Niere (mit Nierenkortex und Nierenmedulla) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Das Blut wurde 15 min bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert, das Plasma wurde portioniert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Im Plasma wurden Creatinin, Harnstoff, Harnsäure, Creatininkinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), alkalische Phosphatase (AP), Protein und Albumin (ALB) mit einem Multichannel Autoanalyser (Synchron CX7, Beckmann, Hamburg) bestimmt (Haffner *et al.*, 2005). Für die Bestimmung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) wurde EDTA-Plasma über C18-Säulen (Bond Elut, Varian, Horbor City, CA, USA) gegeben, um ANP zu extrahieren. Das Eluat wurde lyophilisiert und die ANP-Konzentration wurde mit Hilfe eines RIA-Kits (Biotrend, Köln) bestimmt (Stasch *et al.*, 2002b). Für die Bestimmung der cGMP-Plasmakonzentration wurden die Proben 1:1 mit 1 % Trichloressigsäure versetzt, 30 min inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde viermal mit Wasser-gesättigtem Ether gewaschen, ausgeschüttelt und lyophilisiert. cGMP in den Lyophilisaten wurde mittels RIA-Kit (IBL, Hamburg) bestimmt (Stasch *et al.*, 2002b). Osteopontin-Konzentrationen im Plasma wurden mittels des Quantikine[®] Mouse Osteopontin Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) nach Herstellerangaben gemessen. Die Plasmakonzentrationen von BAY 58-2667 wurde mittels HPLC (2300 HLC System, Cohesive Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen (Dumitrascu *et al.*, 2006).

Im Urin wurden die Creatinin-, Harnstoff- und Proteinkonzentrationen mit dem Multichannel Autoanalyser bestimmt und zur Bestimmung von Natrium und Kalium wurde ein Elektrolyt Analyzer (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA) verwendet (Stasch *et al.*, 1997). Die Bestimmung der Osteopontin- und cGMP-Konzentrationen im Urin wurden analog zur Plasmakonzentration durchgeführt (siehe oben).

Zur Bestimmung der profibrotischen Biomarker Kollagen1 α 1, Fibronectin-1 (FN-1), Osteopontin (OPN), Tenascin-C (TNC) und „kidney injury molecule-1“ (KIM-1) sowie des proinflammatorischen Markers „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) wurden Nierenpol und Herzspitze unter flüssigem Stickstoff gemörsert, die mRNA aus den Organen isoliert und die Genexpression der Marker mittels der TaqMan[®]-Methode bestimmt. Zur Bestimmung der relativen Genexpression in normotensiven Tieren wurden Kontrollorgane aus gleichaltrigen Dahl/ss Ratten (n=10) entnommen, die eine Diät mit normalem Salzgehalt erhielten. Das zerkleinerte Gewebe wurde mittels Zentrifugation in der FastPrep (MP Biomedicals, Eschwege) homogenisiert und die Gesamt-RNA wurde mit TRIzol[®] (Invitrogen) isoliert. Die RNA wurde mittels Chloroform-Extraktion aufgereinigt, mit Isopropanol ausgefällt und die Konzentration der RNA wurde mit dem NanoDrop (NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Um mögliche Reste genomischer DNA aus der Präparation zu entfernen, wurden 2 μ g RNA mit DNaseI (Invitrogen) nach Herstellerangaben verdaut. Anschließend wurde die mRNA in cDNA mit dem ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Die cDNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Genexpression wurden quantitative Real-Time-PCRs durchgeführt. Die cDNA Proben wurden dazu im qPCR MasterMix Plus (Eurogentech, Seraing, Belgien) mit markerspezifischen Primern (siehe Tabelle 2) und einer TaqMan-Sonde gemischt. Die Sonde enthält einen Reporter- und einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der Reporter im Laufe der PCR freigesetzt und seine Emission steigt, da die Fluoreszenz nicht mehr gequencht wird. Die Fluoreszenz des Reporters nimmt somit proportional zur Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht, denn je höher die Expression eines Gens ist, desto mehr PCR-Produkte werden amplifiziert (Livak *et al.*, 1995). Als Reporter wurde hier 6-Carboxyfluorescein verwendet. Die PCR wurde in 40 Zyklen aus jeweils 2 min 50°C, 10 min 95°C, 15 s 95°C und 1 min 60°C in 384-Wellplatten im 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode ausgewertet. Die PCR-Produkte nehmen bis zum Erreichen der Plateauphase exponentiell zu und der Anfang der exponentiellen Phase wird bei der Auswertung benutzt. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird als Ct-Wert vom TaqMan-Gerät angegeben. Die relative Genexpression lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

mit $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct[Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{Referenzgen}}] - \Delta Ct[Ct_{35} - Ct_{\text{Referenzgen}}]$

Als Referenzgen wurde das ribosomale Protein L32 (RpL32) verwendet. Ct₃₅ entspricht dem höchsten anzunehmenden Ct-Wert und kann so als interne Referenz dienen.

Biomarker	Forward-Primer	Reverse-Primer	TaqMan-Sonde
Kollagen1 α 1	5'-gaagcatgtctggttgagaga-3'	5'-atcggaacctcgctccat-3'	5'-tgaccgatggattccagtcga-3'
MCP-1	5'-tgcagtaatgcccactca-3'	5'-tctccagccgactcattgg-3'	5'-ctgctgctactcattcactggcaagatga-3'
FN-1	5'-ctgcacatgtctcgggaatg-3'	5'-cccgtcgtcataacacgttg-3'	5'-aaaggagaattcaaatgcatcccc-3'
OPN	5'-agccatgaccacatggacga-3'	5'-gattcgtcagattcatccgagt-3'	5'-agccatgcagagagcgaggattctgtg-3'
TNC	5'-tctgtgatgtacagcaag-3'	5'-atgggctcaggtctgccagg-3'	5'-aagtcattgtgggcctgacaccacctcc-3'
KIM-1	5'-ggaatggcactgtgacatcct-3'	5'-ctgctgctcctcaaagg-3'	5'-aggaggcctggaataatcacactgtaaga-3'
RpL32	5'-gaagagcagcacagctggc-3'	5'-tcattctctcgtcgtagc-3'	5'-tcagagtcaccaatccaacgcca-3'

Tabelle 2: Sequenzen der Primer und TaqMan Sonden, die zur Bestimmung der Genexpression der Biomarker verwendet wurden.

2.12 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardabweichung der Mittelwerte) angegeben. GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) wurde zum Fitten der Kurven und zur Berechnung der EC₅₀ oder IC₅₀ Werte benutzt. Statistische Vergleiche wurden mittels des gepaarten t-Tests nach Student und des Chi-Quadrat (X²)-Tests durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Aktivierung und Stabilisierung der sGC unter hämoxidierenden Bedingungen

3.1.1 Inhibition der sGC-Aktivität durch Zink-Protoporphyrin

An der rekombinanten hämfreien sGC wurde überprüft, ob HMR1766 wie BAY 58-2667 mit der Hämbindungstasche interagiert. Hierzu wurden beide sGC-Aktivatoren in Konzentrationen eingesetzt, die das Enzym in gleichem Ausmaß aktivierten (Abbildung 3 A). 100 nM BAY 58-2667 aktivierte die hämfreie sGC 69,5-fach (entsprechend einer spezifischen Aktivität von 10,2 μM cGMP/mg/min). 100 μM HMR1766 induzierte eine vergleichbare, 72,9-fache Aktivierung (entsprechend einer spezifischen Aktivität von 13,6 μM cGMP/mg/min). Durch die Zugabe von steigenden Konzentrationen Zn-PPIX wurde die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung mit einem IC_{50} -Wert von 4,8 nM und die HMR1766-induzierte sGC-Aktivierung mit einem IC_{50} -Wert 2,2 nM inhibiert. Dies weist daraufhin, dass beide Substanzen mit der Hämbindungstasche interagierten.

3.1.2 Bindung von BAY 58-2667 und HMR1766 an das aufgereinigte Enzym

Mittels einer Rezeptorbindungsstudie mit ^3H -BAY 58-2667 wurde untersucht, ob BAY 58-2667 und HMR1766 um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren (Abbildung 3 B). Rekombinante hämhaltige sGC wurde mit 100 nM radioaktiv-markiertem BAY 58-2667 und steigenden Konzentrationen unmarkiertem BAY 58-2667, HMR1766 und Zn-PPIX inkubiert. Unmarkiertes BAY 58-2667 verdrängte ^3H -BAY 58-2667 mit einem IC_{50} -Wert von 200 nM. Ein K_i -Wert von 23 nM wurde mit Hilfe der von Schmidt *et al.* (2003) bestimmten Bindungskonstante (K_D) von 13,4 nM berechnet. Zn-PPIX verdrängte ^3H -BAY 58-2667 mit einem IC_{50} -Wert von 2,9 nM. HMR1766 konkurrierte nur in sehr hohen Konzentrationen von mehr als 10 μM mit ^3H -BAY 58-2667, ohne dass der IC_{50} -Wert von BAY 58-2667 oder Zn-PPIX erreicht wurde.

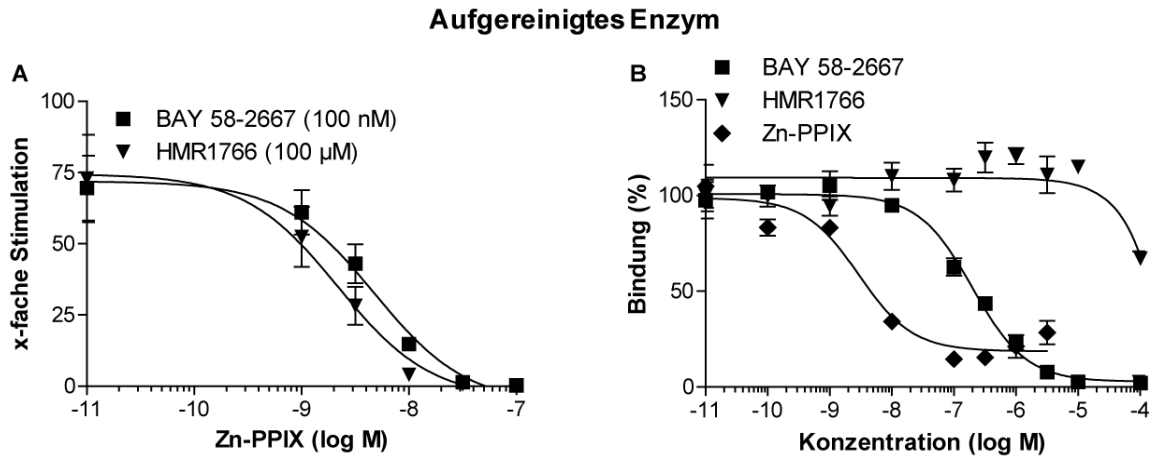


Abbildung 3: (A) Inhibition der BAY 58-2667- oder HMR1766-induzierten sGC-Aktivierung durch Zn-PPIX. Die sGC-Aktivität wurde durch die Bildung von [32 P]-cGMP aus [α^{32} P]-GTP gemessen. Das aufgereinigte, hämfreie Enzym wurde mit 100 nM BAY 58-2667 oder 100 µM HMR1766 und steigenden Konzentrationen Zn-PPIX inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. (B) Vergleich der kompetitiven Bindung von BAY 58-2667, HMR1766 und Zn-PPIX an hämhaltiger sGC. Die Verdrängung von 100 nM 3 H-BAY 58-2667 wurde in einer Rezeptorbindungsstudie untersucht. Die mittlere unspezifische Bindung von 3 H-BAY 58-2667 in Anwesenheit von unmarkiertem BAY 58-2667 betrug 717 dpm und maximal wurden von 4.338 dpm erreicht. Die mittlere unspezifische Bindung von 3 H-BAY 58-2667 in Anwesenheit von HMR1766 betrug 616 dpm und maximal wurden 4.149 dpm erreicht. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von drei bis fünf unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

3.1.3 sGC-Proteinlevel in WT-sGC-cGMP-Reporterzellen unter hämoxidierenden Bedingungen

In cGMP-Reporterzellen, die stabil mit WT-sGC transfiziert sind, wurde der Abbau der sGC durch 24-stündige Langzeitinkubation mit dem sGC-Inhibitor ODQ induziert (Garthwaite *et al.*, 1995; Olesen *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000). Unter diesen Bedingungen nahmen die α_1 -sGC-Proteinlevel auf 60 ± 4 % und die der β_1 -Untereinheit auf 36 ± 3 % ab (Abbildung 4). In Kontrolleexperimenten blieben die Proteinlevel nach 30-minütiger Inkubation mit ODQ unverändert (Daten nicht gezeigt). Durch eine Koinkubation mit dem sGC-Aktivator BAY 58-2667 wurde die ODQ-induzierte Abnahme der sGC-Proteinlevel beider Untereinheiten konzentrationsabhängig mit einer minimal effektiven Konzentration von 10 nM verhindert (Tabelle 3).

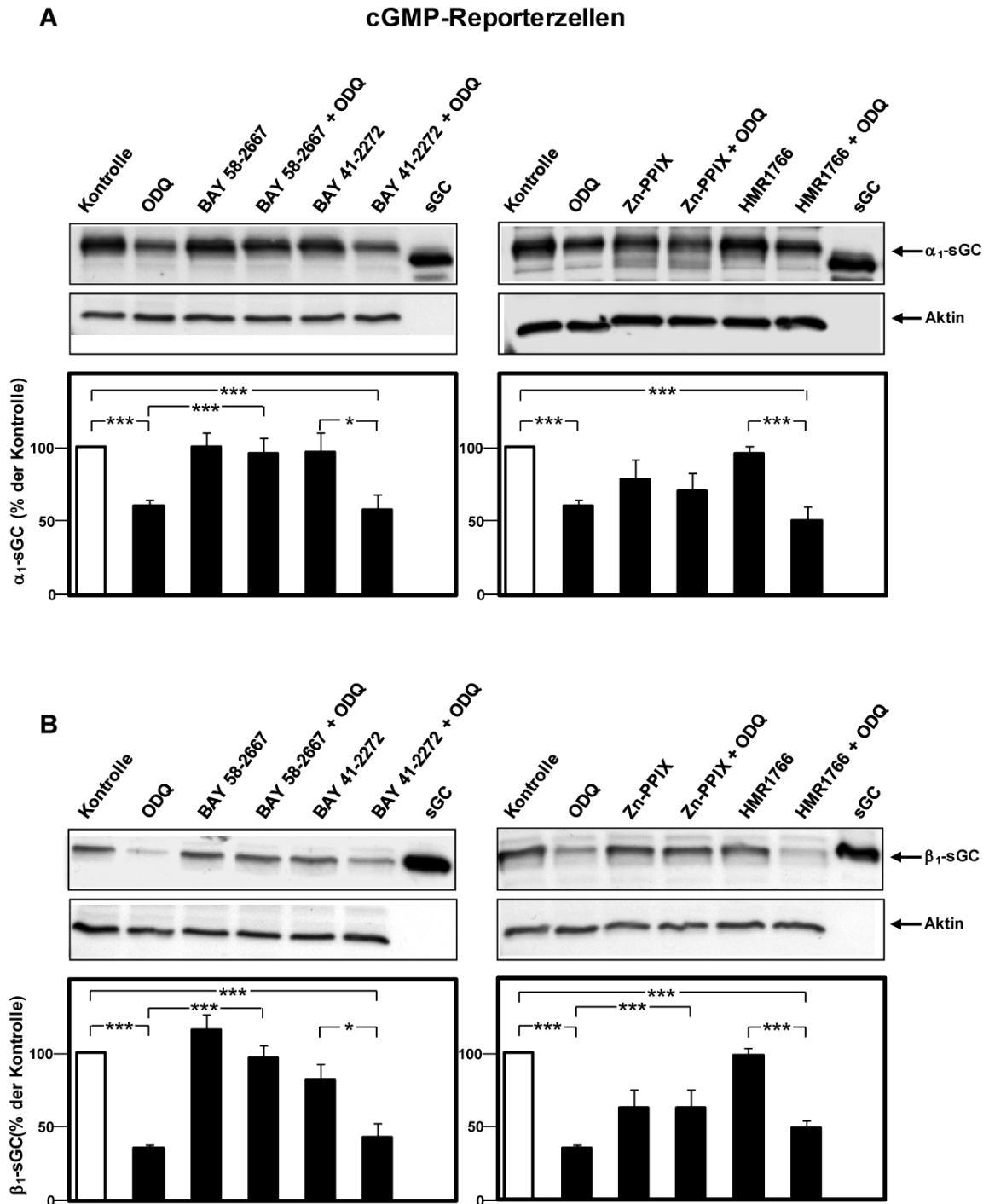


Abbildung 4: Einfluss von 10 μ M BAY 58-2667, 10 μ M 41-2272, 10 μ M HMR1766 und 5 μ M Zn-PPIX auf die sGC-Proteinlevel in WT-sGC-cGMP-Reporterzellen unter Kontroll- und hämoxidierenden Bedingungen. Eine Hämoxidation wurde durch 24-stündige Inkubation der Zellen mit 10 μ M ODQ erreicht. (A) Repräsentativer Western Blot der α_1 -sGC und Aktin als Beladungskontrolle (oben). Aufgereinigte sGC wurde als Kontrolle verwendet. α_1 -sGC-Proteinlevel wurden mittels densitometrischer Messung ermittelt (unten). (B) Repräsentativer Western Blot der β_1 -sGC und Aktin als Beladungskontrolle (oben). Aufgereinigte sGC wurde als Kontrolle verwendet. β_1 -sGC-Proteinlevel wurden mittels densitometrischer Messung ermittelt (unten). Die sGC-Proteinlevel sind als % bezüglich der Kontrolle dargestellt, die als 100 % gesetzt wurde. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 32 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

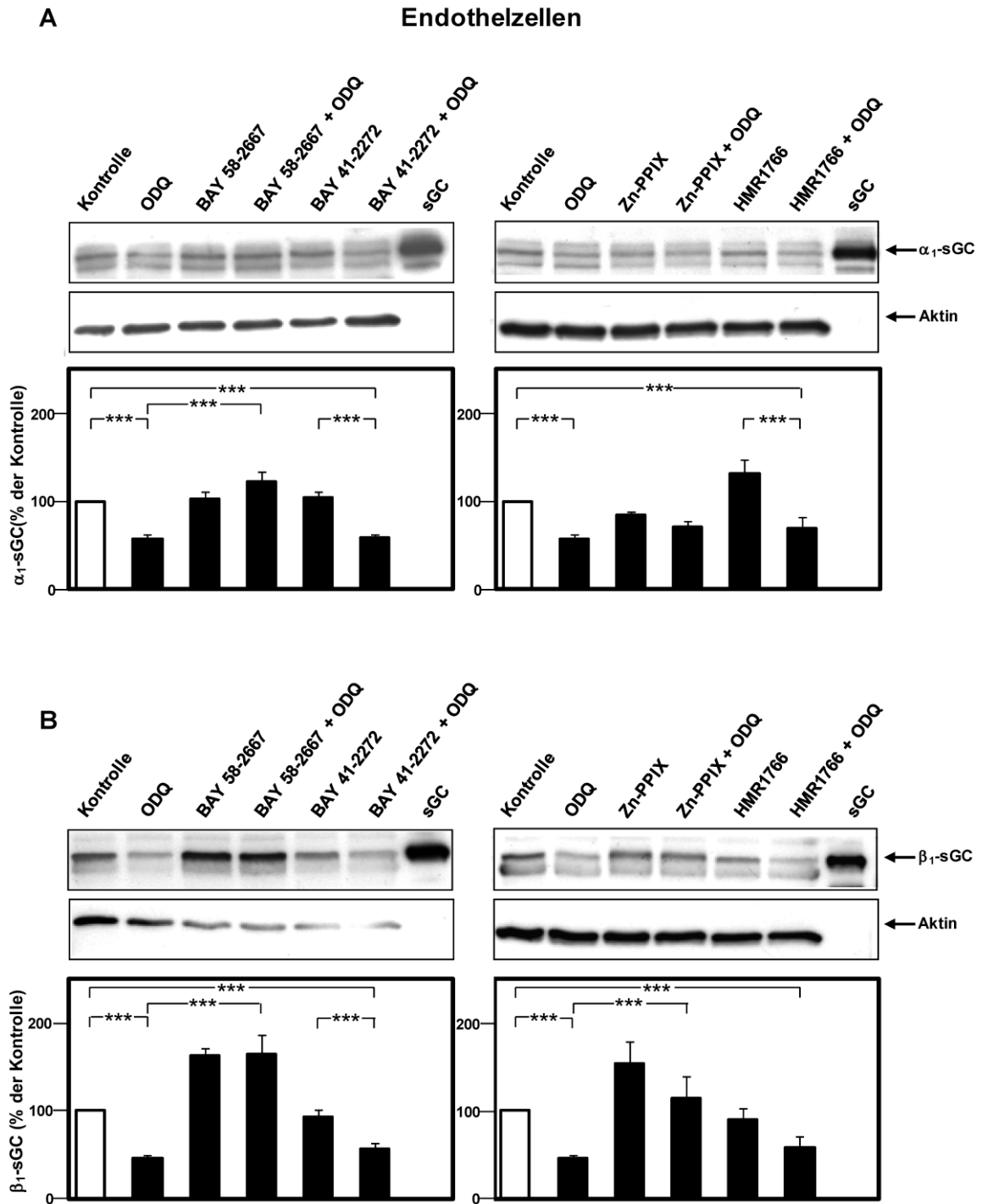
sGC-Proteinlevel in Zellen, die nur mit BAY 58-2667 inkubiert wurden, blieben konstant (Abbildung 4, Tabelle 3). Im Gegensatz zu BAY 58-2667 wurde durch Inkubation mit HMR1766 weder unter Kontrollbedingungen noch nach ODQ-Inkubation eine Veränderung der sGC-Proteinlevel in WT-sGC-Zellen erzielt (Abbildung 4). Eine Inkubation von WT-sGC-cGMP-Reporterzellen mit dem kompetitiven Hämtaschenliganden Zn-PPIX zeigte eine leichte Verminderung der sGC-Proteinlevel. In Zn-PPIX-inkubierten Zellen waren die sGC-Proteinlevel nach Hämoxydation jedoch höher als in Zellen, die ausschließlich mit ODQ inkubiert wurden. Der sGC-Stimulator BAY 41-2272 hatte weder unter Kontroll- noch unter hämoxydierenden Bedingungen einen Einfluss auf die sGC-Proteinlevel.

WT-sGC- cGMP-Reporterzellen BAY 58-2667 (μM)	α_1 -sGC		β_1 -sGC	
	ODQ (10 μM)		ODQ (10 μM)	
	-	+	-	+
-	100	60 \pm 4 ^{***}	100	36 \pm 3 ^{***}
0,01	88 \pm 7 ^{***††}	65 \pm 5 ^{***#}	79 \pm 5 ^{***†††}	38 \pm 10 ^{***††}
0,1	93 \pm 15 ^{†††}	76 \pm 8 ^{***}	73 \pm 10 ^{***†††}	63 \pm 13 ^{***†††}
1	94 \pm 8 ^{***†††}	94 \pm 6 ^{***†††}	92 \pm 25 ^{†††}	88 \pm 33 ^{†††}
10	100 \pm 9 ^{†††}	95 \pm 11 ^{†††}	116 \pm 10 ^{†††}	97 \pm 9 ^{†††}

Tabelle 3: Einfluss steigender Konzentrationen von BAY 58-2667 auf die sGC-Proteinlevel in WT-sGC-cGMP-Reporterzellen unter Kontroll- und hämoxydierenden Bedingungen. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3 - 32 unabhängigen Experimenten und als % bezüglich der unbehandelten Kontrolle angegeben. ^{***} $p < 0,005$ (BAY 58-2667-inkubierte Probe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen); ^{††} $p < 0,01$; ^{†††} $p < 0,005$ (BAY 58-2667-inkubierte Probe im Vergleich zur ODQ-inkubierten Kontrolle); [#] $p < 0,05$ (BAY 58-2667-inkubierte Probe im Vergleich zur BAY 58-2667 plus ODQ-inkubierten Probe).

3.1.4 Einfluss der Hämoxydation auf sGC-Proteinlevel in Endothelzellen

Zur Validierung der Ergebnisse in den cGMP-Reporterzellen und um zellspezifische Effekte der sGC-Agonisten auszuschließen, wurden die entsprechenden Versuche auch mit Endothelzellen durchgeführt. Im Gegensatz zu einer Kurzzeitinkubation (30 min, Daten nicht gezeigt) führte eine Langzeitinkubation (24 h, Abbildung 5) mit ODQ auch in diesen Zellen zu einer Abnahme der α_1 -sGC-Proteinlevel auf 58 \pm 4 % und der β_1 -sGC-Proteinlevel auf 46 \pm 3 %. Anders als bei den WT-sGC-cGMP-Reporterzellen, waren die Proteinlevel der β_1 -Untereinheit in ausschließlich mit BAY 58-2667 inkubierten Endothelzellen höher als in unbehandelten Kontrollzellen (Tabelle 4, Abbildung 5 B). Die α_1 -Proteinlevel blieben nach Inkubation mit BAY 58-2667 hingegen unverändert (Tabelle 4, Abbildung 5 A).



Ähnliche Ergebnisse wurden in Endothelzellen erzielt, die 24 h mit ODQ inkubiert wurden. Durch die Zugabe von BAY 58-2667 wurden die β_1 -Proteinlevel über die der unbehandelten Kontrollzellen hinaus erhöht, die α_1 -Proteinlevel blieben jedoch stabil (Tabelle 4, Abbildung 5). Eine Inkubation mit Zn-PPIX führte, ähnlich wie mit BAY 58-2667, dazu, dass die β_1 -sGC-Proteinlevel unter Kontroll- und hämoxidierenden Bedingungen höher waren als die Proteinlevel von unbehandelten Kontrollzellen. Die α_1 -sGC-Proteinlevel in Zn-PPIX-inkubierten Zellen waren nach Hämoxidation höher als in Zellen, die ausschließlich mit ODQ inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu waren die sGC-Proteinlevel weder in Zellen, die mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 inkubiert wurden, noch in HMR1766-inkubierten Endothelzellen signifikant höher als in den jeweiligen Kontrollzellen.

Endothelzellen	α_1 -sGC		β_1 -sGC	
	ODQ (10 μ M)		ODQ (10 μ M)	
BAY 58-2667 (μ M)	-	+	-	+
-	100	58 \pm 4 ^{***}	100	46 \pm 3 ^{***}
0,01	108 \pm 3 ^{***†††}	60 \pm 8 ^{***###}	106 \pm 5 ^{***†††}	53 \pm 5 ^{***###}
0,1	99 \pm 11 ^{††}	64 \pm 15 ^{***}	111 \pm 11 ^{***†††}	74 \pm 9 ^{***†††#}
1	100 \pm 9 ^{***†††}	92 \pm 9 ^{***†††}	138 \pm 13 ^{†††}	129 \pm 17 ^{†††}
10	103 \pm 9 ^{†††}	122 \pm 12 ^{***†††}	162 \pm 24 ^{***†††}	163 \pm 22 ^{***†††}

Tabelle 4: Einfluss steigender Konzentrationen von BAY 58-2667 auf die sGC-Proteinlevel in Endothelzellen unter Kontroll- und hämoxidierenden Bedingungen. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 4 - 29 unabhängigen Experimenten und als % bezüglich der unbehandelten Kontrolle angegeben. ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,005$ (BAY 58-2667-inkubierte Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle); ^{††} $p < 0,01$; ^{†††} $p < 0,005$ (BAY 58-2667-inkubierte Probe im Vergleich zur ODQ-behandelte Kontrolle); [#] $p < 0,05$; ^{###} $p < 0,005$ (BAY 58-2667-inkubierte Probe im Vergleich zur BAY 58-2667 plus ODQ-behandelte Probe).

3.1.5 sGC-Aktivität in WT-sGC-cGMP-Reporterzellen

Zwei verschiedene Ansätze wurden durchgeführt, um den Einfluss der Hämoxidation auf die sGC-Aktivität zu untersuchen: Eine Langzeitinkubation (24 h) mit ODQ wurde durchgeführt, um die sGC-Proteinlevel zu reduzieren. Des Weiteren wurde eine Kurzzeitinkubation (10 min) mit ODQ durchgeführt, um die Hämgruppe zu oxidieren und so die sGC-Aktivität zu inhibieren, jedoch ohne die Proteinlevel zu beeinflussen. Zusätzlich wurden Langzeit- und Kurzzeitinkubation kombiniert, um zu testen, ob die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivität der verbliebenen sGC noch weiter durch eine akute Oxidation gesteigert werden konnte. In Abbildung 6 ist der Einfluss dieser

Ansätze auf die sGC-Aktivierung durch BAY 58-2667, BAY 41-2272, HMR1766 oder Zn-PPIX dargestellt.

BAY 58-2667 (30 μ M) aktivierte die sGC bis zu 73-fach mit einem EC_{50} -Wert von 23,3 nM. Die Kurzzeitinkubation mit ODQ verstärkte die sGC-Aktivierung auf 129-fach und der EC_{50} -Wert wurde auf 9,1 nM vermindert (Abbildung 6 A). Nach Langzeitinkubation mit ODQ wurde die WT-sGC 78-fach von BAY 58-2667 aktiviert, der EC_{50} -Wert war mit 15,1 nM etwas höher als nach Kurzzeitinkubation. In Langzeitinkubierten WT-sGC-Reporterzellen, die zusätzlich noch Kurzzeitinkubiert wurden, war die Sensitivität gegenüber BAY 58-2667 ähnlich wie nach alleiniger Langzeitinkubation (EC_{50} 9,9 nM; 82-fache Stimulation).

Unter Kontrollbedingungen stimulierte BAY 41-2272 (30 μ M) die sGC bis zu 115-fach mit einem EC_{50} -Wert von 596 nM. Nach Kurzzeitinkubation mit ODQ (10 min) war diese sGC-Stimulierung auf 23-fach reduziert und der EC_{50} -Wert auf 831 nM erhöht (Abbildung 6 B). Langzeithämoxydation resultierte in einer weiteren Reduktion der sGC-Stimulierung (maximale Stimulierung 17-fach, EC_{50} 580 nM). Zusätzliche akute Oxidation von Langzeitinkubierten Zellen führte zu einem ähnlichen EC_{50} -Wert von 607 nM der BAY 41-2272-induzierten sGC-Stimulierung wie in Zellen, die nur Langzeitinkubiert wurden.

Eine Inkubation von WT-sGC-Reporterzellen mit steigenden Konzentrationen von HMR1766 führte zu einer bis zu 557-fachen sGC-Aktivierung mit einem EC_{50} -Wert von 8,8 μ M. Die HMR1766-induzierte sGC-Aktivierung wurde durch akute ODQ-Gabe nicht verstärkt. Nach Langzeitinkubation mit ODQ war die HMR1766-induzierte sGC-Aktivierung etwas vermindert (Abbildung 6 C), was durch eine zusätzliche akute ODQ Inkubation nicht verändert wurde (EC_{50} 13,5 μ M).

Zn-PPIX hatte weder unter Kontroll- noch unter hämoxydierenden Bedingungen einen Einfluss auf die sGC-Aktivität (Abbildung 6 D).

3.1.6 sGC-Aktivität in Endothelzellen

Endothelzellen wurden 30 min mit steigenden Konzentrationen von BAY 58-2667, Zn-PPIX, HMR1766 oder 15 min mit steigenden Konzentrationen von BAY 41-2272 inkubiert. Die sGC-Aktivität wurde unter Kontrollbedingungen und nach Langzeitinkubation mit ODQ ermittelt, indem akkumuliertes cGMP mittels RIA

gemessen wurde (Abbildung 7). BAY 58-2667 zeigte ein flache Konzentrations-Wirkungskurve mit einer maximal 8-fachen Aktivierung und einem EC_{50} -Wert von $0,3 \mu\text{M}$. Nach Hämoxidation wurde die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung auf 134-fach erhöht. Der EC_{50} -Wert betrug $0,2 \mu\text{M}$ (Abbildung 7 A). Die cGMP-Spiegel der Endothelzellen wurden durch $10 \mu\text{M}$ BAY 41-2272 um 123-fach gesteigert und nach Langzeitinkubation mit ODQ auf 86-fach reduziert. Der entsprechende EC_{50} -Wert wurde von 737 zu $946 \mu\text{M}$ verschoben (Abbildung 7 B). Die Inkubation der Endothelzellen mit HMR1766 führte zu einer maximalen 20-fachen sGC-Aktivierung (EC_{50} $1.261 \mu\text{M}$), die durch Hämoxidation auf 749-fach (EC_{50} $810 \mu\text{M}$) gesteigert wurde (Abbildung 7 C). Der Antagonist Zn-PPIX hatte weder unter Kontrollbedingungen noch nach Langzeitinkubation mit ODQ einen Einfluss auf die sGC-Aktivität.

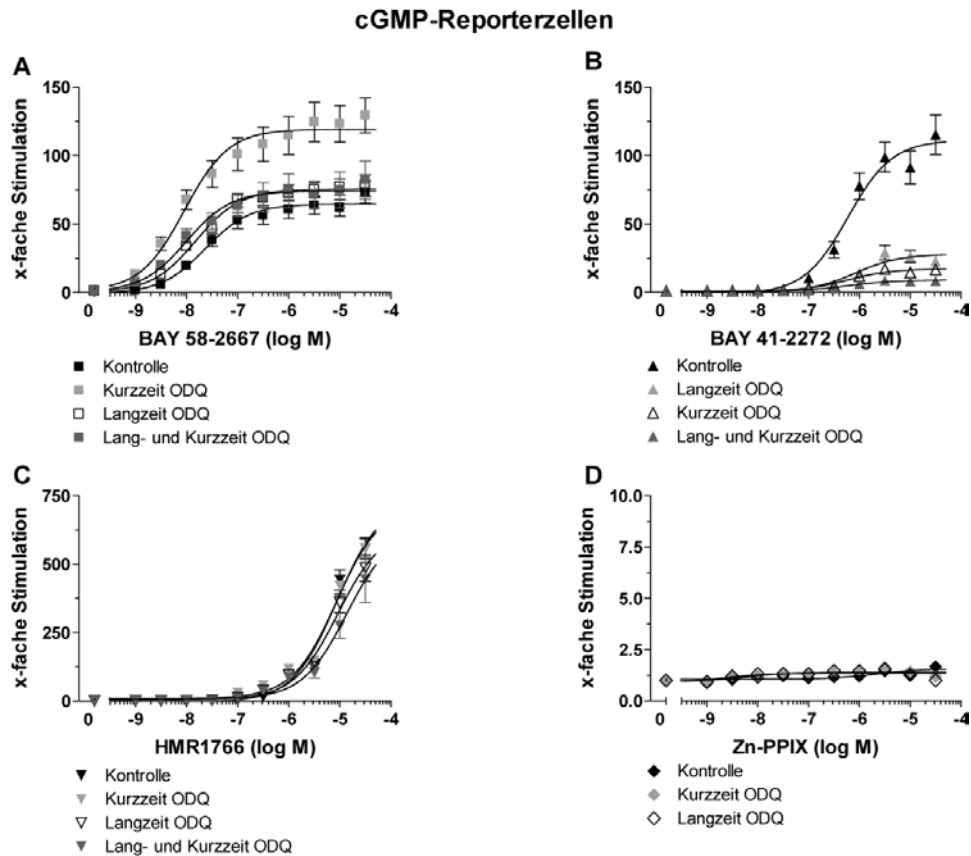


Abbildung 6: Konzentrations-Wirkungskurven von WT-sGC in cGMP-Reporterzellen, die mit steigenden Konzentrationen von BAY 58-2667 (A), BAY 41-2272 (B), HMR1766 (C) oder Zn-PPIX (D) alleine oder in Kombination mit $10 \mu\text{M}$ ODQ für 10 min (Kurzzeit) inkubiert wurden, sowie nach 24-stündiger Vorinkubation mit $10 \mu\text{M}$ ODQ (Langzeit) oder nach Langzeitinkubation in Kombination mit zusätzlicher Kurzzeitinkubation. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 7 - 19 unabhängigen Experimenten, die in Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die sGC-Aktivierung ist als x-fache Stimulation der behandelten sGC im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dargestellt. Eine mittlere Basalaktivität von 982 RLUs wurde gemessen.

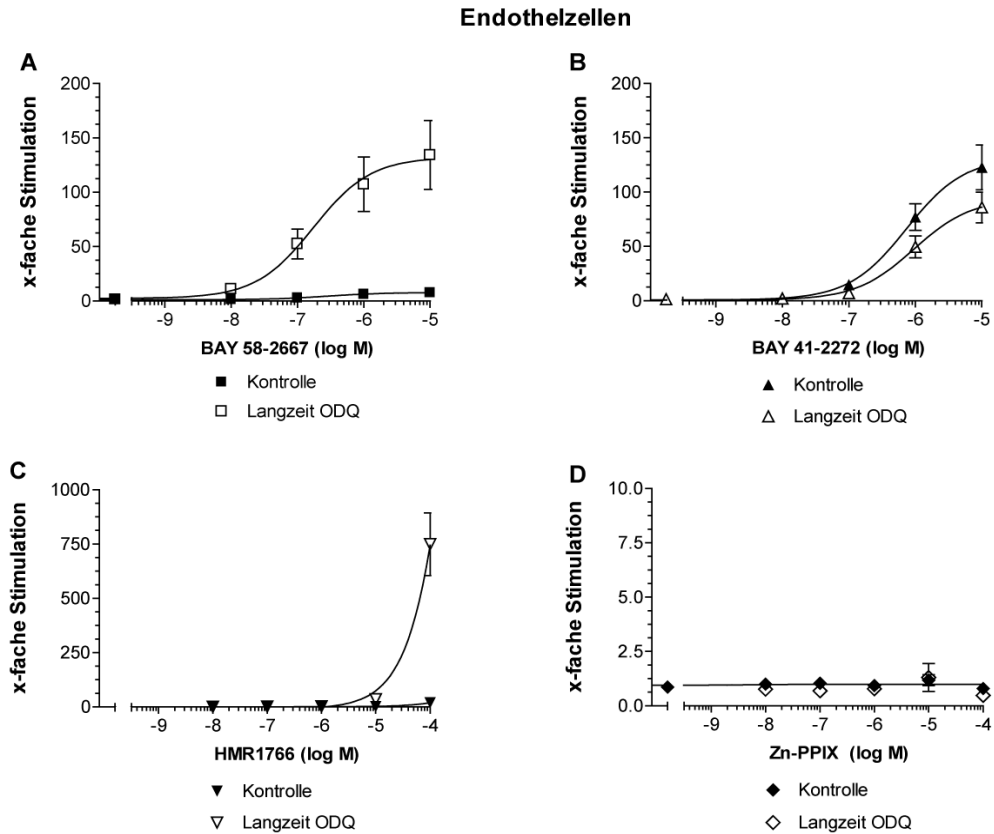


Abbildung 7: Einfluss von BAY 58-2667, BAY 41-2272, HMR1766 und Zn-PPIX auf die sGC-Aktivität in Endothelzellen unter Kontroll- und hämoxidierenden Bedingungen. Endothelzellen wurden 30 min mit verschiedenen Konzentrationen BAY 58-2667 (A), HMR1766 (C), Zn-PPIX (D) oder 15 min mit verschiedenen Konzentrationen BAY 41-2272 (B) unter Kontrollbedingungen oder nach 24-stündiger Vorinkubation (Langzeit) mit 10 μ M ODQ inkubiert. Die sGC-Aktivität wurde durch Messung der cGMP-Akkumulation mittels RIA ermittelt und ist als x-fache Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 8 - 14 unabhängigen Experimenten, die in doppeltem Ansatz durchgeführt wurden. Der mittlere basale cGMP-Gehalt betrug 386 fmol/Well.

3.1.7 Aktivität der β_1 H105F-sGC und der β_1 Y135A/R139A-sGC

Die Aktivität der hämfreien Mutanten β_1 H105F-sGC und β_1 Y135A/R139A-sGC wurde in cGMP-Reporterzellen gemessen, die stabil mit Expressionvektoren der jeweiligen Mutante transfiziert sind. WT-, β_1 H105F- oder β_1 Y135A/R139A-sGCs-exprimierende Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von BAY 58-2667 und HMR1766 allein oder in Kombination mit Kurzzeitinkubation mit ODQ inkubiert (Abbildung 8). 30 μ M BAY 58-2667 aktivierte die WT-sGC bis 17-fach mit einem EC_{50} -Wert von 0,2 μ M. Diese Aktivierung wurde durch die Zugabe von 10 μ M ODQ auf 64-fach mit einem EC_{50} -Wert von 2,0 μ M gesteigert (Abbildung 8 A). Inkubation dieser WT-sGC-exprimierenden Zellen mit HMR1766 führte zu einer maximalen 230-fachen Aktivierung mit einem EC_{50} -Wert von 4,2 μ M. Koinkubation mit ODQ erhöhte diese Aktivierung auf

328-fach mit einem EC_{50} -Wert von 1,5 μ M (Abbildung 8 B). Inkubation von cGMP-Reporterzellen, welche die hämfreie sGC-Mutante β_1 H105F exprimierten, mit BAY 58-2667 führte zu einer maximalen 45-fachen (EC_{50} 11,6 nM) Aktivierung, die durch die Zugabe von ODQ nur leicht auf 55-fach (EC_{50} 7,6 nM) erhöht wurde (Abbildung 8 C). Die höchste Konzentration von HMR1766 (30 μ M) aktivierte β_1 H105F-sGC-Zellen bis zu 95-fach (EC_{50} 0,8 μ M) und nach Zugabe von ODQ bis zu 100-fach (EC_{50} 0,8 μ M; Abbildung 8 D). Die Doppelmutante β_1 Y135A/R139A wurde weder von BAY 58-2667 alleine noch durch die Kombination aus BAY 58-2667 und ODQ aktiviert (Abbildung 8 E). HMR1766 aktivierte die Doppelmutante nur leicht (5-fach alleine, 6-fach in Kombination mit ODQ, Abbildung 8 F).

3.1.8 Proteinlevel der β_1 H105F-sGC und der β_1 Y135A/R139A-sGC

Durch 24-stündige Inkubation mit ODQ wurden die α_1 -sGC-Proteinlevel in WT-sGC-cGMP-Reporterzellen auf 49 ± 10 % und die β_1 -sGC-Proteinlevel auf 61 ± 14 % reduziert (Abbildung 9). Nach 24-stündiger Inkubation mit BAY 58-2667 waren die α_1 -Proteinlevel auf dem Niveau von unbehandelten Kontrollzellen während die β_1 -Proteinlevel deutlich erhöht waren. Durch zusätzliche ODQ-Gabe wurden die Proteinlevel beider WT-sGC-Untereinheiten nicht verändert. In der β_1 H105F-sGC-exprimierenden-Zelllinie führte eine Inkubation mit ODQ zu keinerlei Reduktion der sGC-Proteinlevel. Durch die Zugabe von BAY 58-2667 wurden die β_1 H105F-Proteinlevel deutlich erhöht, wobei der Effekt auf die α_1 -Proteinlevel schwächer ausgeprägt war. In Zellen, welche die hämfreie Doppelmutante β_1 Y135A/R139A exprimierten, waren die Proteinlevel unter Kontroll- und hämoxidierenden Bedingungen unverändert und auch BAY 58-2667 hatte keinen Einfluss auf die Proteinlevel beider Untereinheiten (Abbildung 9).

cGMP-Reporterzellen

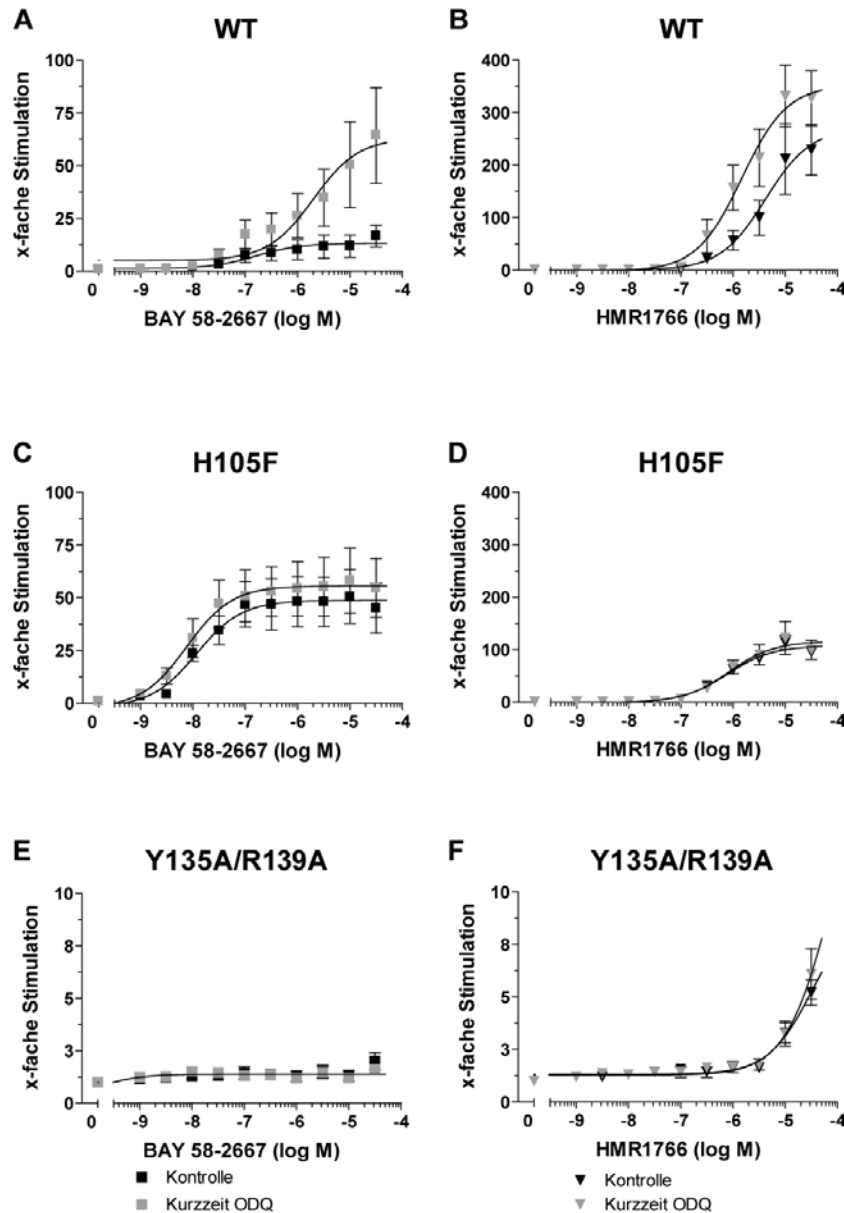


Abbildung 8: Konzentrations-Wirkungskurven von cGMP-Reporterzellen, stabil transfiziert mit WT (A, B), β_1 H105F (C, D) oder β_1 Y135A/R139A (E, F) sGC. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von BAY 58-2667 (A, C, E) oder HMR1766 (B, D, F) allein oder in Kombination mit einer Kurzzeitinkubation mit 10 μ M ODQ inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. Die sGC-Aktivität ist als x-fache Stimulierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dargestellt und wurde aus folgenden mittleren Basalaktivitäten berechnet: (A, B) 2.972 RLUs; (C, D) 17.531 RLUs; (E, F) 3.562 RLUs.

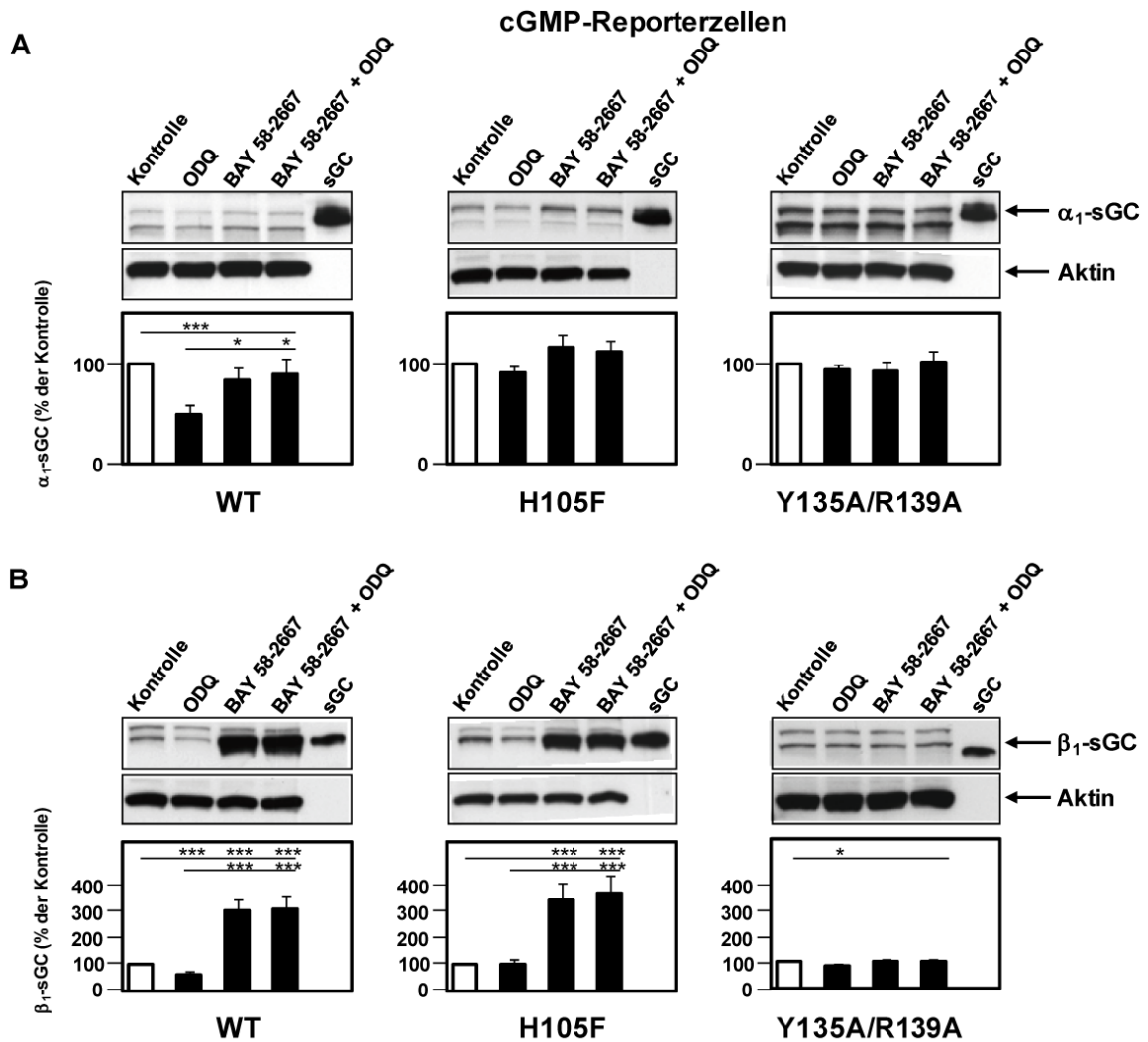


Abbildung 9: Einfluss von BAY 58-2667 auf die Proteinlevel von WT-sGC, β_1 H105F-sGC und β_1 Y135A/R139A-sGC unter Kontroll- und hämoxidierenden Bedingungen. cGMP-Reporterzellen wurden wie angegeben für 24 h mit 10 μ M ODQ, BAY 58-2667 allein oder der Kombination aus beidem inkubiert. (A) Repräsentativer Western Blot der α_1 -sGC und Aktin als Beladungskontrolle (oben). Aufgereinigte sGC wurde als Kontrolle verwendet. α_1 -sGC-Proteinlevel wurden mittels densitometrischer Messung ermittelt (unten). (B) Repräsentativer Western Blot der β_1 -sGC und Aktin als Beladungskontrolle (oben). Aufgereinigte sGC wurde als Kontrolle verwendet. β_1 -sGC-Proteinlevel wurden mittels densitometrischer Messung ermittelt (unten). Die sGC-Proteinlevel sind als % der Kontrolle dargestellt, die als 100 % gesetzt wurde. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3 - 8 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

3.2 Nachweis der hämfreien sGC durch Fluoreszenzdequenching

3.2.1 Identifizierung einer geeigneten Position für das Tetracystein-Motiv

Das Vorhandensein der Hämgruppe unter Kontrollbedingungen und die räumliche Nähe der Hämgruppe zum Farbstoff sind die Voraussetzungen für die erfolgreiche Anwendung der Fluoreszenzdequenching-Methode. Eine räumliche Nähe von N-Terminus und Hämgruppe wurde aufgrund der Kristallstruktur von *Nostoc sp.* angenommen (Ma *et al.*, 2007). Die Farbstoffe FIAsh und ReAsh binden an ein Tetracystein (TC)-Motiv mit der Aminosäuresequenz CCPGCC. Zunächst wurde innerhalb der β_1 -Untereinheit eine Position für das TC-Motiv gesucht, an der die Konformation der Hämbindungsstasche, und somit die Hämbindung, möglichst nicht durch das Einfügen des TC-Motivs beeinflusst wird. Das TC-Motiv wurde entweder mit dem N- oder C-Terminus der β_1 -sGC fusioniert oder an verschiedene Positionen innerhalb der Primärstruktur eingefügt. Vielversprechende intramolekulare Positionen der TC-Motive wurden mit Hilfe von zwei verschiedenen Ansätzen ausgewählt. Zum einen wurde das von Rothkegel *et al.* (2006) beschriebene molekulare Strukturmodell der sGC-Hämbindungsdomäne zur Identifizierung der Positionen 170-175 und 111-116 benutzt, die in der Nähe der Hämbindungsstasche liegen. Der zweite Ansatz konzentrierte sich auf den Bereich der Aminosäuren 231-310 der β_1 -sGC-Sequenz, da diese Region durch eine „Photoaffinity Labeling“-Studie mit BAY 58-2667 identifiziert wurde und sich wahrscheinlich in räumlicher Nähe zur Hämbindungsstasche befindet (Stasch *et al.*, 2002c). Innerhalb dieser Sequenz wurden die Aminosäuren an den Positionen 243-248, 239-244 und 257-262 durch das TC-Motiv ersetzt. Diese Sequenzbereiche wurden ausgewählt, da schon jeweils ein Prolin als Teil des TC-Motivs vorlag. Mit dieser Strategie sollten mögliche Konformationsänderungen vermindert werden, da die Wahrscheinlichkeit für Konformationsänderungen bei einem Austausch von Prolin größer ist als bei anderen Aminosäuren. Die beschriebenen Positionen sind in Abbildung 10 dargestellt.

Eine mögliche Beeinträchtigung der sGC-Aktivität durch das Einfügen des TC-Motivs wurde anhand der Aktivierungsprofile der TC- β_1 -sGC-Konstrukte überprüft. Die Konzentrations-Wirkungskurven an hämhaltige WT-sGC-exprimierenden Zellen sind in Abbildung 11 A gezeigt. Unter Kontrollbedingungen aktivierte BAY 58-2667 die WT-sGC 10-fach (EC_{50} 14 nM). Diese Aktivierung wurde durch Oxidation der Hämgruppe mit dem sGC-Inhibitor ODQ auf 20-fach (EC_{50} 8 nM) erhöht. Der sGC-

Stimulator BAY 41-2272 stimulierte die WT-sGC 5-fach (EC_{50} 67 nM) und durch gleichzeitige Zugabe von NO 15-fach (EC_{50} 260 nM).

61	LNAGEILQMF	GKMFFVFCQE	SGYDTILRVL	GSNVREFLQN	LDAL D HLAT	111-116 CCPGCC Y PGMRAPSF	120
121	RCTDAEKGGK	LILH Y SER E	GLQDIVIGII	KTVAQQIHGT	EIDMKVIQQR C	170-175 CCPGCC S EECDHTQFL	180
181	IEEKESKEED	FYEDLDRFEE	NGTQDSRISP	YTFCKAFPFH	IIFDRDLVVT	CC QCGNAIYR V L	240
241	239-244 PGCC 243-248 (TC4) CCPGCC PQLQPGKCSL	257-262 CCPG LSVFSLVRPH	CC ID ISFHGILS	HINTVFLVRS	KEGLLDVEKL	ECEDELTGAE	300
301	ISCLRLKGQM	IYLPEADSIL	FLCSPSVMNL	DDLTRRGLYL	SDIPLHDATR	DLVLLGEQFR	360

Abbildung 10: Übersicht über die in die β_1 -sGC Sequenz eingefügten Tetracystein (TC)-Motive. Die TC-Motive sind in grün und das Hämbindungsmotiv ist in rot dargestellt. Der Bereich des „Photoaffinity Labelings“ (Stasch et al., 2002c) ist grau hinterlegt.

Das TC N-tag Motiv zeigte unter keiner Testbedingung sGC-Aktivität (Abbildung 11 B). Die N- oder C-terminal getagten TC-Konstrukte zeigten ein im Vergleich zum WT leicht verändertes Aktivierungsprofil. Die Effekte von ODQ und NO auf die BAY 58-2667- bzw. BAY 41-2272-induzierte sGC-Aktivierung waren geringer als beim WT (Abbildung 11 C, D). Die sGC mit dem TC-Motiv an den Positionen 170-175 zeigte ein verändertes Aktivierungsprofil. Die BAY 58-2667-induzierte Aktivierung wurde durch die Zugabe von ODQ nur leicht erhöht und es wurde kein synergistischer Effekt der BAY 41-2272-induzierten sGC-Stimulierung mit NO beobachtet (Abbildung 12 E). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Hämgehalt dieses Konstruktes unter Kontrollbedingungen möglicherweise vermindert war. Die sGC mit dem TC-Motiv an den Positionen 111-116 wurde weder durch BAY 41-2272 stimuliert, noch hatte die Zugabe von ODQ einen Einfluss auf die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung. Dieses Konstrukt war demnach hämfrei (Abbildung 12 F). Das Konstrukt mit dem TC-Motiv an den Positionen 239-244 wurde weder durch BAY 41-2272 noch durch BAY 58-2667 allein oder durch die Kombination mit NO bzw. ODQ aktiviert. Die katalytische Aktivität dieses Enzyms war durch das Einfügen des TC-Motivs an diesen Positionen beeinträchtigt (Abbildung 12 C). Ebenso zeigte das Konstrukt mit dem TC-

Motiv an den Positionen 257-262 eine im Vergleich zum WT abgeschwächte sGC-Aktivität (Abbildung 12 D).

Das Konstrukt mit dem TC-Motiv an den Positionen 243-248 zeigte ein sehr WT-ähnliches Aktivierungsprofil (Abbildung 12 B). BAY 58-2667 aktivierte dieses Konstrukt 9-fach (EC_{50} 14 nM) und nach Zugabe von ODQ 18-fach (EC_{50} 11 nM) gesteigert. BAY 41-2272 stimulierte diese sGC 5-fach (EC_{50} 45 nM) und NO steigerte diese Stimulierung auf 15-fach (EC_{50} 373 nM). Daher wurde dieses Konstrukt zur weiteren Verwendung ausgewählt und wird im Folgenden als TC4 bezeichnet.

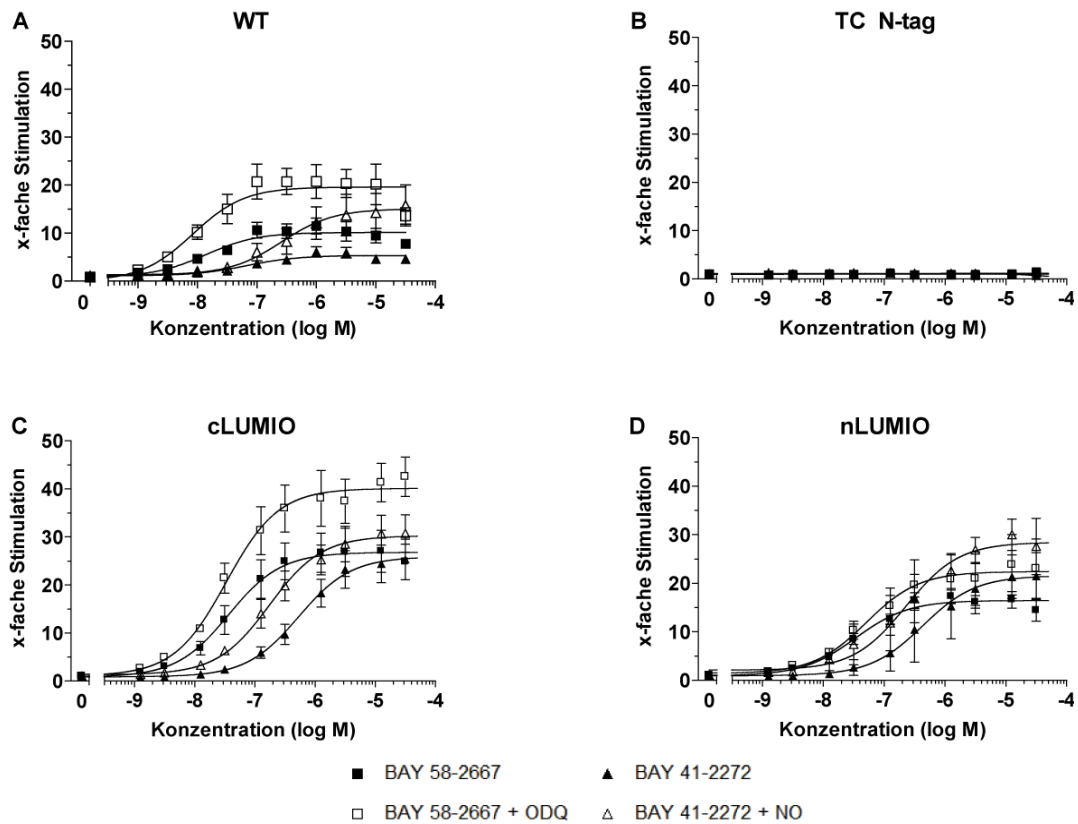


Abbildung 11: Aktivitätsprofile der WT-sGC (A) und mit dem Tetracystein (TC)-Motiv getagter sGC (B-D). Das TC-Motiv wurde N-terminal durch gerichtete Mutagenese (B) oder durch Klonierung der β_1 WT-sGC in die Expressionsvektoren pcDNA6.2/cLUMIO-DEST angefügt (C). Das N-terminale Tag wurde durch Klonierung der β_1 WT-sGC Sequenz in den Expressionsvektor pcDNA6.2/nLUMIO-DEST angefügt (D). cGMP-Reporterzellen wurden transient mit der α_1 WT-Untereinheit und der jeweiligen β_1 -Untereinheit kotransfiziert. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen BAY 58-2667 oder BAY 41-2272 allein oder in Kombination mit 10 μ M ODQ bzw. 10 nM NO inkubiert. Die sGC-Aktivität ist als x-fache Stimulation im Vergleich zu transfizierten, unstimulierten Kontrollzellen angegeben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 2 - 11 unabhängigen Experimenten, die in doppeltem Ansatz durchgeführt wurden. Folgende mittlere Basalaktivitäten wurden gemessen: (A) 1.0732 RLUs, (B) 1.896 RLUs, (C) 15.741 RLUs, (D) 19.822 RLUs.

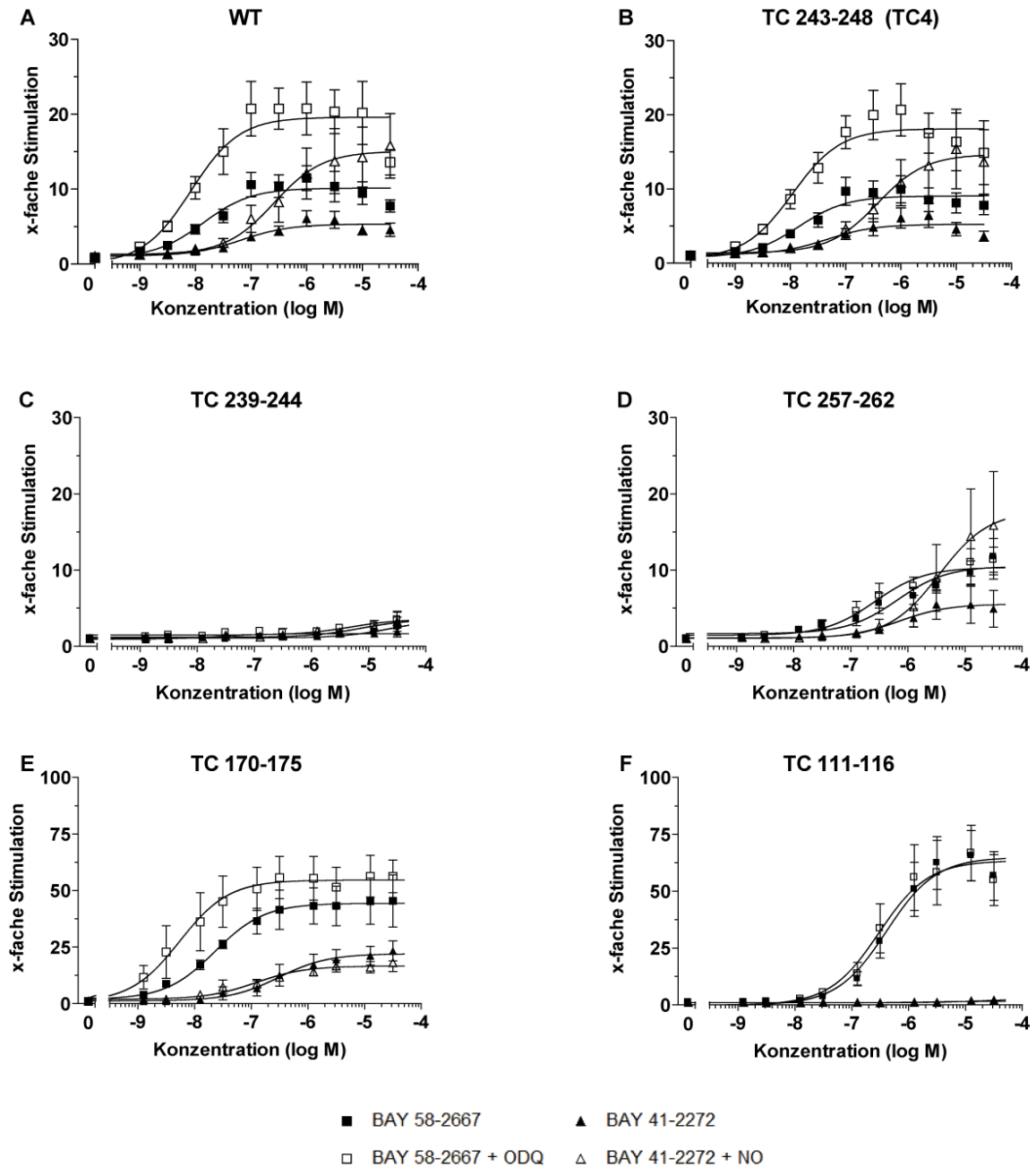


Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungskurven der WT-sGC (A) und sGC mit intramolekularen Tetracystein (TC)-Motiven (B-F). cGMP-Reporterzellen wurden transient mit der α_1 WT-Untereinheit und wie angegeben mit der jeweiligen β_1 -Untereinheit kotransfiziert. Die Positionen der TC-Motive sind oberhalb der Graphen angegeben. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen BAY 58-2667 oder BAY 41-2667 allein oder in Kombination mit $10 \mu\text{M}$ ODQ bzw. 10 nM NO inkubiert. Die sGC-Aktivität ist als x-fache Stimulation im Vergleich zu transfizierten, unstimulierten Kontrollzellen angegeben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 2 - 11 unabhängigen Experimenten, die in doppeltem Ansatz durchgeführt wurden. Folgende mittlere Basalaktivitäten wurden gemessen: (A) 10.732 RLU, (B) 9.720 RLU, (C) 355 RLU, (D) 570 RLU, (E) 23.318 RLU, (F) 6.518 RLU.

3.2.2 Optimierung der Bedingungen für die Hämoxidation

TC4-WT-sGC exprimierende cGMP-Reporterzellen wurden mit 100 nM BAY 58-2667 und steigenden Konzentration von NS 2028, ODQ und Rotenon inkubiert, um die für eine effiziente Oxidation der Hämgruppe benötigte Oxidantienkonzentration zu bestimmen (Abbildung 13). ODQ und NS 2028 oxidieren die Hämgruppe direkt (Olesen *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000). Rotenon erhöht die ROS-Konzentration durch Inhibition des mitochondrialen Komplexes I und hat wahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf die Hämgruppe wie ODQ und NS 2028 (Li *et al.*, 2003). BAY 58-2667 (100 nM) aktivierte TC4-WT-sGC 6-fach und durch die Zugabe von NS 2028 wurde diese Aktivierung konzentrationsabhängig gesteigert (EC_{50} 0,1 μ M), mit einer maximalen Wirkung bei 10 μ M NS 2028. ODQ steigerte ebenfalls die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung, allerdings war der Effekt erst bei 80 μ M maximal (EC_{50} von 2 μ M). Wie die beiden anderen Oxidantien steigerte auch Rotenon die Aktivierung der BAY 58-2667-voraktivierten sGC und der Effekt war bei 30 μ M am stärksten (EC_{50} 0,1 μ M). Rotenon und das wirkstärkere ODQ-Derivat NS 2028 wurden für die weiteren Untersuchungen zur Hämoxidation ausgewählt.

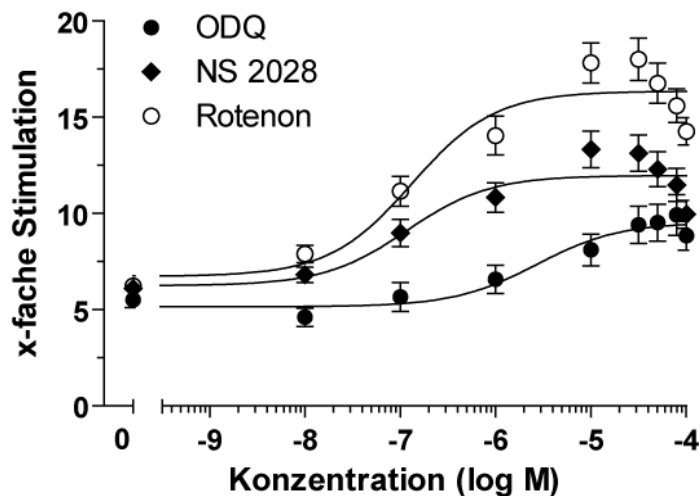


Abbildung 13: Einfluss von ODQ, NS 2028 und Rotenon auf BAY 58-2667-induzierte TC4-WT-sGC-Aktivität. cGMP-Reporterzellen wurden transient mit der α_1 WT-Untereinheit und der β_1 TC4-WT-Untereinheit kotransfiziert und mit 100 nM BAY 58-2667 und steigenden Konzentrationen von NS 2028, ODQ und Rotenon inkubiert. Die sGC-Aktivität ist als x-fache Stimulation im Vergleich zu transfizierten, unstimulierten Kontrollzellen angegeben, in denen eine mittlere Basalaktivität von 11.218 RLU gemessen wurde. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 7 - 18 unabhängigen Experimenten, die in doppeltem Ansatz durchgeführt wurden.

3.2.3 Einfluss der Hämoxidation auf die Fluoreszenz von FIAsh-gelabelter TC4-WT-sGC

Zur Überprüfung der Hypothese, ob Oxidation-induzierter Verlust der Hämgruppe an der sGC zu Fluoreszenzdequenching der FIAsh-Fluoreszenz führt, wurden TC4-WT-sGC exprimierende Zellen 90 min mit 10, 30 oder 100 μM des sGC-Oxidanz NS 2028 oder der ROS-induzierenden Substanz Rotenon inkubiert. Änderungen der Fluoreszenz wurden in einzelnen Zellen in einer Zeitreihe von 120 Laserscans über einen Zeitraum von 90 min gemessen. Durch das Laser-induzierte Ausbleichen wurde die FIAsh-Fluoreszenz unter Kontrollbedingungen nach 90 min auf $21 \pm 3 \%$ gesenkt (Abbildung 14 A). Sofern die Inkubation mit den Hämoxidantien zur Oxidation und schließlich zum Verlust der Hämgruppe an der sGC führt, sollte die Fluoreszenz von FIAsh nicht mehr gequenchet werden. Die Fluoreszenzintensität in Zellen, die mit 100 μM NS 2028 inkubiert wurden, war mit $38 \pm 5 \%$ signifikant höher als die der Kontrollzellen (Abbildung 14 A). Diese Untersuchungen legen den Verlust der Hämgruppe an der sGC durch die oxidativen Bedingungen nahe. Eine 90-minütige Inkubation der Zellen mit 100 μM Rotenon führte zu einer, im Vergleich zur Kontrolle, höheren verbliebenen Fluoreszenzintensität von $43 \pm 5 \%$. Niedrigere Konzentrationen von NS 2028 und Rotenon hatten nach einer Inkubationszeit von 90 min keinen Einfluss auf die verbliebene Fluoreszenzintensität. Exemplarische mikroskopische Aufnahmen sind in Abbildung 14 B dargestellt. Die Zellen wurden mit „regions of interest“ (ROI) markiert, in denen die Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Die Hintergrundfluoreszenz wurde in einem ROI mit untransfizierten Zellen und zellfreien Bereichen gemessen und von den Werten der einzelnen Zellen subtrahiert.

3.2.4 Einfluss von NS 2028 auf FIAsh-gelabelte, hämfreie TC4-Y135A/R139A-sGC und ReAsH-gelabelte TC4-WT-sGC

Zur weiteren Validierung der mit FIAsh-gelabelten TC4-WT-sGC gewonnenen Ergebnisse wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die hämfreie Mutante TC4-Y135A/R139A benutzt, um auszuschließen, dass der beobachtete Anstieg der FIAsh-Fluoreszenz in TC4-WT-sGC-exprimierenden Zellen auf bisher nicht bekannte oder artifizielle hämunabhängige Effekte zurückzuführen war. Dazu wurden FIAsh-gelabelte TC4-Y135A/R139A-sGC-exprimierende Zellen für 90 min mit 100 μM NS 2028 inkubiert. Im Vergleich zu Kontrollzellen ($13 \pm 1 \%$) war die FIAsh-Fluoreszenz nach NS 2028-Inkubation nur leicht und nicht signifikant auf $17 \pm 3 \%$ erhöht (Abbildung 15 A).

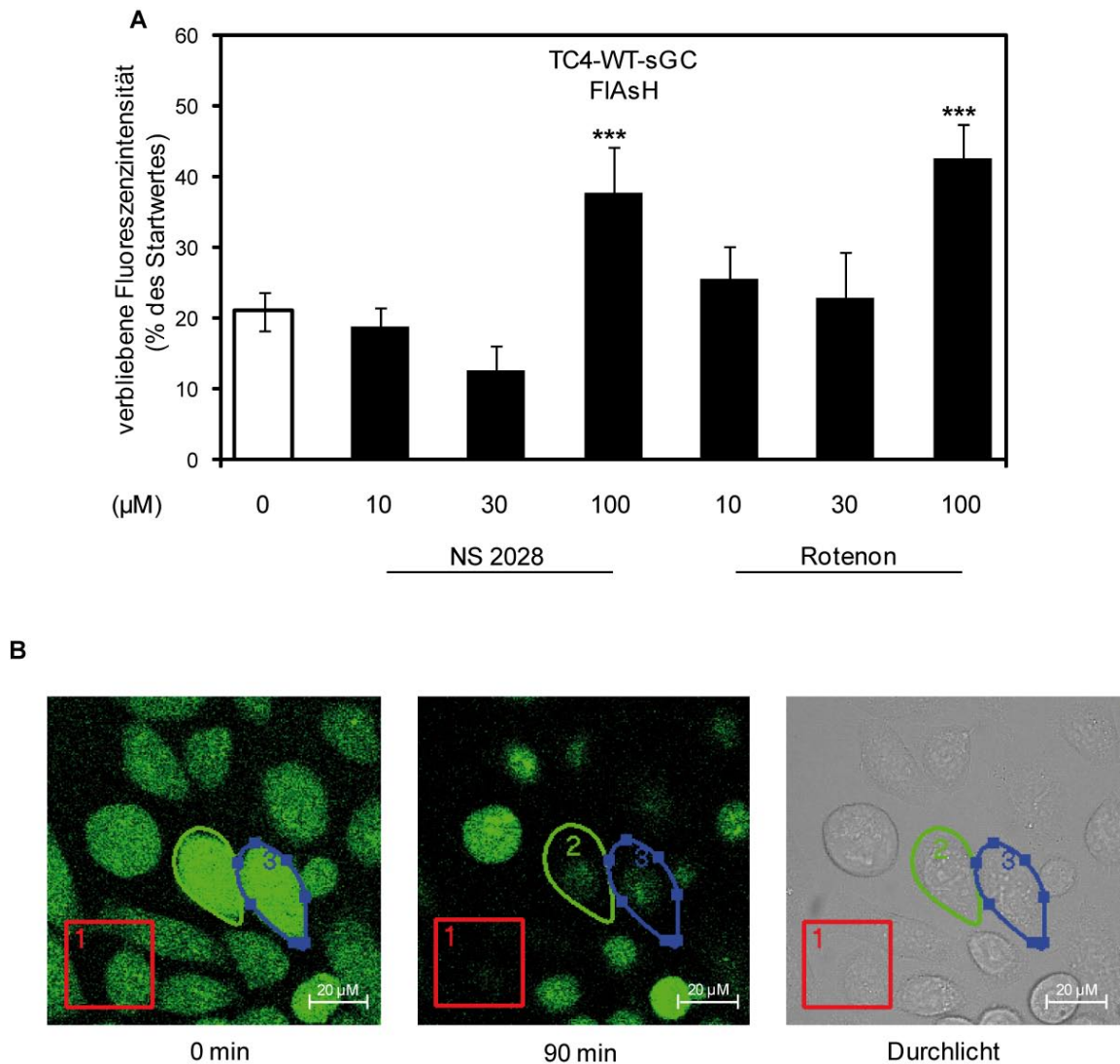


Abbildung 14: Einfluss einer 90-minütigen Inkubation mit 10, 30 oder 100 µM NS 2028 oder Rotenon auf die Fluoreszenzintensität von FIAsh-gelabelten TC4-WT-sGC-exprimierenden Zellen (A). cGMP-Reporterzellen wurden transient mit der α_1 WT-Untereinheit und der β_1 TC4-WT-Untereinheit kotransfiziert und mit FIAsh gelabelt. Die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen wurde in einer Zeitreihe von 120 Laserscans aufgenommen. Die Daten sind als % des Startwertes, der vor Applikation der Testsubstanzen bestimmt wurde, dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3 – 19 einzelnen Zellen, die an verschiedenen Tagen gemessen wurden. *** $p < 0,005$. (B) Repräsentative konfokale Mikroskopaufnahmen FIAsh-gelabelter TC4-WT-sGC-exprimierender cGMP-Reporter-zellen zum Start (0 min) und zum Ende (90 min) der Fluoreszenzmessung. Die zur Messung verwendeten ROIs sind als grüne (2) und blaue (3) Linien gekennzeichnet, der rote ROI (1) wurde zur Messung der Hintergrundfluoreszenz verwendet.

Als weitere Kontrolle wurde ReAsH-gelabelte TC4-WT-sGC benutzt. Da das Emissionsspektrum von ReAsH nahezu nicht mit dem Absorptionsspektrum der hämhaltigen sGC überlappt (Abbildung 2), ist ein Quenching der ReAsH-Fluoreszenz durch die Hämgruppe nicht zu erwarten. Nach 90-minütiger Inkubation der Zellen mit

100 μM NS 2028 wurde kein Einfluss auf die verbliebene Fluoreszenzintensität von ReAsH festgestellt (Abbildung 15 B).

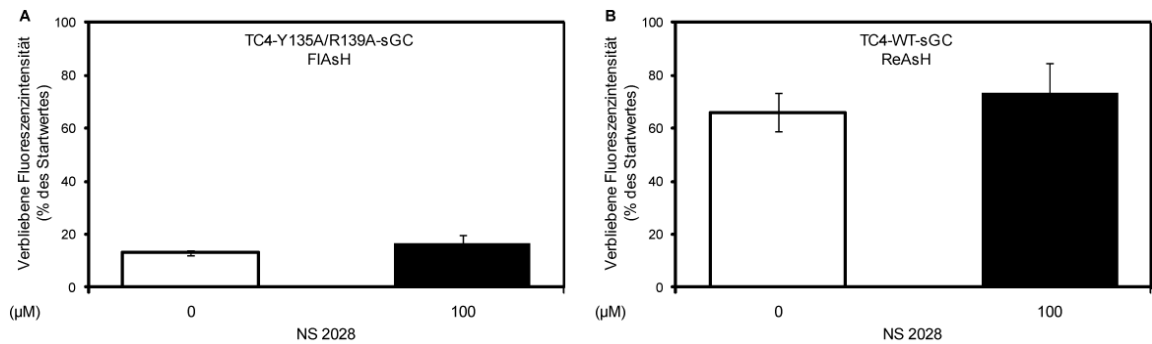


Abbildung 15: Einfluss einer 90-minütigen Inkubation mit 100 μM NS 2028 auf die Fluoreszenzintensität von FIAsH-gelabelter hämfreier TC4-Y135A/R139A-sGC (A) und ReAsH-gelabelter TC4-WT-sGC (B). cGMP-Reporterzellen wurden transient mit der α_1 WT-Untereinheit und wie angegeben mit der β_1 TC4-WT- oder β_1 TC4-Y135A/R139A-Untereinheit kotransfiziert. Die Zellen wurden mit FIAsH (A) bzw. ReAsH gelabelt. Die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen wurde in einer Zeitreihe von 120 Laserscans aufgenommen. Die Daten sind als % des Startwertes, der vor Applikation der Testsubstanzen bestimmt wurde, dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3 – 5 einzelnen Zellen, die an verschiedenen Tagen gemessen wurden.

3.2.5 Einfluss von NS 2028 und Rotenon auf die Aktivität der TC4-WT-sGC

TC4-WT-sGC exprimierende Zellen wurden 90 min mit 100 μM NS 2028 oder 100 μM Rotenon inkubiert. Anschließend wurde die sGC-Aktivität gemessen, um zu untersuchen, ob diese Vorbehandlung den Hämgehalt der sGC beeinflusst (Abbildung 16). Die Inkubation mit NS 2028 oder Rotenon führte zu einer verminderten BAY 41-2272-induzierten sGC-Stimulierung. Der Einfluss von ODQ auf die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivität sowie der synergistische Effekt von BAY 41-2272 mit NO waren unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar (Abbildung 16). Ähnliche Ergebnisse wurden in WT-sGC exprimierenden Zellen erzielt, die mit NS 2028 oder Rotenon behandelt wurden (Daten nicht gezeigt).

3.2.6 Einfluss von NS 2028 und Rotenon auf die Proteinlevel von TC4-WT-sGC

Hämoxydation führt zum Abbau der sGC (Stasch *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2009; Meurer *et al.*, 2009) und verminderte sGC-Proteinlevel können daher als Marker für einen Hämverlust dienen. Daher wurde der Einfluss der 90-minütigen Inkubation mit 100 μM NS 2028 oder Rotenon auf die sGC-Proteinlevel in TC4-WT-sGC-exprimierenden Zellen untersucht (Abbildung 17). NS 2028 hatte keinen Einfluss auf die α_1 -sGC-Proteinlevel und die β_1 -sGC-Proteinlevel wurden jedoch signifikant auf 78 ± 17 % gesenkt. Durch die Behandlung mit Rotenon wurden die Proteinlevel der α_1 -sGC

auf 65 ± 10 % und die der β_1 -Untereinheiten auf 81 ± 11 % gesenkt. Die Untersuchungen wurden auch mit WT-sGC exprimierenden Zellen durchgeführt und lieferten ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

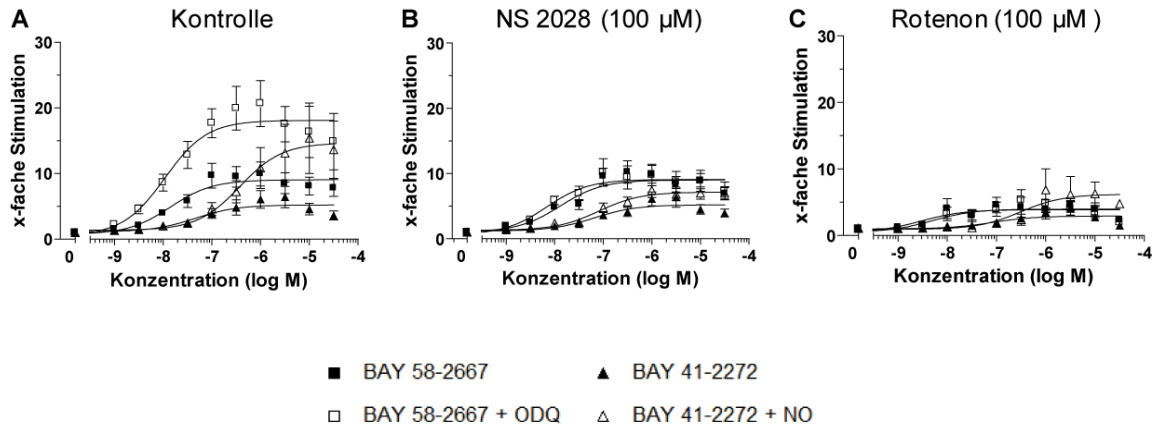


Abbildung 16: Einfluss einer 90-minütigen Vorinkubation mit $100 \mu\text{M}$ NS 2028 (B) oder $100 \mu\text{M}$ Rotenon (C) auf die sGC-Aktivität in TC4-WT-sGC exprimierenden cGMP-Reporterzellen im Vergleich zu Kontrollzellen (A). Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von BAY 58-2667, BAY 41-2272 allein oder in Kombination mit $10 \mu\text{M}$ ODQ bzw. 10 nM DEA/NO (NO) inkubiert. Die Enzymaktivität ist als x-fache Stimulation im Vergleich zur vorinkubierten, nicht stimulierten Kontrolle dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 2 - 15 unabhängigen Experimenten, die in doppeltem Ansatz durchgeführt wurden. Es wurde eine mittlere Basalaktivität von 7.747 RLUs gemessen.

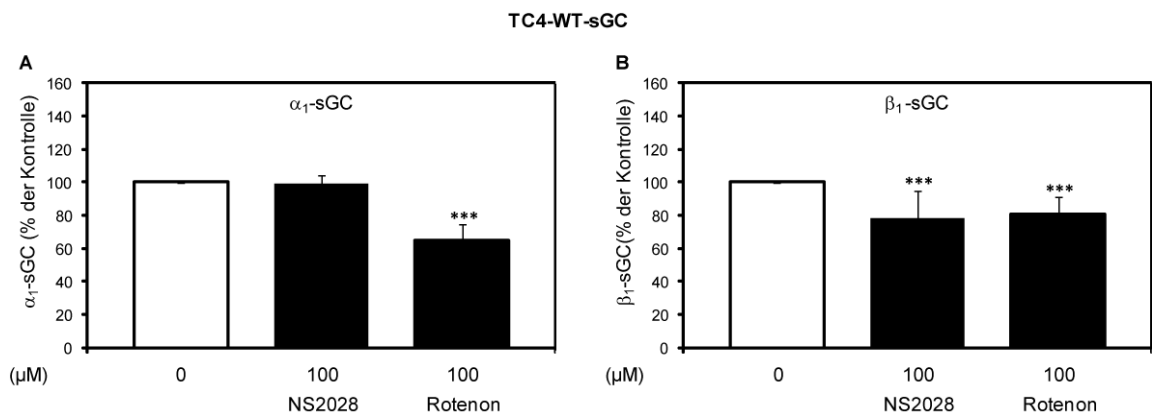


Abbildung 17: Einfluss einer 90-minütigen Vorinkubation mit $100 \mu\text{M}$ NS 2028 oder $100 \mu\text{M}$ Rotenon auf die Proteinlevel von TC4-WT-sGC. cGMP-Reporterzellen wurden transient mit der α_1 WT-Untereinheit und der β_1 TC4-WT-Untereinheit kotransfiziert. α_1 -sGC (A) und TC4-WT β_1 -sGC (B) wurden separat nachgewiesen und die Proteinlevel densitometrisch gemessen. Die sGC-Proteinlevel wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert, die auf 100 % gesetzt wurde. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3 - 9 unabhängigen Experimenten. *** $p < 0,005$.

3.3 Ganzkörper-Autoradiographie an Ratten mit ^{14}C -BAY 58-2667

3.3.1 Ganzkörper-Autoradiographie an normotensiven Ratten unter hämoxidierenden Bedingungen

Für die Ganzkörper-Autoradiographie wurden Ratten mit 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. ^{14}C -BAY 58-2667 behandelt und 15 min später getötet. Zusätzlich wurde einzelnen Tieren 10 min vor der ^{14}C -BAY 58-2667-Gabe 2 mg/kg ODQ i.v. verabreicht.

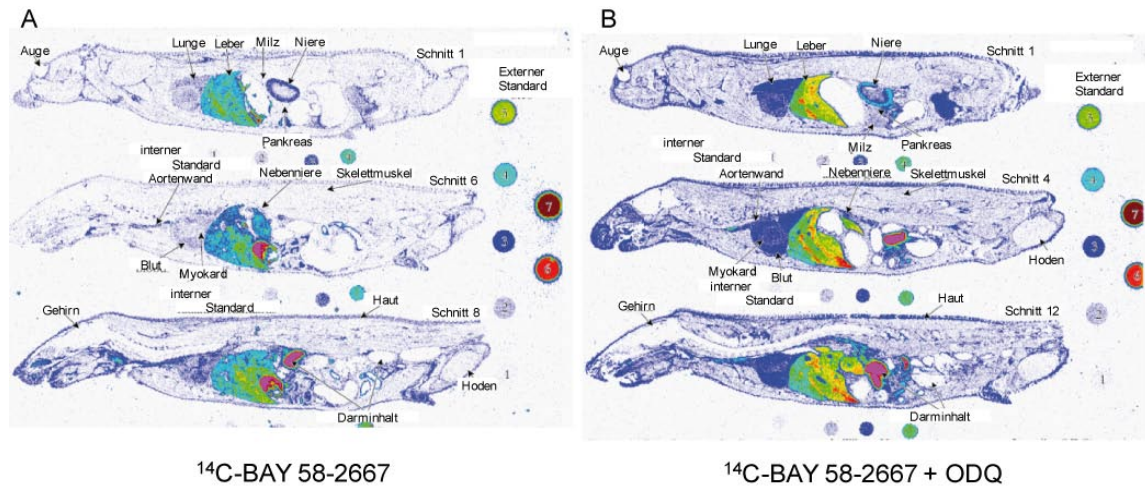


Abbildung 18: Repräsentative Ganzkörper-Autoradiographien von männlichen Ratten ohne (A) oder mit (B) 10-minütiger Vorbehandlung mit 2 mg/kg i.v. ODQ. Die Tiere wurden 15 min nach i.v. Gabe von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{14}C -BAY 58-2667 getötet. Dargestellt sind jeweils 3 Sagittalschnitte, die zur Messung der Radioaktivität benutzt wurden. Ausgewählte Organe und Standards sind beschriftet. Die Schnitte sind in Fehlfarben dargestellt; blau stellt niedrige, grün mittlere und rot hohe Radioaktivität dar.

Die Ganzkörper-Autoradiographien der in dieser Studie verwendeten Tiere sind in Abbildung 18 dargestellt und die äquivalenten Konzentrationen der Radioaktivität sind in Tabelle 5 aufgelistet. 15 min nach der Behandlung mit ^{14}C -BAY 58-2667 konnte im ganzen Tierkörper Radioaktivität nachgewiesen werden, mit deutlich stärkerer relativer Anreicherung in Leber und Nierenkortex (Abbildung 18 A). Nach Vorbehandlung mit ODQ konnte in den analysierten Organen deutlich mehr Radioaktivität nachgewiesen werden als in den Organen des nicht vorbehandelten Tieres (Abbildung 18 B). Besonders prägnant wurde der, durch die ODQ-Behandlung hervorgerufene, Unterschied in Leber, Lunge und Nierenkortex. In dem mit ODQ vorbehandelten Tier wurde in diesen Organen eine 2,6- bis 3,6-fach höhere Radioaktivität nachgewiesen als in dem Tier ohne Vorbehandlung. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch zu anderen Zeitpunkten nach ^{14}C -BAY 58-2667-Gabe erhalten (Daten nicht gezeigt).

	BAY 58-2667	BAY 58-2667 + ODQ	Verhältnis + ODQ / - ODQ
Nebenniere	0,0083	0,0176	2,12
Aortenwand	0,0180	0,0171	0,95
Blut (Herz)	0,0123	0,0280	2,27
Herzmuskel	0,0083	0,0162	1,96
Niere, Kortex	0,0198	0,0715	3,61
Niere,- Papille	0,0053	0,0118	2,22
Niere, innere Medulla	0,0077	0,0138	1,80
Niere, äußere Medulla	0,0183	0,0383	2,09
Nieren	0,0145	0,0357	2,47
Leber	0,1064	0,2762	2,60
Lunge	0,0103	0,0287	2,77
Pankreas	0,0037	0,0075	2,06
Skelettmuskel (dorsal)	0,0033	0,0050	1,54

Tabelle 5: Radioaktivität in Organen und Geweben der mit ODQ (2 mg/kg i.v.) oder Placebo vorbehandelten Wistar Kyoto Ratten nach i.v. Gabe von 100 µg/kg ¹⁴C-BAY 58-2667. Die Daten sind äquivalente Konzentrationen (µg-eq/g).

3.3.2 Ganzkörper-Autoradiographie an normotensiven und hypertensiven Ratten

Normotensiven und hypertensiven Dahl/ss Ratten wurde 100 µg/kg ¹⁴C BAY 58-2667 i.v. verabreicht, um zu untersuchen, ob sich mittels Ganzkörper-Autoradiographie die hämfreie sGC auch in einem Krankheitsmodell indirekt nachweisen lässt und ob Unterschiede zwischen gesunden und kranken Tieren bildlich darzustellen sind. Zusätzlich wurde ein normotensives und ein hypertensives Tier jeweils 10 min vor ¹⁴C-BAY 58-2667-Gabe mit 2 mg/kg ODQ i.v. vorbehandelt. In Abbildung 19 sind die Ganzkörper-Autographien der Dahl/ss Ratten gezeigt und die äquivalenten Radioaktivitätskonzentrationen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Im Vergleich zum nicht vorbehandelten normotensiven Tier (Abbildung 19 A) reicherte sich in den Organen des hypertensiven Tieres (Abbildung 19 C) mehr Radioaktivität an. Besonders ausgeprägt war dies in der Niere und im Herz, wo im hypertensiven Tier eine 2- bis 3-fach höhere Radioaktivität nachgewiesen wurde als im normotensiven Tier. Nach Vorbehandlung mit ODQ wurde die relative Anreicherung der Radioaktivität in dem normotensiven Tier im Vergleich zu dem nicht vorbehandelten Tier erhöht. Demgegenüber war zwischen den mit Vehikel oder ODQ-behandelten hypertensiven Tieren kein Unterschied zu erkennen. In den mit ODQ vorbehandelten Ratten war zwischen den normotensiven und hypertensiven kein Unterschied zu beobachten.

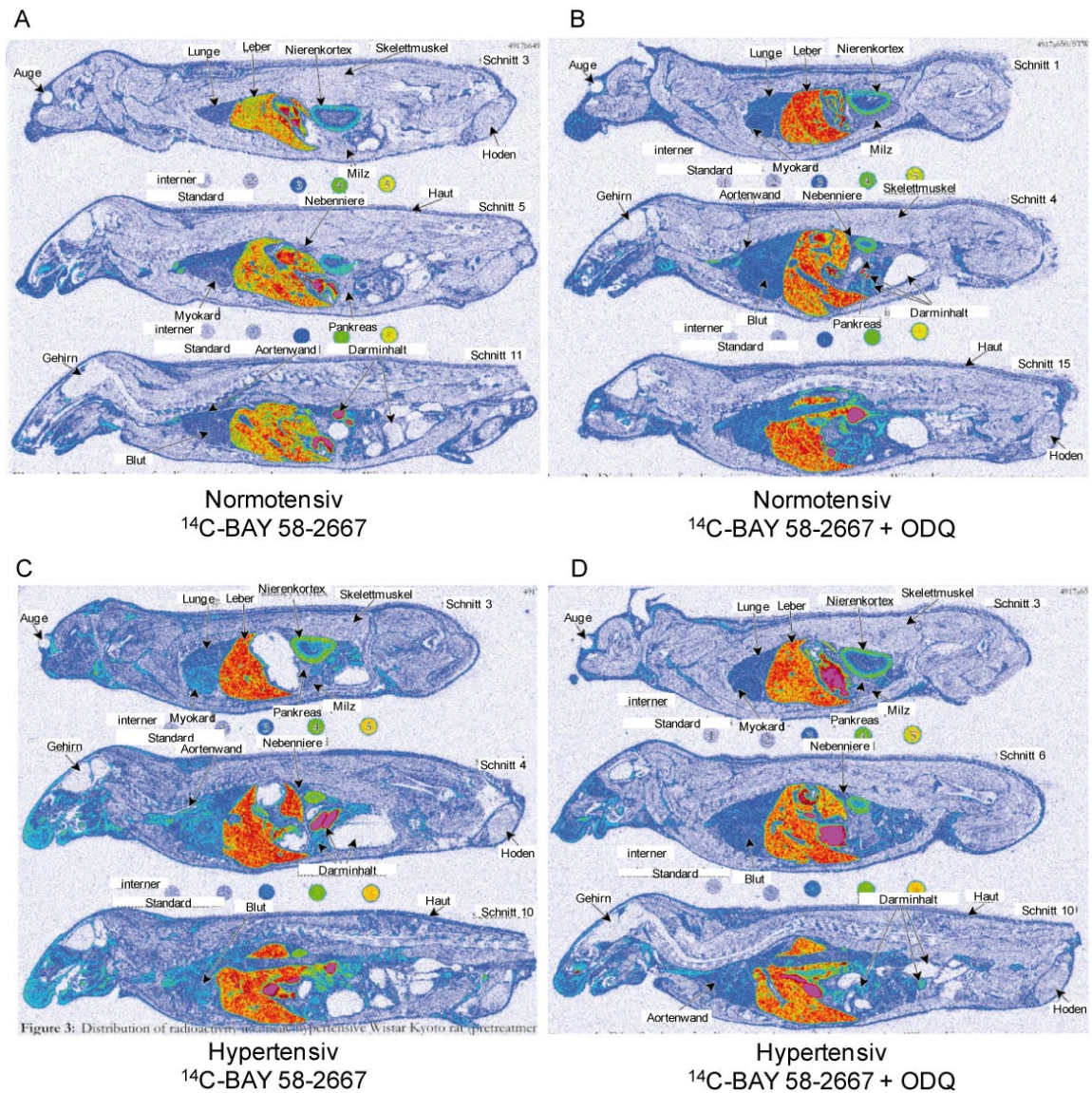


Abbildung 19: Repräsentative Ganzkörper-Autoradiographie von männlichen normotensiven Ratten (A, B) oder hypertensiven Tieren (C, D), mit (B,D) oder ohne (A,C) 10-minütiger i.v. Vorbehandlung mit 2 mg/kg ODQ. Die Tiere wurden 15 min nach i.v. Gabe von 100 µg/kg ¹⁴C-BAY 58-2667 getötet. Dargestellt sind jeweils 3 Sagittalschnitte, die zur Messung der Radioaktivität benutzt wurden. Ausgewählte Organe und Standards sind beschriftet. Die Schnitte sind in Fehlfarben dargestellt; blau stellt niedrige, grün mittlere und rot hohe Radioaktivität dar.

A

	Normotensiv BAY 58-2667	Normotensiv BAY 58-2667 +ODQ	Hypertensiv BAY 58-2667	Hypertensiv BAY 58-2667 +ODQ
Nebenniere	0,0944	0,1488	0,1521	0,1167
Aortenwand	0,1159	0,1328	0,1605	0,1312
Blut (Herz)	0,1213	0,2738	0,2191	0,1893
Herzmuskel	0,0944	0,1721	0,2581	0,1487
Niere, Kortex	0,5585	0,9658	1,1773	0,9170
Niere,- Papille	0,1011	0,1152	0,2716	0,1480
Niere, innere Medulla	0,0809	0,1442	0,1544	0,1094
Niere, äußere Medulla	0,1331	0,2469	0,3377	0,2277
Nieren	0,2672	0,4427	0,6269	0,3926
Leber	3,4530	5,2703	4,4153	3,7665
Lunge	0,1262	0,2454	0,1538	0,1482
Pankreas	0,0450	0,0759	0,0631	0,0545
Skelettmuskel (dorsal)	0,0240	0,0337	0,0407	0,0265

B

	Verhältnis normotensiv +ODQ/ -ODQ	Verhältnis hypertensiv +ODQ/ -ODQ	Verhältnis -ODQ/ hypertensiv/ normotensiv	Verhältnis +ODQ/ hypertensiv/ normotensiv
Nebenniere	1,58	0,77	1,61	0,78
Aortenwand	1,15	0,82	1,38	0,99
Blut (Herz)	2,26	0,86	1,81	0,69
Herzmuskel	1,82	0,58	2,73	0,86
Niere, Kortex	1,73	0,78	2,11	0,95
Niere,- Papille	1,14	0,54	2,69	1,28
Niere, innere Medulla	1,78	0,71	1,91	0,76
Niere, äußere Medulla	1,86	0,67	2,54	0,92
Nieren	1,66	0,63	2,35	0,89
Leber	1,53	0,85	1,28	0,71
Lunge	1,94	0,96	1,22	0,60
Pankreas	1,69	0,86	1,40	0,72
Skelettmuskel (dorsal)	1,40	0,65	1,69	0,78

Tabelle 6: (A) Radioaktivität in Organen und Geweben der mit ODQ (2 mg/kg) oder Placebo i.v. vorbehandelten normotensiven und hypertensiven Dahl/ss Ratten 15 min nach i.v. Gabe von 100 µg/kg ¹⁴C-BAY 58-2667. Die Daten sind äquivalente Konzentrationen (µg-eq/g). (B) Verhältnis der unter den unterschiedlichen Versuchsbedingungen nachgewiesenen Radioaktivität.

3.4 Langzeitwirkung von BAY 58-2667 an hypertensiven Ratten

3.4.1 *In vivo*-Parameter

Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden nicht-invasiv mittels der indirekten „tail-cuff“-Methode einen Tag vor Behandlungsbeginn und in den Wochen 6, 9, 12, 15, und 21 gemessen. In der Placebogruppe betrug der Blutdruckanstieg $54,0 \pm 8,5$ mmHg (Abbildung 20 A), während der Blutdruck der Tiere in der BAY 58-2667-behandelten Gruppe (1000 ppm im Futter, entsprechend 15 mg/Tag) nur um $24,5 \pm 6,5$ mmHg anstieg. Die Herzfrequenz in der Placebogruppe stieg während der Studiendauer um $30,0 \pm 10,7$ bpm an. Im Vergleich dazu war dieser Anstieg in der mit BAY 58-2667 behandelten Gruppe signifikant niedriger (Abbildung 20 B).

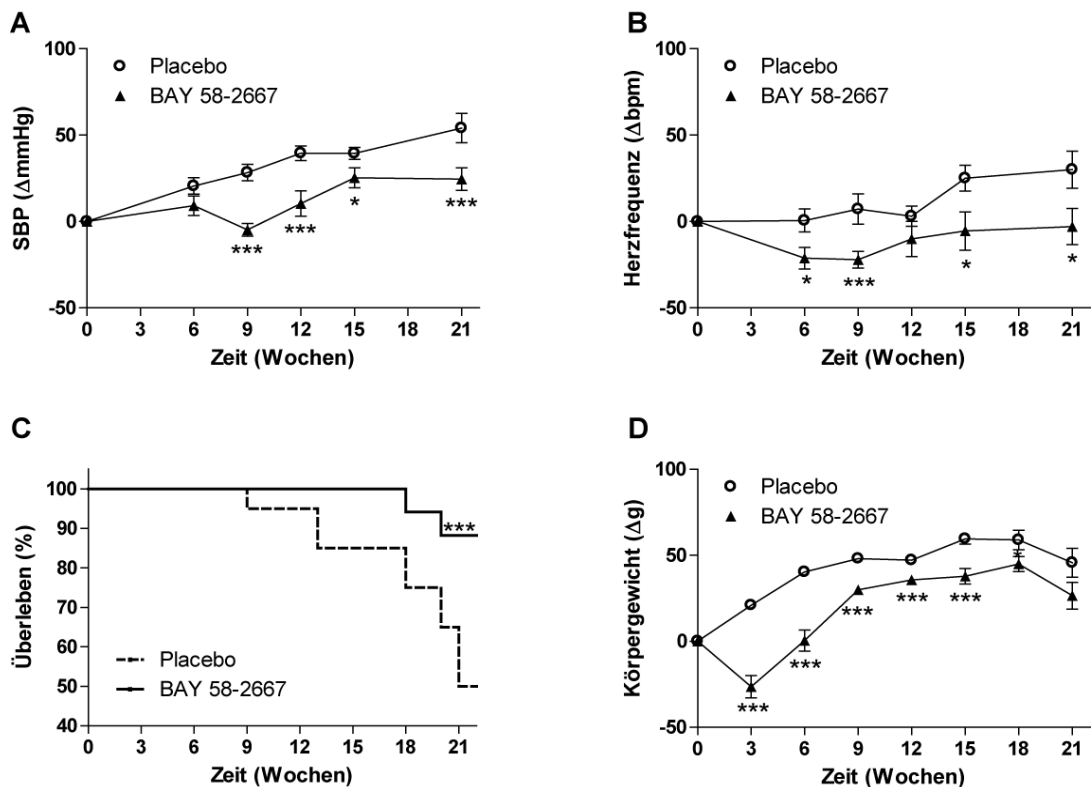


Abbildung 20: Einfluss einer oralen Behandlung mit BAY 58-2667 auf systolischen Blutdruck (SBP; A), Herzfrequenz (B), Überlebensrate (C) und Körpergewicht (D) von salzbelasteten Dahl/ss Ratten. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM. Die Ausgangswerte des systolischen Blutdrucks betragen $176,7 \pm 3,6$ mmHg in der Placebogruppe und $182,8 \pm 3,5$ mmHg in der BAY 58-2667-Gruppe. Die Ausgangswerte der Herzfrequenz betragen $409,4 \pm 3,6$ bpm in der Placebogruppe und $407,2 \pm 4,9$ bpm in der BAY 58-2667-Gruppe. Die Tiere der Placebogruppe wogen zu Studienbeginn $335,5 \pm 5,1$ g und die Tiere der BAY 58-2667-Gruppe $339,9 \pm 3,9$ g. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$ (BAY 58-2667-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe).

In der Placebogruppe starben bis zur 21. Woche nach Behandlungsbeginn 10 von 20 Tieren. Bis Studienende starben in BAY 58-2667-Gruppe nur zwei Tiere, jeweils in der 18. und 20. Woche. Dies entspricht einer Überlebensrate von 88,2 %. Zwischen der Placebogruppe und der mit BAY 58-2667 behandelten Gruppe konnte ein hochsignifikanter ($X^2 = 8$) Unterschied in der Mortalität beobachtet werden (Abbildung 20 C).

Die Tiere beider Gruppen wiesen zu Studienbeginn vergleichbare Körpergewichte auf. Im Verlauf der Studie nahmen die Tiere in der Placebogruppe stetig an Gewicht zu. In der mit BAY 58-2667-behandelten Gruppe konnte zu Studienbeginn eine Gewichtsabnahme beobachtet werden, bedingt durch eine reduzierte Futteraufnahme. Diese war wahrscheinlich durch den Geschmack des Substanzfutters bedingt. Nach der Eingewöhnungsphase nahmen auch die Tiere der BAY 58-2667-Gruppe im Verlauf der Studie vermehrt Futter auf und an Gewicht zu.

3.4.2 Plasma- und Urinparameter

In der 19. Studienwoche wurde der Urin der Tiere in einem Zeitraum von 6 h gesammelt und die in Tabelle 7 aufgeführten Urinparameter bestimmt. Die ausgeschiedene Urinmenge und die Proteinkonzentration im Urin der BAY 58-2667-behandelten Tiere waren im Vergleich zu den Tieren der Placebogruppe niedriger. Der cGMP-Gehalt im Urin der BAY 58-2667-Gruppe war signifikant höher als in der Placebogruppe. Für alle anderen im Urin bestimmten Parameter konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen festgestellt werden.

Parameter (Einheit)	Placebo	BAY 58-2667
Diurese (ml/kg/h)	5,7 ± 0,6	4,2 ± 0,6*
Creatinin (µmol/kg/h)	7,5 ± 0,4	8,2 ± 0,5
Harnstoff (µmol/kg/h)	469,3 ± 62,3	450,9 ± 78,0
Protein (mg/kg/h)	35,2 ± 3,9	23,9 ± 3,5*
Natrium (µmol/kg/h)	968,9 ± 170,6	865,7 ± 122,9
Kalium (µmol/kg/h)	201,0 ± 25,6	172,2 ± 20,4
cGMP (pmol/ml)	612,8 ± 107,3	1712,7 ± 264,5***

Tabelle 7: Renale Parameter der Placebogruppe und der mit BAY 58-2667-behandelten Gruppe. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$ BAY 58-2667-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe.

Am Ende der Studie wurden Blutproben entnommen und analysiert (Tabelle 8). Im Vergleich zur Placebogruppe wurde im Plasma der mit BAY 58-2667-behandelten Tiere deutlich weniger Harnsäure nachgewiesen. Im Vergleich zur Placebogruppe war die Konzentration der Alaninaminotransferase in der BAY 58-2667-Gruppe niedriger und die Konzentration von Albumin höher. Alle anderen Plasmaparameter waren durch die Behandlung mit BAY 58-2667 nicht signifikant verändert. In der BAY 58-2667-Gruppe konnte eine Plasmakonzentration von $216,7 \pm 2,1 \mu\text{g/l}$ BAY 58-2667 nachgewiesen werden.

Parameter (Einheit)	Placebo	BAY 58-2667
Creatinin ($\mu\text{mol/l}$)	$63,6 \pm 5,5$	$54,8 \pm 2,1$
Harnstoff (mmol/l)	$8,5 \pm 1,6$	$8,8 \pm 1,0$
Harnsäure ($\mu\text{mol/l}$)	$57,1 \pm 5,7$	$32,8 \pm 3,6^{***}$
CK(U/l)	$319,1 \pm 35,8$	$293,2 \pm 26,4$
LDH (U/l)	$597,5 \pm 86,7$	$471,4 \pm 65,8$
GLDH (U/l)	$17,3 \pm 3,6$	$21,8 \pm 2,6$
AST (U/l)	$86,9 \pm 8,3$	$82,9 \pm 6,2$
ALT (U/l)	$66,1 \pm 4,7$	$53,6 \pm 2,1^{**}$
AP (U/l)	$72,7 \pm 5,3$	$75,1 \pm 3,1$
Protein (g/l)	$67,8 \pm 1,3$	$68,8 \pm 1,4$
ALB (g/l)	$28,6 \pm 0,5$	$30,5 \pm 0,6^*$
ANP (pg/ml)	$287,2 \pm 51,0$	$231,6 \pm 36,9$
cGMP (pmol/ml)	$33,4 \pm 7,5$	$42,9 \pm 6,2$

Tabelle 8: Plasmaparameter der Placebogruppe und der BAY 58-2667-behandelten Tiere wurden in den zu Studienende entnommenen Blutproben bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM. CK: Creatininkinase; LDH: Laktatdehydrogenase; GLDH: Glutamatdehydrogenase; AST: Aspartataminotransferase; ALT: Alaninaminotransferase; AP: alkalische Phosphatase; ALB: Albumin; ANP: atriales natriuretisches Peptid. Es sind Mittelwerte \pm SEM aufgelistet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ BAY 58-2667-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe.

3.4.3 Organgewichte

In der 21. Woche nach Behandlungsbeginn wurde die Studie beendet und die Körpergewichte sowie die relativen Gewichte (bezogen auf das Körpergewicht) der Herzen, der linken und rechten Ventrikel sowie beider Nieren wurden ermittelt (Tabelle 9). Das relative Nierengewicht der BAY 58-2667-behandelten Tiere war deutlich geringer als das relative Nierengewicht der Placebotiere. Die relativen Herzgewichte am Studienende waren durch die Behandlung mit BAY 58-2667 jedoch nicht signifikant verändert.

Parameter (Einheit)	Placebo	BAY 58-2667
Herz (g/kg)	4,2 ± 0,1	4,0 ± 0,2
Linker Ventrikel (g/kg)	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Rechter Ventrikel (g/kg)	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,03
Linke Niere (g/kg)	4,9 ± 0,2	4,3 ± 0,1***
Rechte Niere (g/kg)	4,9 ± 0,1	4,3 ± 0,2**

Tabelle 9: Organgewichte der Placebogruppe und der BAY 58-2667-behandelten Tiere. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM und auf das Körpergewicht bezogen. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ BAY 58-2667-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe.

3.4.4 Profibrotische und proinflammatorische Biomarker

Die relative Genexpression der profibrotischen Biomarker Kollagen1 α 1, Fibronectin-1 (FN-1), Osteopontin (OPN), Tenascin-C (TNC) sowie des proinflammatorischen Markers „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) wurden in Niere und linkem Ventrikel mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt (Abbildung 21). Der profibrotische Marker „kidney injury molecule-1“ (KIM-1) ist ein nierenspezifischer Marker und nur in der Niere nachweisbar. In den Nieren der salzbelasteten Placebotiere war die relative Expression aller getesteten Biomarker im Vergleich zu den nicht-salzbelasteten Kontrolltieren deutlich erhöht. Durch die Behandlung mit BAY 58-2667 wurde die durch Salzbelastung hervorgerufene Erhöhung der relativen Genexpression der getesteten Marker in der Niere verhindert und blieb, mit Ausnahme von Osteopontin, auf dem Niveau der normotensiven Kontrolltiere. Im linken Ventrikel wurde die relative Expression der Biomarker durch die Salzbelastung deutlich erhöht. Der Einfluss der Salzbelastung bzw. der zusätzlichen BAY 58-2667-Behandlung auf die relative Expression von Kollagen1 α 1 war im Vergleich zu den anderen getesteten Biomarkern schwächer ausgeprägt. Die relative Expression der Biomarker war in der BAY 58-2667-Gruppe zwar geringer als in der salzbelasteten Placebogruppe, jedoch höher als in der nicht salzbelasteten Kontrollgruppe. Osteopontin wurde zusätzlich in Plasma und Urin gemessen (Abbildung 22). Auch hier wurden erhöhte Osteopontin-Spiegel in den Placebo-behandelten Tieren im Vergleich zu den normotensiven Kontrolltieren nachgewiesen. Im Urin und Plasma der BAY 58-2667-behandelten Tiere stiegen die Osteopontin-Konzentrationen zwar nicht so stark an wie in den Placebotieren, waren aber im Vergleich zu den Kontrolltieren im Urin erhöht. Im Plasma blieben die Osteopontin-Konzentrationen in der BAY 58-2667-Gruppe auf dem Niveau der normotensiven Kontrolltiere.

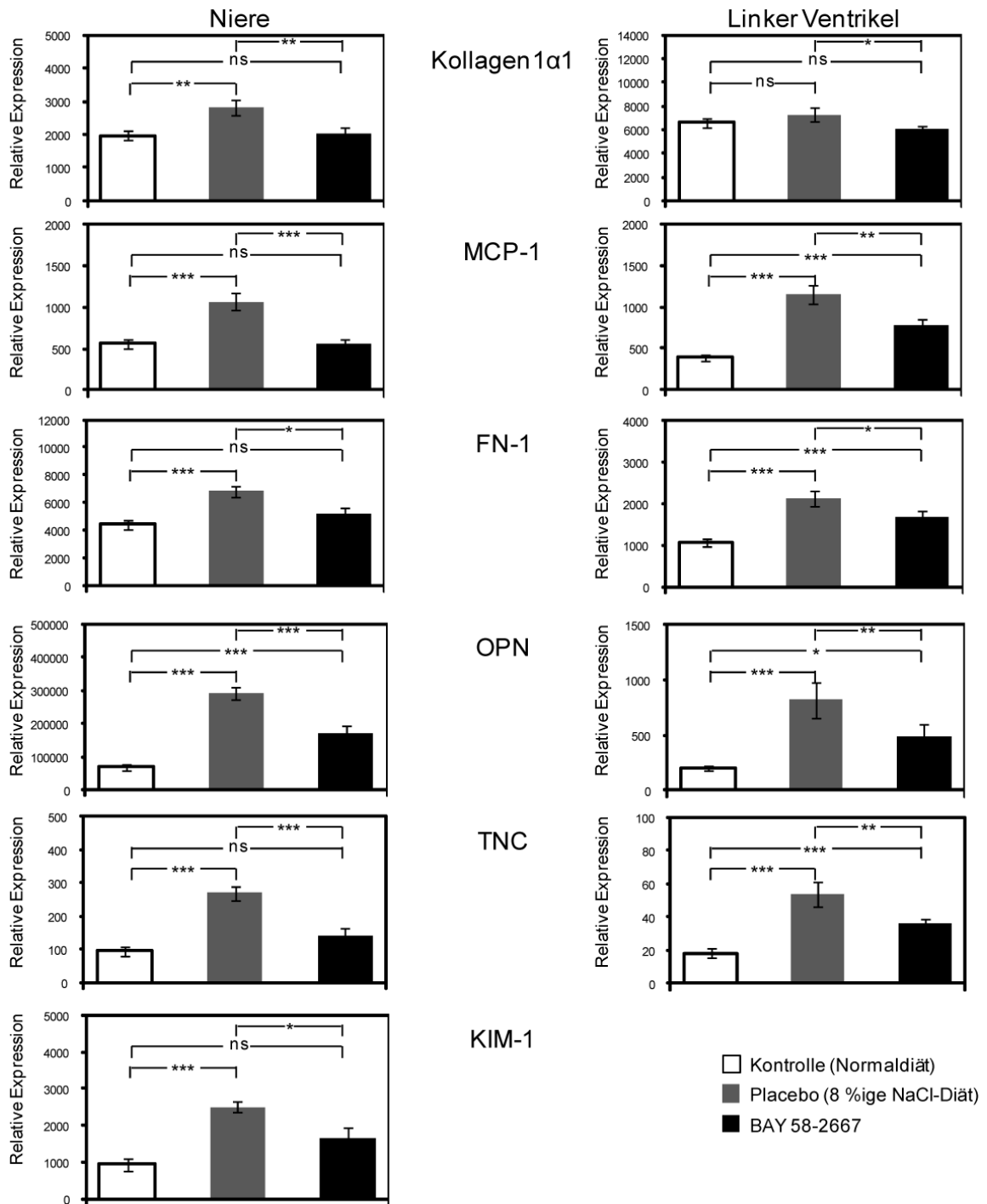


Abbildung 21: Relative Expression von Kollagen1α1, Fibronectin-1 (FN-1), Osteopontin (OPN), Tenascin-C (TNC), und „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) in Niere und linkem Ventrikel der Kontrolltiere, salzbelasteten Tiere der Placebogruppe und BAY 58-2667 behandelten Tiere. „Kidney injury molecule-1“ (KIM-1) wurde nur in den Nieren nachgewiesen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005 BAY 58-2667-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe; ns = nicht signifikant.

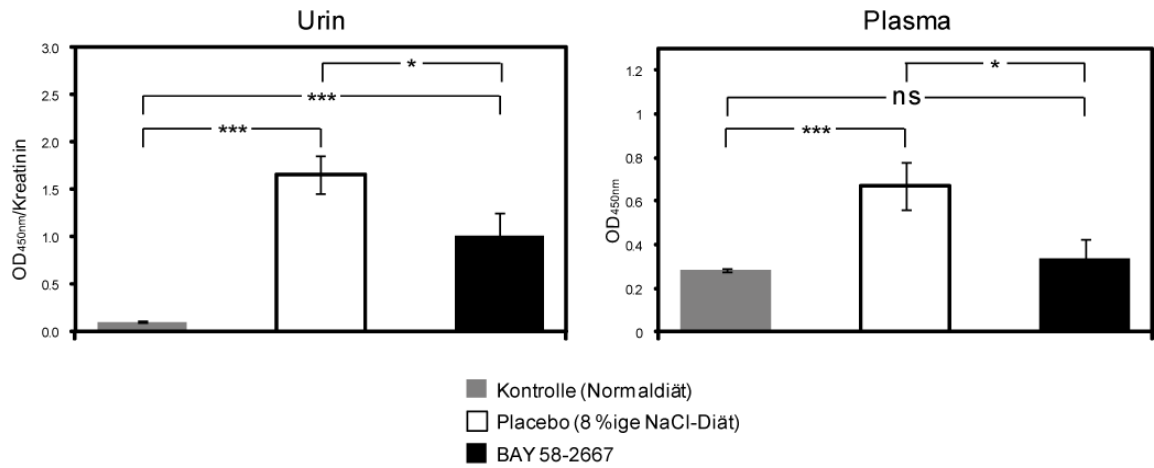


Abbildung 22: Osteopontin-Konzentrationen in Urin und Plasma der Kontrolltiere, salzbelasteten Tiere der Placebogruppe und BAY 58-2667-behandelten Tiere. Die Osteopontin-Konzentrationen im Urin wurden auf Creatinin normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; ns = nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1 Aktivierung und Stabilisierung der sGC unter hämoxidierenden Bedingungen

Der NO/sGC/cGMP-Signalweg spielt eine Schlüsselrolle im Herz-Kreislauf-System und seine Dysfunktion ist mit verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten assoziiert. Aktuelle Befunde legen nahe, dass erhöhter oxidativer Stress, wie man ihn unter pathophysiologischen Bedingungen beobachtet, mit einer Oxidation und letztendlich einem Verlust der Hämgruppe an der sGC einhergehen kann (Hobbs und Stasch, 2009; Schmidt *et al.*, 2009). Durch diese Veränderung wird das Enzym zur NO-insensitiven hämfreien sGC, und im Folgenden ubiquitiniert und schließlich proteasomal abgebaut (Stasch *et al.*, 2006; Meurer *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse könnten zumindest teilweise die verminderte sGC-Proteinlevel erklären, die in verschiedenen Tiermodellen für Herz-Kreislauf-Erkrankungen nachgewiesen wurden (Ruetten *et al.*, 1999; Kagota *et al.*, 2001; Melichar *et al.*, 2004). Wird die Hämbindungstasche jedoch von Substanzen, welche die räumliche Struktur und Ladungsverteilung des Häms nachbilden, besetzt, kann der Oxidation-induzierte Abbau der sGC *in vitro* verhindert werden (Stasch *et al.*, 2006). Dies wurde für das hochaffine Metalloporphyrin Zn-PPIX und den sGC-Aktivator BAY 58-2667 nachgewiesen (Stasch *et al.*, 2006; Meurer *et al.*, 2009). Kürzlich wurde von Schindler *et al.* (2006) ein weiterer hämunabhängiger sGC-Aktivator, HMR1766, identifiziert, der keine strukturelle Ähnlichkeit zu BAY 58-2667 aufweist. Beide aktivieren die hämfreie sGC und konkurrieren mit Metalloporphyrinen um die Bindung in der Hämtasche. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob HMR1766 direkt in der Hämtasche bindet und die sGC wie Zn-PPIX und BAY 58-2667 die sGC vor dem Oxidation-induzierten Abbau schützt. Um den generellen Mechanismus der sGC-Stabilisierung besser zu verstehen, wurden die molekularen Voraussetzungen der sGC-Aktivierung und Stabilisierung mit Hilfe der sGC-Aktivatoren BAY 58-2667 und HMR1766 und des Hämtaschenliganden Zn-PPIX untersucht. Als Kontrolle wurde der sGC-Stimulator BAY 41-2272 eingesetzt, der nicht mit der Hämtasche interagiert. Diese Untersuchungen wurden sowohl mit WT-sGC und hämfreie sGC überexprimierenden CHO-Zellen, den sogenannten cGMP-Reporterzellen, als auch mit primären Endothelzellen durchgeführt.

Zur Untersuchung der möglichen Interaktion von HMR1766 mit der sGC-Hämtasche wurden sGC-Aktivitätsmessungen und kompetitive Rezeptorbindungsstudien mit BAY 58-2667, HMR1766 und Zn-PPIX durchgeführt. Die Aktivitäts-

messungen am aufgereinigten Enzym zeigten eindeutig, dass das hochaffine Metalloporphyrin Zn-PPIX die BAY 58-2667- und HMR1766-induzierte sGC-Aktivierung inhibieren kann. Dies wies auf eine Interaktion von HMR1766 mit der Hämbindungs tasche hin, wie sie bereits in vorherigen Studien unabhängig für BAY 58-2667 und HMR1766 gezeigt wurde (Schmidt *et al.*, 2004; Schindler *et al.*, 2006; Stasch *et al.*, 2006). Die hier verwendete Konzentration von HMR1766 war höher als die von Schindler *et al.* (2006) benutzte Konzentration, wurde aber so gewählt um eine ähnliche sGC-Aktivierung durch HMR1766 und BAY 58-2667 zu gewährleisten (Hoffmann *et al.*, 2009). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Stasch *et al.* (2006) konnte die Bindung von BAY 58-2667 in der Hämbindungstasche auch mit den hier durchgeführten kompetitiven Rezeptorbindungsstudien nachgewiesen werden, da Zn-PPIX ³H-BAY 58-2667 vom Enzym verdrängte. Die Ergebnisse mit HMR1766 waren nicht ganz eindeutig zu interpretieren, da aufgrund der relativ niedrigen Affinität von HMR1766 zum Enzym eine vollständige Verdrängung von ³H-BAY 58-2667 durch HMR1766 am Enzym nicht möglich war. Dennoch wurde die Bindung von ³H-BAY 58-2667 durch hohe mikromolare Konzentrationen von HMR1766 auf 67 % gesenkt. Diese Ergebnisse zeigten, dass BAY 58-2667, HMR1766 und Zn-PPIX über die gleichen oder zumindest teilweise überlappende Bindungsstellen mit der Hämtasche interagieren.

Der Einfluss der Testsubstanzen auf die sGC-Proteinlevel nach Hämoxidation durch den sGC-Inhibitor ODQ wurde mit Hilfe von Western Blots untersucht. Eine Langzeitinkubation von Endothelzellen und WT-sGC-exprimierenden cGMP-Reporterzellen mit ODQ führte zu reduzierten Proteinleveln beider sGC-Untereinheiten, wie es schon zuvor in primären Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen aus Schweineaorten nachgewiesen wurde (Stasch *et al.*, 2006). Dieser Oxidation-induzierte Abbau wird deutlich, sobald die Inkubationszeit zwei Stunden übersteigt (Stasch *et al.*, 2006). Kurzzeitinkubationen zeigen hingegen keinen Einfluss auf die sGC-Proteinlevel (Stasch *et al.*, 2006). Übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (Stasch *et al.*, 2006) verhinderten BAY 58-2667 und Zn-PPIX den Oxidation-induzierten Abbau der sGC. Wie erwartet wurden die sGC-Proteinlevel in den untersuchten Zellen durch Inkubation mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 nicht verändert, da BAY 41-2272 nicht in der Hämtasche bindet. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die, der sGC nachgeschaltete, cGMP-abhängige Signalkaskade nicht zur Stabilisierung der sGC beiträgt. Die mit HMR1766 erzielten Ergebnisse waren unerwartet. Ungeachtet der Tatsache, dass BAY 58-2667 und HMR1766 anscheinend

mit der Hämtasche interagieren, hatte eine Inkubation mit HMR1766 keinerlei protektiven Effekt auf die sGC-Proteinlevel.

Die unterschiedlichen Proteinlevel unter Kontroll- und hämoxidierenden Bedingungen wurden durch Veränderungen in der sGC-Aktivität widerspiegelt. Eine Kurzzeitinkubation mit 10 μ M ODQ verstärkte die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung maximal. Dies zeigte, dass die Mehrheit der zellulären sGC in den hämfreien BAY 58-2667-aktivierbaren Zustand überführt wurde. Als Konsequenz der verminderten Proteinlevel war auch die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung nach Langzeitinkubation vermindert. In Lang- und Kurzzeit-inkubierten Zellen betrug die maximale BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung nur 64 % der sGC-Aktivierung nach Kurzzeitinkubation mit ODQ (entsprechend 82 zu 129-facher Aktivierung). Dies entsprach tendenziell der Reduktion der Proteinlevel auf 60 % der α_1 -sGC bzw. 36 % der β_1 -sGC.

BAY 41-2272 und HMR1766 waren nicht in der Lage den Oxidation-induzierten Abbau der sGC zu verhindern. Daher wurden ähnliche Ergebnisse für die BAY 41-2272- oder HMR1766-induzierte sGC-Aktivierung erwartet. Unter Kontrollbedingungen aktivierte BAY 41-2272 die sGC 115-fach. Durch die Kombination von Kurz- und Langzeitinkubation wurde diese sGC-Aktivierung auf 7 % gesenkt. Im Gegensatz zu BAY 41-2272 blieb die HMR1766-induzierte sGC-Aktivierung unverändert bzw. war im Vergleich zu Kontrollbedingungen nur leicht vermindert. Technische Limitationen könnten diese Diskrepanz hervorgerufen haben, da die starke sGC-Aktivierung durch hohe Konzentrationen von HMR1766 RLUs lieferte, die an der Detektionsgrenze des Messsystems lagen. Obwohl nach Zugabe von ODQ leicht erhöhte RLUs gemessen wurden als unter Kontrollbedingungen, konnte die erwartete maximale Aktivierung durch HMR1766 plus ODQ möglicherweise nicht gemessen werden. In Endothelzellen wurde nach Langzeitinkubation mit ODQ ein starker Anstieg der sGC-Aktivatoren-induzierten sGC-Aktivierung beobachtet. Hämfreie sGC wird von sGC-Aktivatoren aktiviert und der Hämverlust in nur einem kleinen Anteil des sGC-Pools ist ausreichend für einen starken Anstieg der BAY 58-2667-induzierten cGMP-Spiegel (Stasch *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2008). Die Proteinlevel in BAY 41-2272- und ODQ-inkubierten Endothelzellen nahmen um ungefähr 50 % ab und spiegeln so tendenziell die verminderte sGC-Aktivität unter hämoxidierenden Bedingungen wider. In den cGMP-Reporterzellen wurde die sGC-Aktivität sogar in größerem Ausmaß vermindert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BAY 58-2667 und Zn-PPIX, aber nicht BAY 41-2272, die sGC vor Oxidation-induziertem Abbau schützen. Die gemessene sGC-Aktivität spiegelte die verminderten sGC-Proteinlevel wider. Bedeutend war, dass die beiden sGC-Aktivatoren ein unerwartet unterschiedliches Profil im Hinblick auf sGC-Proteinlevel und sGC-Aktivität zeigten. Die beiden hämunabhängigen sGC-Aktivatoren BAY 58-2667 und HMR1766 aktivierten die sGC sowohl unter Kontroll- als auch unter hämoxidierenden Bedingungen. Jedoch war nur BAY 58-2667 in der Lage das Enzym vor dem Oxidation-induzierten Abbau zu schützen. Diese molekulare Eigenschaft könnte dadurch erklärt werden, dass beide sGC-Aktivatoren über nicht identische aber überlappende Bindungsstellen in der Hämtasche binden und HMR1766 keine oder deutlich weniger strukturelle Ähnlichkeit mit dem Häm besitzt als BAY 58-2667. Die sGC-stabilisierenden Liganden BAY 58-2667 und Zn-PPIX haben eine dem Häm sehr ähnliche räumliche Struktur und binden mit höherer Affinität an die Hämbindungsstelle als die native prosthetische Gruppe. Des Weiteren konnte durch Mutationsanalysen und Strukturmodelle gezeigt werden, dass beide Liganden mit den hämbindenden Aminosäuren Y135 und R139 der β_1 -Untereinheit der sGC interagieren (Schmidt *et al.*, 2004).

Um die Interaktion der beiden sGC-Aktivatoren BAY 58-2667 und HMR1766 mit der Hämbindungsstelle zu untersuchen, wurden die Aktivitätsprofile der beiden Substanzen mit sGC-Mutanten aufgenommen, von denen bekannt ist, dass sie die Hämbindung beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die Mutation H105F des axialen Hämliganden zur Expression eines hämfreien Enzyms führt, das mit Porphyrinen rekonstituiert werden konnte (Schmidt *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu ist eine Rekonstitution mit PPIX bei der Doppelmutante β_1 Y135A/R139A-sGC, welcher die essentiellen Hämbindungspartner fehlen, nicht möglich (Schmidt *et al.*, 2004). Der Verlust der BAY 58-2667-Wirkung an der Doppelmutante deutete darauf hin, dass beide Aminosäuren als Interaktionspartner für BAY 58-2667 unerlässlich sind (Schmidt *et al.*, 2004). Die Doppelmutante α_1/β_1 Y135A/R139A wurde benutzt, um zu untersuchen, ob BAY 58-2667 und HMR1766 die sGC aktivieren, indem sie mit diesen Aminosäuren innerhalb des Hämbindungsmotivs interagieren (Schmidt *et al.*, 2004). Die Ergebnisse der sGC-Aktivitätsmessungen in cGMP-Reporterzellen, welche diese sGC-Varianten exprimierten, zeigten, dass HMR1766 und BAY 58-2667 nicht mit denselben Aminosäureresten interagieren. Obwohl die H105F-Mutante stark von BAY 58-2667 aktiviert wurde, war BAY 58-2667 nicht in der Lage die Doppelmutante α_1/β_1 Y135A/R139A zu aktivieren. Im Gegensatz dazu aktivierte HMR1766 die

Doppelmutante ohne jedoch das maximale Aktivierungsniveau zu erreichen. Diese Daten weisen daraufhin, dass Y135 und R139 die Bindung von HMR1766 nicht in gleichem Maße beeinflussen wie die Bindung von BAY 58-2667 oder des Häms. Zhou *et al.* (2008) benutzten „Docking“-Simulationen, die auf der Struktur von *Nostoc sp.* basierten, um mögliche Regionen zu identifizieren, über die HMR1766 mit der sGC interagiert. Im Widerspruch zu unseren, in lebenden Zellen generierten Ergebnissen, postulierten die Autoren Y135 und R139 als Bindungspartner von HMR1766 und schlugen eine BAY 58-2667-ähnliche Bindung vor.

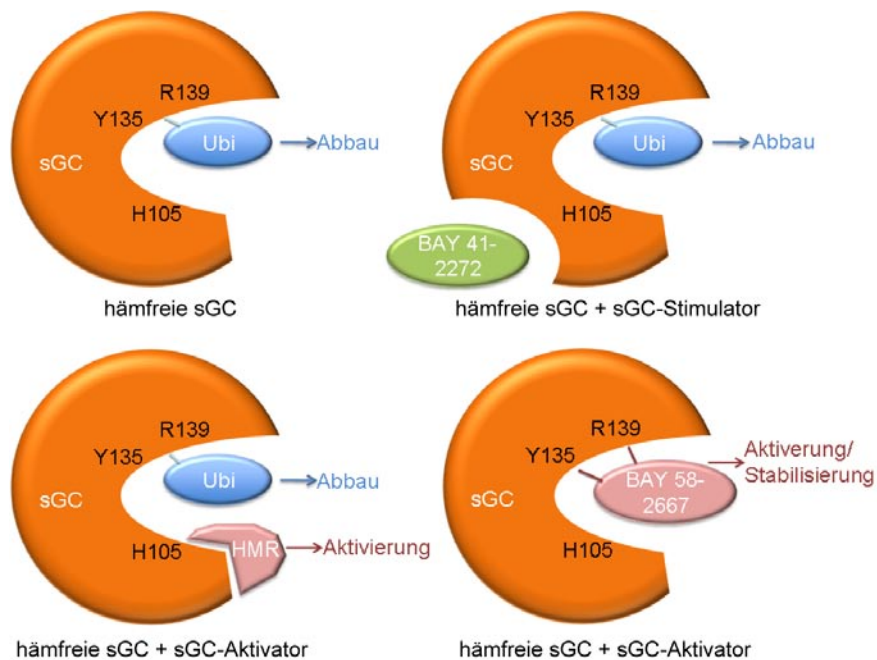


Abbildung 23: Beteiligung der sGC-Hämgruppe und sGC-bindender Substanzen am Schutz der sGC vor oxidativem Abbau. Der sGC-Aktivator BAY 58-2667 stabilisiert die sGC unter hämoxydierenden Bedingungen, wie zum Beispiel oxidativem Stress, indem es mit den Hämankeraminosäuren Y135 und R139 interagiert und die räumliche Struktur der Hämgruppe nachbildet. BAY 58-2667 schützt die sGC so vor Oxidation-induziertem Abbau. Im Gegensatz dazu können die Bindung des sGC-Aktivators HMR1766 oder des sGC-Stimulators BAY 41-2272 die sGC nicht stabilisieren und die hämfreie sGC wird daher ubiquitiniert und abgebaut (Hoffmann *et al.*, 2009).

Die durchgeführte Rezeptorbindungsstudie zeigte, dass HMR1766 nur in hohen Konzentrationen mit BAY 58-2667 konkurriert, wohingegen BAY 58-2667 leicht von geringen Mengen Zn-PPIX verdrängt wird. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass HMR1766 mit einer anderen Bindungsstelle interagiert als BAY 58-2667, obwohl ihre Bindungsstellen möglicherweise teilweise überlappen. Aufgrund dieser Befunde liegt die Hypothese nahe, dass die unterschiedliche Bindungsart in der Hämtasche für die Unterschiede bezüglich der Schutzfunktion von BAY 58-2667 und HMR1766 verantwortlich ist. Durch Western Blot-Analysen mit den oben

beschriebenen hämfreien Mutanten wurde deutlich, dass die Schutzfunktion von BAY 58-2667 durch die hämähnliche Besetzung der Hämtasche vermittelt wird. Die Schutzfunktion wurde nur für Wildtyp- und β_1 H105F-sGC, die auch beide von BAY 58-2667 aktiviert werden, beobachtet, aber nicht für β_1 Y135A/R139A-sGC, die weder von BAY 58-2667 aktiviert wird, noch mit PPIX rekonstituiert werden kann (Schmidt *et al.*, 2004). HMR1766 wurde in diesen Experimenten nicht verwendet, da das Fehlen der Schutzfunktion schon in Wildtyp-sGC exprimierenden Zellen und der unterschiedliche Bindungsmechanismus durch die Aktivitätsmessung in α_1/β_1 Y135A/R139A-exprimierenden Zellen nachgewiesen wurde.

Ein weiterer Unterschied wird durch einen Vergleich der α_1 - und β_1 -Proteinlevel deutlich: Der Oxidation-induzierte Abbau der α_1 -Untereinheit wurde durch BAY 58-2667 und Zn-PPIX nicht im gleichen Maße verhindert wie der Abbau der β_1 -Untereinheit. Aufgrund der Daten mit der β_1 H105F-sGC und dem bekannten Wirkmechanismus von ODQ ist es vorstellbar, dass vor allem die hämhaltige β_1 -Untereinheit durch Oxidation beeinflusst wird; denn die Inkubation von β_1 H105F-sGC-exprimierenden Zellen mit ODQ führte nicht wie in Wildtyp-sGC-exprimierenden Zellen zu einer signifikanten Verminderung der sGC-Proteinlevel. Übereinstimmend mit Stasch *et al.* (2006) kann daher angenommen werden, dass der physiologische Umsatz der α_1 -sGC nicht direkt von einer fehlenden Hämbindung beeinflusst wird. Daher sind alle Veränderungen, die mit dem Hämverlust an der β_1 -Untereinheit einhergehen, vermutlich indirekter Natur. Die beobachteten Veränderungen der α_1 -sGC-Proteinlevel werden wahrscheinlich vielmehr durch einen posttranskriptionalen Regulationsmechanismus hervorgerufen, ähnlich wie er für α_1 - und α_2 -Knockout Mäuse beschrieben wurde (Mergia *et al.*, 2006). Hier führte die Deletion der α -Untereinheiten zu einer begleitenden Abnahme der β_1 -Proteinlevel. Darüber hinaus konnten Friebe *et al.* (2007) zeigen, dass β_1 -Knockout Mäuse keine α_1 -Untereinheit aufweisen. Es kann daher angenommen werden, dass die hier beobachteten Veränderungen einem ähnlichen Mechanismus unterliegen, der zu einer Abnahme der α_1 -Proteinlevel führt, wenn die β_1 -Untereinheit aufgrund des Hämverlustes vermindert wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass BAY 58-2667 und Zn-PPIX, nicht aber BAY 41-2272 oder HMR1766, den Oxidation-induzierten Abbau der sGC verhindern. Die Schutzfunktion von BAY 58-2667 basiert auf der hochaffinen Bindung an die Hämbindungstasche. BAY 58-2667 bildet dabei die räumliche Struktur der

nativen prosthetischen Gruppe nach und interagiert mit den Hämkeraminsäuren Y135 und R139. HMR1766 weist diese Eigenschaften nicht auf und kann deshalb in eine andere Gruppe von sGC-Aktivatoren eingeordnet werden als BAY 58-2667. Die Ergebnisse dieses Teils sind in Abbildung 23 zusammengefasst. BAY 58-2667 ist damit nach heutigem Wissen der erste pharmakologische Ligand, der sein Zielprotein gleichzeitig aktiviert und vor Oxidation-induziertem Abbau schützt. Da kardiovaskuläre Erkrankungen mit erhöhten Spiegeln von oxidativem Stress assoziiert sind, kann angenommen werden, dass die relative Menge an hämfreier sGC unter pathologischen Bedingungen erhöht ist. Diese Annahme unterstützend wiesen die Ergebnisse einer klinischen Studie mit Patienten mit akut dekompensierter Herzinsuffizienz darauf hin, dass auch in Menschen ein Pool hämfreier sGC existiert (Schmidt *et al.*, 2009). Dieses Ungleichgewicht würde in verminderte sGC-Proteinlevel übersetzt werden, da das hämfreie Enzym in erhöhtem Maße abgebaut würde. Die hier beschriebenen stabilisierenden Eigenschaften von BAY 58-2667 könnten dazu beitragen dieses gestörte Gleichgewicht auszugleichen, indem die sGC vor dem Abbau geschützt wird, und könnten so zu einer therapeutischen Wirkung beitragen. Momentan laufende pharmakologische und klinische Studien mit sGC-Aktivatoren werden mehr Informationen über die klinische Effizienz dieses neuen Therapieprinzips bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen liefern.

4.2 *In vitro*-Detektion der hämfreien sGC durch Fluoreszenzdequenching

Die Ergebnisse vieler Untersuchungen weisen daraufhin, dass eine hämfreie Form der sGC unter physiologischen Bedingungen existiert und dass ihr Anteil in pathophysiologischen Situationen, die mit einer erhöhten ROS-Produktion einhergehen, ansteigt (Hobbs und Stasch, 2009). Obwohl Fluoreszenz- und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-basierende Methoden dazu verwendet wurden, die intrazelluläre cGMP-Konzentration und Verteilung darzustellen (Nikolaev und Lohse, 2009), gab es bisher keine Methode zur direkten intrazellulären Untersuchung des sGC-Hämgehaltes. Die Existenz der hämfreien sGC in lebenden Zellen und ihre Regulation stehen daher immer noch im Fokus des wissenschaftlichen Interesses und konnten bisher nicht in intakten Zellen untersucht werden. Im reduzierten Fe²⁺-Zustand weist die Hämgruppe ein charakteristisches UV/Vis-Spektrum mit einer charakteristischen Soret-Bande bei 431 nm auf (Schmidt *et al.*, 2004).

Durch ihre optischen Eigenschaften kann die Hämgruppe die Fluoreszenz anderer Fluorophore quenchen, falls sich die Spektren des Fluorophors und des Häms

überlappen. Diese spektrale Eigenschaft wurde bereits in vielen Studien verwendet, um Konformationsänderungen von Hämproteinen zu untersuchen. Kosarikov *et al.* (2001) untersuchten Konformationsänderungen der sGC mit Hilfe der intrinsischen Fluoreszenz von Tryptophanen, von der sie zeigen konnten, dass sie durch Zugabe von NO abnimmt. Durch die Bindung von NO kommt es zu Konformationsänderungen und zur Verschiebung der Soret-Bande. Die Autoren nahmen an, dass die intrinsische Fluoreszenz der Tryptophane nach Bindung von NO zu einem gewissen Anteil durch die Hämgruppe gequencht wird. Andere Arbeiten zeigten, dass die Fluoreszenz von „green fluorescent protein“ (GFP) in Cytochrom-GFP-Fusionsproteinen gequencht wurde, wenn das hämfreie Enzym mit Hämin rekonstituiert wurde (Takeda *et al.*, 2001; Yantsevich *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Cytochrom P450_{scc} gezeigt, dass die Fluoreszenz von FITC sehr effektiv durch das Häm gequencht wurde und auf diese Weise sogar Veränderungen des Redoxzustandes des Häms sichtbar gemacht werden konnten (Lepesheva *et al.*, 1999).

Die Fähigkeit des Häms, die Fluoreszenz anderer Chromophore zu quenchen, ist daher eine elegante Möglichkeit, den Hämgehalt von Proteinen zu untersuchen. Da die intrinsische Tryptophanfluoreszenz nur bei aufgereinigten Proteinen angewendet werden kann, musste die sGC mit einem Fluorophor markiert werden, um die Fluoreszenzintensität als Marker für den Hämgehalt der sGC zu nutzen. Es sollte kein Fusionsprotein wie GFP verwendet werden, da es aufgrund seiner Größe möglicherweise die Faltung der sGC stören könnte. Andere Fluorophore wie FITC können zwar sehr gut zur Markierung von Proteinen eingesetzt werden, allerdings reagieren ihre reaktiven Gruppen unspezifisch mit allen Proteinen, wodurch eine spezifische Markierung der sGC in lebenden Zellen ausgeschlossen wäre. Um diese Hürde zu umgehen, wurden die biarsenischen Farbstoffe „fluorescein arsenical helix binder“ (FIAsH) und „resorufin arsenical helix binder“ (ReAsH) benutzt (Griffin *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2002). Die Vorteile dieser Farbstoffe liegen in ihrer relativ geringen Größe (sie beträgt weniger als 700Da; zum Vergleich, GFP ist 27 kDa groß; Zhang *et al.*, 2002), sie sind zellpermeabel und binden mit hoher Affinität an ein kurzes Tetracysteinmotiv (TC, CCPGCC), das leicht mittels Mutagenese in verschiedene Proteine integriert werden kann (Griffin *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2002). Ein besonderer Vorteil von FIAsH und ReAsH ist, dass sie nicht fluoreszieren solange sie mit 1,2-Ethandithiol komplexiert sind. Ihre Fluoreszenz steigt jedoch um das 50.000-fache an, sobald sie an das TC-Motiv ihres Zielproteins binden (Adams *et al.*, 2002). Aufgrund dieser vorteilhaften Eigenschaften wurden FIAsH und ReAsH bisher in

vielfältigen Fluoreszenz-Anwendungen in Säugerzellen, Pflanzen und Pilzen eingesetzt (Estevez und Somerville, 2006; Hwang *et al.*, 2009). Der Transport und die Neusynthese von Proteinen wurden mit Hilfe der biarsenischen Farbstoffe untersucht (Gaietta *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2009). Des Weiteren wurden Konformationsänderungen von Calmodulin und fehlgefalteten Proteinen mittels ReAsH und FIAsh detektiert (Liu *et al.*, 2006; Luedtke *et al.*, 2007). Zur Analyse der G-Proteingekoppelten Rezeptoraktivierung der Proteinkinase C wurde das FRET-Paar „cyan fluorescent protein“ (CFP)/FIAsh benutzt (Hoffmann *et al.*, 2005; Zürn *et al.*, 2009; Jost *et al.*, 2008).

Die Grundlage für die hier beschriebenen Versuche bildete die Hypothese, dass die FIAsh-Fluoreszenz durch die Hämgruppe aufgrund ihrer teilweise überlappenden Spektren gequenchet wird. Obwohl das Emissionsspektrum von FIAsh nicht mit der Soret-Bande des Hämspektrums überlappt, ist ein Quenching der FIAsh-Fluoreszenz dennoch möglich, da die α und β Absorptionsbänder mit dem Emissionsspektrum von FIAsh überlappen (Abbildung 2). In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ähnliche spektrale Überschneidungen ausreichend für einen effizienten Energietransfer sind, der zum Fluoreszenzquenching führt (Takeda *et al.*, 2001; Kuznetsova *et al.*, 2006; Davydov *et al.*, 2008). Nach Behandlung mit Oxidantien sollte die FIAsh-Fluoreszenz zunehmen, da eine Hämoxydation zu einer hämfreien sGC führt.

Eine Voraussetzung für die Etablierung der Fluoreszenzdequenching-Methode war das Vorhandensein der Hämgruppe unter Kontrollbedingungen. Von allen getesteten sGC-Varianten zeigte nur die TC4-WT-sGC ein WT-ähnliches Aktivierungsprofil. Die Hämgruppe wurde durch niedrigere Konzentrationen von NS 2028 und Rotenon als von ODQ entfernt. Deshalb wurde in den weiteren Untersuchungen nur das wirkstärkere ODQ-Derivat NS 2028 sowie Rotenon eingesetzt, um einerseits den Einfluss eines sGC-Inhibitors, der direkt die Hämgruppe oxidiert, und andererseits einer ROS-induzierenden Substanz zu untersuchen. 90-minütige Inkubation mit NS 2028 und Rotenon erhöhte den Anteil hämfreier sGC in TC4-WT-sGC exprimierenden Zellen.

Im Vergleich zur Kontrolle führte eine 90-minütige Inkubation mit NS 2028 oder Rotenon zu einer deutlich gesteigerten verbliebenen Fluoreszenzintensität. Dieses Ergebnis wies daraufhin, dass die Inkubation mit den Oxidantien zu einem Hämverlust an der sGC führt, der durch das Dequenching der FIAsh-Fluoreszenz sichtbar wurde.

Dieser Hämverlust wurde mit Hilfe der sGC-Proteinlevel überprüft. Verminderte sGC-Proteinlevel können als Marker für den Verlust der Hämgruppe an der sGC dienen, da hämfreie sGC ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird (Stasch *et al.*, 2006; Meurer *et al.*, 2009). Durch Inkubation mit Rotenon nahmen die Proteinlevel beider sGC-Untereinheiten ab. Die Inkubation der Zellen mit NS 2028 führte auch zum Abbau der α_1 - und β_1 -Untereinheiten, allerdings war dieser weniger stark ausgeprägt als in vorherigen Arbeiten und nach 24-stündiger Inkubation mit ODQ (Stasch *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2009; Meurer *et al.*, 2009). Dennoch war die BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung nach 90-minütiger Inkubation mit NS 2028 oder Rotenon vermindert und spiegelte somit die verminderten Proteinlevel wieder. Dies stimmt mit den oben beschriebenen Ergebnissen nach 24-stündiger Inkubation mit ODQ überein.

Der beobachtete Oxidation-induzierte Abbau und die Aktivitätsmessungen wiesen daraufhin, dass eine Inkubation mit NS 2028 und Rotenon zu einem Anstieg der hämfreien sGC führte. Diese Befunde sind ein Indiz dafür, dass die beobachteten Anstiege der verbliebenen Fluoreszenzintensität tatsächlich durch den Hämverlust an der sGC hervorgerufen wurden. Um diese Hypothese weiter zu stützen wurde die Fluoreszenzdequenching-Methode mittels einer hämfreien TC4-sGC-Variante und ReAsH weiter validiert. Die Doppelmutation Y135A/R139A wurde in die TC4-WT-sGC eingefügt, da diese Mutation zur Expression hämfreier sGC führt (Schmidt, *et al.*, 2004), die, im Gegensatz zur ebenfalls hämfreien β_1 H105F-sGC, nicht mit Protoporphyrin rekonstruiert werden kann. Dadurch war es möglich zu untersuchen, ob die Zunahme der residualen Fluoreszenzintensität auf den Hämverlust zurückzuführen war. Tatsächlich wurde die verbliebene Fluoreszenzintensität von TC-Y135A/R139A-sGC nicht durch 90-minütige Inkubation mit NS 2028 beeinflusst. Weiterhin wurde ReAsH benutzt, um zu überprüfen, ob das Fluoreszenzdequenching durch die überlappenden Spektren von FIAsH und der Hämgruppe hervorgerufen wurde. Das Emissionsspektrum von ReAsH überlappt nahezu nicht mit dem Absorptionsspektrum des Häms. Daher sollte kein Dequenching der ReAsH-Fluoreszenz nach dem Verlust der Hämgruppe an der sGC festzustellen sein. Eine 90-minütige Inkubation ReAsH-gelabelter TC4-WT-sGC-exprimierender Zellen mit NS 2028 beeinflusste die verbliebene Fluoreszenzintensität nicht. ReAsH bleichte weniger stark als FIAsH. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurde zuvor nachgewiesen, dass rote Fluoreszenz stabiler gegenüber Bleicheffekten ist als grüne Fluoreszenz (Baird *et al.*, 2000). Durch die Verwendung von TC4-Y135A/R139A-sGC und ReAsH und konnte somit nachgewiesen werden, dass der Anstieg der FIAsH-Fluoreszenz nach

Behandlung mit Oxidantien durch den Verlust der Hämgruppe an der sGC und einhergehendem Fluoreszenz-dequenching hervorgerufen wurde.

Ein möglicher Kritikpunkt der hier gezeigten Ergebnisse ist sicherlich, dass der Anstieg der verbliebenen Fluoreszenzintensität nur durch 90-minütige Inkubation mit den höchsten Konzentrationen an NS 2028 und Rotenon beobachtet werden konnte. Leider war es nicht möglich die Zellen länger als 90 min zu inkubieren, da sich die Zellen bei längeren Messzeiten vom Objektträger ablösten und dadurch eine Messung unmöglich wurde. Wie bereits oben beschrieben, gab es in der Arbeit von Stasch *et al.* (2006) Hinweise auf eine Zeitabhängigkeit des Oxidation-induzierten Abbaus der sGC, da verminderte Proteinlevel nur nachgewiesen werden konnten, wenn die Inkubationszeit mit ODQ zwei Stunden überstieg. Es kann daher angenommen werden, dass der Verlust der Hämgruppe an der sGC erst nach einer gewissen Inkubationszeit mit einem Oxidanz stattfindet oder nachdem die sGC eine bestimmte Zeit im oxidierten Zustand war. Aufgrund der hier dargestellten sGC-Aktivitätsmessungen kann jedoch erwartet werden, dass schon zu früheren Zeitpunkten hämfreie sGC vorliegt. Möglicherweise ist die Fluoreszenzdequenching-Methode unter den hier angewendeten Bedingungen nicht sensitiv genug, um diese geringen Veränderungen sichtbar zu machen. Weitere Anpassungen der Versuchsbedingungen sollten längere Messungen nach längeren Inkubationszeiten mit größerer Sensitivität der Methode möglich machen. Die Fluoreszenzdequenching-Methode könnte so zur weiterführenden Untersuchung des Übergangs von oxidiertem zu hämfreier sGC verwendet werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, den Hämgehalt der sGC in lebenden Zellen direkt nachzuweisen. Die Fluoreszenzintensität FIAsh-gelabelter sGC konnte nach Zugabe des sGC-Inhibitors NS 2028 und der ROS-induzierenden Substanz Rotenon in transient transfizierten CHO-Zellen gemessen werden. Im Vergleich zur Kontrolle führten beide Substanzen zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dies konnte weder in der mit ReAsH-gelabelten Negativkontrolle noch bei hämfreier sGC beobachtet werden. Die direkten Fluoreszenzmessungen wurden mit sGC-Aktivitätsmessungen und Untersuchungen der sGC-Stabilität, als weiterer Marker für den Hämverlust, belegt. Zusammenfassend ist die hier vorgestellte Fluoreszenzdequenching-Methode der erste experimentelle Ansatz zur direkten Detektion von hämfreier sGC in lebenden Zellen. Mit Hilfe der Fluoreszenzdequenching-Methode könnte es in Zukunft möglich sein, neue Einblicke in die

Redoxregulation der sGC unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu erlangen.

4.3 ¹⁴C-BAY 58-2667-Ganzkörper-Autoradiographie zum indirekten *in vivo*-Nachweis der hämfreien sGC

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Fluoreszenzdequenching-Methode, die es ermöglicht die hämfreie sGC in einzelnen lebenden Zellen nachzuweisen, sollte mit der Ganzkörper-Autoradiographie versucht werden die hämfreie sGC indirekt *in vivo* nachzuweisen. Mittels Ganzkörper-Autoradiographien kann die Verteilung einer Substanz durch Radioaktivität im Körper sichtbar gemacht werden. In einer ersten Studie wurden gesunde Ratten benutzt, die mit ODQ vorbehandelt wurden, um die sGC in den Zellen der Tiere zu oxidieren und dadurch den Verlust des Häms an der sGC zu induzieren. *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass BAY 58-2667 den mittleren arteriellen Blutdruck in ODQ-vorbehandelten Ratten stärker senkt als in nicht vorbehandelten Kontrolltieren (Stasch *et al.*, 2006). Da BAY 58-2667 selektiv die hämfreie sGC aktiviert, weisen diese Befunde daraufhin, dass eine Behandlung mit ODQ auch *in vivo* zum Verlust der Hämgruppe an der sGC führt. Mit Hilfe von ODQ konnte hier getestet werden, ob die Verschiebung des Redoxgleichgewichtes der sGC hin zur hämfreien Form in der Ganzkörper-Autoradiographie sichtbar gemacht werden kann. Mit der Ganzkörper-Autoradiographie konnte in dieser Studie ausschließlich Radioaktivität nachgewiesen werden, die von ¹⁴C-BAY 58-2667, seinen radioaktiven Metaboliten oder der proteingebundenen Fraktion ausgehen kann. Es kann jedoch angenommen werden, dass der Anteil an Metaboliten und proteingebundenem ¹⁴C-BAY 58-2667 bei allen Tieren gleich ist. Da BAY 58-2667 selektiv an die hämfreie sGC bindet (Stasch *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2008), sollte in Ganzkörper-Autoradiographien mit ¹⁴C-BAY 58-2667 überall dort, wo im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren mehr angereicherte Radioaktivität nachzuweisen ist, auch mehr hämfreie sGC vorliegen. Im Vergleich zu nicht vorbehandelten Tieren reichte sich in den Organen der mit ODQ vorbehandelten Tiere deutlich mehr Radioaktivität an. 15 min nach i.v. Gabe von 100 µg/kg ¹⁴C-BAY 58-2667 konnte eine 3,6-fach höhere Radioaktivität im Nierenkortex und eine 2,7-fach höhere Radioaktivität in der Lunge des mit ODQ-behandelten Tieres im Vergleich zum nicht vorbehandelten Tier nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass mit der Ganzkörper-Autoradiographie die hämfreie sGC nach ODQ-Behandlung indirekt mit Hilfe von ¹⁴C-BAY 58-2667 nachgewiesen werden kann.

In einer zweiten Studie sollte in einem Tiermodell für Bluthochdruck untersucht werden, ob die Ganzkörper-Autoradiographie auch dazu genutzt werden kann, die hämfreie sGC unter pathologischen Bedingungen indirekt nachzuweisen. In dieser Studie wurden salzsensitive Dahl/ss Ratten verwendet. Durch eine Diät mit 8 % NaCl entwickeln diese Tiere Bluthochdruck, der mit oxidativem Stress assoziiert ist (Meng *et al.*, 2003). Dieser pathogene Risikofaktor zeichnet sich durch erhöhte ROS-Spiegel aus, und schädigt den NO/sGC/cGMP-Signalweg unter anderem durch eine Verminderung der verfügbaren NO Spiegel, da NO mit dem ROS O_2^- zu dem starken Oxidanz Peroxynitrit reagiert (McIntyre *et al.*, 1999). Peroxynitrit kann die Hämgruppe der sGC oxidieren, was letztlich zum Verlust der Hämgruppe an der sGC führt (Evgenov *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2009). An normotensiven und hypertensiven Dahl/ss Ratten sollte untersucht werden, ob aufgrund des hohen oxidativen Stresses größere Mengen hämfreier sGC in den hypertensiven Tieren im Vergleich zu den normotensiven Tieren nachweisbar sind.

Der Vergleich der Ganzkörper-Autoradiographien der normotensiven und der hypertensiven Tieren zeigt, dass sich in den Organen der kranken Tiere deutlich mehr Radioaktivität anreicherte. Diese Abbildungen können somit als bildliche Unterstützung der Hypothese dienen, dass der mit einer experimentellen Hypertonie assoziierte oxidative Stress mit einem erhöhten Anteil hämfreier sGC einhergeht. Der Vergleich der mit ODQ vorbehandelten Tiere zeigt so gut wie keinen Unterschied. Nach ODQ-Behandlung ist in beiden Tieren somit ein gleichgroßer Pool an hämfreier sGC vorhanden. Auch wenn die hier vorgestellte Studie lediglich als Pilotstudie mit nur sehr wenigen Tieren durchgeführt wurde, konnte mit der Ganzkörper-Autoradiographie eine Methode gefunden werden, die hämfreie sGC *in vivo* indirekt sichtbar macht. Zur weiteren Validierung sind Untersuchungen mit größeren Tierzahlen notwendig. Durch den einzigartigen Bindungsmechanismus von BAY 58-2667 an die hämfreie sGC war es hier jedoch zum ersten Mal möglich die Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zur hämfreien sGC hin in einem Krankheitsmodell bildlich darzustellen.

4.4 Langzeitaktivierung der hämfreien sGC in hypertensiven Ratten

Die Ergebnisse der Ganzkörper-Autoradiographie wiesen daraufhin, dass im Vergleich zu normotensiven Tieren in hypertonen Dahl/ss Ratten mehr hämfreie sGC vorhanden ist. Damit liefern die Dahl/ss Ratten ein geeignetes Modell zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung einer Langzeitaktivierung hämfreier sGC durch BAY 58-2667. Dazu wurde eine Langzeitstudie über 21 Wochen mit NaCl-belasteten Dahl/ss Ratten

durchgeführt, die zusätzlich BAY 58-2667 oder Placebo erhielten. Unter der erhöhten Salzzufuhr werden Dahl/ss Ratten hyperten und zeigen mit dem Bluthochdruck assoziierte Nierenschädigungen (Stasch *et al.*, 1997). Oxidativer Stress ist an der Entwicklung von Bluthochdruck und den einhergehenden Nierenschädigungen beteiligt (Meng *et al.*, 2003, Taylor *et al.*, 2006). Unterstützt wurden diese Befunde auch von Simchon *et al.* (1996), die eine verminderte NO-Sensitivität der sGC in Nieren von salzbelasteten Dahl/ss Ratten nachwies, möglicherweise als Folge eines erhöhten Anteils an hämfreier sGC im Vergleich zu den entsprechenden gesunden Tieren.

Durch die orale Behandlung mit BAY 58-2667 wurde der in der Placebogruppe beobachtete Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz signifikant vermindert. Auch in anderen experimentellen Tiermodellen wurde eine Senkung des Blutdrucks durch chronische orale Gabe von BAY 58-2667 beobachtet (Stasch *et al.*, 2002c; Kalk *et al.*, 2006; Dumitrascu *et al.*, 2006; Boerrigter *et al.*, 2007). Besonders deutlich zeigte sich der therapeutische Effekt der BAY 58-2667-Behandlung in der Mortalitätsrate, die in der behandelten Gruppe im Vergleich zu der Placebogruppe signifikant gesenkt war.

Einen Hinweis auf eine Volumenentlastung des Herzens liefern die verminderten ANP-Plasmaspiegel in der BAY 58-2667-Gruppe. Eine Behandlung mit BAY 58-2667 führte in Hunden mit experimenteller Herzinsuffizienz und im 5/6-Nephrektomie-Modell für chronisches Nierenversagen ebenfalls zu einer Senkung der natriuretischen Peptide (Kalk *et al.*, 2006; Boerrigter *et al.*, 2007). Eine Verbesserung der Nierenfunktion zeigte sich durch geringere Harnsäurekonzentrationen im Plasma und geringere Proteinkonzentrationen im Urin der BAY 58-2667-behandelten Tiere im Vergleich zu den Placebotieren.

BAY 58-2667 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Plasmaspiegel von AST, AP, LDH, GLDH und CK. In der BAY 58-2667-Gruppe war die ALT im Vergleich zur Placebogruppe jedoch vermindert, was ein Indiz für eine Verbesserung der Leberfunktion durch BAY 58-2667 sein könnte. Dieser Befund ist nicht ganz überraschend, da ein strukturell ähnlicher sGC-Aktivatoren (BAY 60-2770) in verschiedenen experimentellen Modellen für Leberfibrose eine hervorragende therapeutische Wirkung zeigte (Knorr *et al.*, 2008).

Antifibrotische und antiinflammatorische Effekte der BAY 58-2667-Langzeitbehandlung wurden mit Hilfe von Biomarkern gezeigt. Für die Untersuchungen

der relativen Genexpression wurden zusätzlich Organe von nicht salzbelasteten Kontrolltieren analysiert. Die relative Expression dieser Biomarker machte deutlich, dass fibrotische und entzündliche Prozesse in Herz und Niere durch die Behandlung mit BAY 58-2667 verhindert oder, im Vergleich zur Placebogruppe, zumindest deutlich vermindert wurden. So war die relative Expression aller gemessenen Marker in der Placebogruppe höher als in unbehandelten Kontrolltieren und in der BAY 58-2667-Gruppe war die Expression der profibrotischen und proinflammatorischen Marker niedriger als in der Placebogruppe. Die extrazelluläre Matrix ist eine dynamische Superstruktur aus Makromolekülen wie Fibronectin oder Kollagenen und ihre Zusammensetzung ist bei fibrotischen Prozessen verändert (Border und Noble, 1994). Tenascin-C ist ein extrazelluläres Matrixglykoprotein, das während Remodelling- oder Entzündungsprozessen hochreguliert wird (Hsia und Schwarzbauer, 2005). Die Expression von Osteopontin wird durch erhöhten mechanischen Stress bei Druckbelastung oder Myokardfibrose gesteigert (Okamoto, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008). In einer klinischen Studie konnte zudem nachgewiesen werden, dass Plasmaspiegel von Osteopontin nicht nur in Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht sind, sondern auch mit dem Schweregrad der Krankheit und dem Todesrisiko korrelieren (Rosenberg *et al.*, 2008). KIM-1 ist unter physiologischen Bedingungen nicht nachzuweisen, aber aufgrund von ischämischen oder toxischen Schädigungen der Niere steigen seine Expressionslevel massiv an (Han *et al.*, 2008). MCP-1 ist an entzündlichen Prozessen oder der Bildung von arteriosklerotischen Plaques beteiligt (Niu und Kolattukudy, 2009). In den Nieren der BAY 58-2667-behandelten Tiere war die relative Expression von Kollagen1 α 1, MCP-1, Fibronectin-1, Tenascin-C und KIM-1 nicht höher als in den Nieren der normotensiven Kontrolltiere. In einem Modell für chronische Glomerulonephritis, die mit starker Fibrose einhergeht, konnten Wang *et al.* (2006) zeigen, dass durch eine Behandlung mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 die Expression von profibrotischen Markern wie Fibronectin gesenkt wurde. Außerdem wurde in einer anderen Arbeit in demselben Tiermodell mittels immunhistochemischer Färbungen gezeigt, dass BAY 41-2272 die Akkumulation der extrazellulären Matrix verhindert (Hohenstein *et al.*, 2005). Diese und die Ergebnisse dieser Arbeit weisen daraufhin, dass in verschiedenen experimentellen Modellen durch eine NO-unabhängige sGC-Aktivierung eine protektive Wirkung auf fibrotische Prozesse erzielt werden kann.

In der hier beschriebenen Studie wurden am Studienende ähnliche Plasmakonzentrationen gemessen wie in einer Studie am 5/6-Nephrektomie-Modell. In dieser Studie verhinderte BAY 58-2667 die Entwicklung des Blutdruckanstiegs und

einer Linksherzhypertrophie und zeigte einen protektiven Einfluss auf die Nierenfunktion und Nierenmorphologie (Kalk *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der Langzeitstudie mit BAY 58-2667 zeigen deutlich die protektive Wirkung einer Langzeitaktivierung der hämfreien sGC. Diese spiegelte sich nicht nur in einer verbesserten Herz- und Nierenfunktion und einem verminderten Blutdruckanstieg wider, sondern auch in der verminderten relativen Expression profibrotischer und proinflammatorischer Biomarker und insbesondere in einer verbesserten Überlebensrate der behandelten Tiere.

5. Zusammenfassung

Das heterodimere α/β -Hämprotein lösliche Guanylatcyclase (sGC) ist der physiologische Rezeptor für den endogenen, gasförmigen Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO). Die prosthetische Hämgruppe ist über das Hämbindungsmotiv Y135-x-S137-x-R139 sowie den axialen Liganden H105 nicht-kovalent an die β_1 -Untereinheit gebunden. Die Bindung von NO an das Fe^{2+} der Hämgruppe führt zu einer bis zu 200-fachen Steigerung der Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu dem „second messenger“ cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP aktiviert verschiedene Effektorsysteme und zeigt im Herz-Kreislauf-System verschiedene protektive Wirkungen, wie eine Vasodilatation oder Inhibition der Thrombozytenaggregation. Die Dysfunktion des NO/sGC/cGMP-Signalweges ist mit der Entstehung und Entwicklung verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen, wie zum Beispiel Herzinsuffizienz, Atherosklerose oder Hypertonie, assoziiert.

Die prosthetische Hämgruppe spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Stabilisierung der sGC. Durch eine Oxidation der Hämgruppe wird die sGC gegenüber NO insensitiv. Oxidativer Stress ist mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert und durch eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie O_2^- , charakterisiert. ROS greifen störend in den NO/sGC/cGMP-Signalweg ein, indem sie die Bioverfügbarkeit von NO herabsetzen und das Fe^{2+} der sGC-Hämgruppe oxidieren. Durch diese Oxidation wird die Bindung der Hämgruppe an die sGC deutlich herabgesetzt, was letztendlich zum Verlust der Hämgruppe an der sGC führt. Die sGC unterliegt einer Redoxregulation und kann als native reduzierte Fe^{2+} -Form, oxidierte Fe^{3+} -Form oder als hämfreie Form vorliegen. Letztere wird ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. In den letzten Jahren wurden die NO-unabhängigen und hämabhängigen sGC-Stimulatoren und die NO- und häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren identifiziert, die auch zur indirekten Unterscheidung von hämhaltiger und hämfreier sGC eingesetzt werden können. sGC-Stimulatoren, wie BAY 41-2272, stimulieren selektiv die reduzierte hämhaltige sGC, während sGC-Aktivatoren, wie BAY 58-2667, selektiv die hämfreie sGC aktivieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht welche strukturellen Voraussetzungen zur Aktivierung und Stabilisierung der sGC unter hämoxidierenden Bedingungen führen und ob diese Schutzfunktion eine Eigenschaft aller hämunabhängigen sGC-Aktivatoren ist. Dazu wurden die strukturell unterschiedlichen

sGC-Aktivatoren BAY 58-2667 und HMR1766 eingesetzt. Die Untersuchungen wurden sowohl mit WT-sGC und hämfreie sGC überexprimierenden CHO-Zellen, den sogenannten cGMP-Reporterzellen, als auch mit primären Endothelzellen durchgeführt. In beiden Zellsystemen schützten die Porphyrinanaloga BAY 58-2667 und Zn-PPIX die sGC vor Oxidation-induziertem Abbau. BAY 41-2272, welches als sGC-Stimulator nicht in der Hämtasche bindet, wies diese Eigenschaft nicht auf. HMR1766 verhinderte den Oxidation-induzierten Abbau nicht, obwohl HMR1766 wie BAY 58-2667 mit der Hämbindungsstasche interagiert und die sGC unter hämoxidierenden Bedingungen aktivierte. Untersuchungen mit der hämfreien Doppelmutante β_1 Y135A/R139A-sGC zeigten, dass HMR1776 nicht wie BAY 58-2667 über diese Aminosäuren mit der Hämtasche interagiert. Durch die hochaffine Interaktion mit den Hämanker-aminosäuren Y135 und R139 und die Fähigkeit die räumliche Struktur des Häms nachzuahmen schützten BAY 58-2667 und Zn-PPIX die hämfreie sGC vor Oxidation-induziertem Abbau, im Gegensatz zu HMR, das strukturell nicht der Klasse der Porphyrinanaloga zuzurechnen ist. Damit ist BAY 58-2667 nach heutigem Wissen der erste pharmakologische Ligand der sein Zielprotein nicht nur aktiviert sondern außerdem stabilisiert.

Neuere Untersuchungen weisen daraufhin, dass die hämfreie Form der sGC unter physiologischen Bedingungen existiert und dass ihr Anteil unter verschiedenen pathophysiologischen Zuständen ansteigt. Bisher konnte hämfreie sGC nur indirekt mittels einer Aktivierung durch sGC-Aktivatoren nachgewiesen werden, eine Methode zum direkten Nachweis der hämfreien sGC in lebenden Zellen existierte nicht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine solche, auf Fluoreszenzdequenching basierende, Methode etabliert werden, die auf der spektralen Interaktion eines Fluorophors mit der prosthetischen Hämgruppe beruht. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff FIAsh benutzt, dessen Emissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum des Häms überlappt. Auf diese Weise kann Energie von FIAsh auf die Hämgruppe übertragen werden, wodurch die Fluoreszenz von FIAsh unter nativen Bedingungen durch das Häm gequenchet wurde. Der Verlust der Hämgruppe an der sGC als Folge einer Oxidation führte zu verstärkter Fluoreszenz. Dieses Ergebnis wurde durch eine verminderte NO-induzierte und verstärkte BAY 58-2667-induzierte sGC-Aktivierung untertützt. Ein weiteres Indiz für den durch Fluoreszenzdequenching nachgewiesenen Hämverlust waren verminderte sGC Proteinlevel nach Inkubation mit den Hämoxidantien. Sowohl durch die Verwendung der hämfreien sGC-Mutante β_1 Y135A/R139A als auch mittels des Fluoreszenzfarbstoffes ReAsH, der nicht durch das Häm gequenchet wurde, konnte bestätigt werden, dass die Fluoreszenz von FIAsh aufgrund des Hämverlustes anstieg.

Somit ist Fluoreszenzdequenching die erste Methode, mit der Veränderungen des Hämgehaltes unter oxidativen Stressbedingungen in einem zellulären System verfolgt werden können. Sie könnte dazu beitragen, die Redoxregulation der sGC näher zu untersuchen und deren Relevanz unter physiologischen und pathologischen Bedingungen besser zu verstehen.

Ganzkörper-Autoradiographien mit radioaktiv-markiertem BAY 58-2667 wurden durchgeführt, um die hämfreie sGC indirekt mit einem bildgebenden Verfahren *in vivo* nachzuweisen. Die Ganzkörper-Autoradiographie ermöglicht es, die Verteilung einer Substanz im ganzen Körper eines Tieres darzustellen. Da BAY 58-2667 selektiv an die hämfreie sGC bindet, sollte in einer Ganzkörper-Autoradiographie mit ¹⁴C-BAY 58-2667 überall dort, wo im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren mehr Radioaktivität nachzuweisen ist, auch hämfreie sGC vorliegen. In Organen von Ratten, die mit dem sGC-Oxidanz ODQ vorbehandelt wurden, konnte deutlich mehr Radioaktivität nachgewiesen werden als in unbehandelten Kontrolltieren. Über die Verteilung von ¹⁴C-BAY 58-2667 konnte in einer zweiten Studie an hypertensiven Ratten indirekt mehr hämfreie sGC nachgewiesen werden als in normotensiven Tieren.

In einer Langzeitstudie wurde die therapeutische Wirkung einer Langzeitaktivierung hämfreier sGC durch BAY 58-2667 untersucht. Hypertensive Dahl/ss Ratten wurden über 21 Wochen mit BAY 58-2667 behandelt. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren war die Überlebensrate der BAY 58-2667-behandelten Ratten deutlich erhöht und der Blutdruckanstieg weitestgehend verhindert. Eine kardio-renale Protektion unter Behandlung mit BAY 58-2667 zeigte sich in den Plasmaparametern für die Nierenfunktion und einer reduzierten Genexpression von profibrotischen und proinflammatorischen Biomarkern. Die Ergebnisse dieser Langzeitstudie zeigen deutlich eine therapeutische Wirkung durch eine Langzeitaktivierung der hämfreien sGC durch BAY 58-2667.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass BAY 58-2667, durch seine Eigenschaften die hämfreie sGC selektiv zu aktivieren und vor dem oxidativen Abbau zu schützen, dazu beitragen könnte die zytoprotektiven Mechanismen des NO/sGC/cGMP-Signalwegs unter pathologischen Bedingungen aufrechtzuerhalten. BAY 58-2667 stellt somit eine innovative Therapieoption für kardiovaskuläre Erkrankungen dar, dessen Potential in ersten klinischen Studien belegt werden konnte und derzeit weiterhin pharmakologisch und klinisch untersucht wird.

6. Literatur

- Adams SR, Campbell RE, Gross LA, Martin BR, Walkup GK, Yao Y, Llopis J, Tsien RY: New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc.* 2002, **124**:6063-6076.
- Armitage ME, Wingler K, Schmidt HH, La M: Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med.* 2009, **16**:1071-1076.
- Artz JD, Schmidt B, McCracken JL, Marletta MA: Effects of nitroglycerin on soluble guanylate cyclase: implications for nitrate tolerance. *J Biol Chem.* 2002, **277**:18253-18256.
- Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD: Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963, **11**:330-334.
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY: Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, **97**:11984-89.
- 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 U S A.* 2002, **99**:12097-12101.
- Bauersachs J, Bouloumié A, Mülsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R: Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res.* 1998, **37**:772-779.
- Becker EM, Wunder F, Kast R, Robyr C, Hönicka M, Gerzer R, Schröder H, Stasch JP: Generation and characterization of a stable soluble guanylate cyclase-overexpressing CHO cell line. *Nitric Oxide.* 1999, **3**:55-66.
- Beckman JS: Understanding peroxynitrite biochemistry and its potential for treating human diseases. *Arch Biochem Biophys.* 2009, **484**:114-116.
- Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J: On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, **99**:507-510.
- Bellingham M, Evans TJ: The $\alpha_2\beta_1$ isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling. *Cell Signal.* 2007, **19**:2183-2193.
- Bender AT, Beavo JA: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 2006, **58**:488-520.
- Benz K, Orth SR, Simonaviciene A, Linz W, Schindler U, Rütten H, Amann K: Blood pressure-independent effect of long-term treatment with the soluble heme-independent guanylyl cyclase activator HMR1766 on progression in a model of noninflammatory chronic renal damage. *Kidney Blood Press Res.* 2007, **30**:224-233.
- Biel M, Michalakakis S: Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol.* 2009, **191**:111-136.
- Bischoff E, Stasch JP: Effects of the sGC stimulator BAY 41-2272 are not mediated by phosphodiesterase 5 inhibition. *Circulation.* 2004, **110**:e320-e321.
- Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC, Jr.: Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension.* 2007, **49**:1128-1133.

-
- Boerrigter G, Lapp H, Burnett JC: Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**:485-506.
- Boon EM, Marletta MA: Ligand specificity of H-NOX domains: from sGC to bacterial NO sensors. *J Inorg Biochem*. 2005, **99**:892-902.
- Border WA, Noble NA: Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994, **331**:1286-1292.
- 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**:248-254.
- Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K: Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, **263**:696-701.
- Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA: Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci*. 2006, **31**:231-239.
- Cheng C, Shuman S: Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of topoisomerase IB-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. 2000, **20**:8059-8068.
- Das SC, Panda D, Nayak D, Pattnaik AK: Biarsenical labeling of vesicular stomatitis virus encoding tetracysteine-tagged m protein allows dynamic imaging of m protein and virus uncoating in infected cells. *J Virol*. 2009, **83**:2611-2622.
- Davydov DR, Davydova NY, Halpert JR: Allosteric transitions in cytochrome P450eryF explored with pressure-perturbation spectroscopy, lifetime FRET, and a novel substrate, Fluorol-7GA. *Biochemistry*. 2008, **47**:11348-11359.
- Denninger JW, Marletta MA: Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1999, **1411**:334-350.
- Denninger JW, Schelvis JPM, Brandish PE, Zhao Y, Babcock GT, Marlette MA: Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance raman studies. *Biochemistry*. 2000, **39**:4191-4198.
- Derbyshire ER, Marletta MA: Butyl isocyanide as a probe of the activation mechanism of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem*. 2007, **282**:3571-3578.
- Derbyshire ER, Marletta MA: Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**:17-31.
- Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch JP, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT: Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation*. 2006, **113**:286-295.
- Dunkern TR, Feurstein D, Rossi GA, Sabatini F, Hatzelmann A: Inhibition of TGF- β induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *Eur J Pharmacol*. 2007, **572**:12-22.
- Estevez JM, Somerville C: FIAsh-based live-cell fluorescent imaging of synthetic peptides expressed in *Arabidopsis* and tobacco. *Biotechniques*. 2006, **41**:569-574.
- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP: NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2006, **5**:755-768.
-

- Fernhoff NB, Derbyshire ER, Marletta MA: A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, **9**:21602-21607.
- Friebe A, Schultz G, Koesling D: Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J*. 1996, **15**:6863-6868.
- Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A, Koesling D: Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, **104**:7699-7704.
- Furchgott R: Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. In: H. Jörmvall (Ed). *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1996-2000*. World Scientific Publishing Co., Singapore, 2003, pp. 152-169.
- Gaietta GM, Giepmans BN, Deerinck TJ, Smith WB, Ngan L, Llopis J, Adams SR, Tsien RY, Ellisman MH: Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, **103**:17777-17782.
- Garbers DL: Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*. 1979, **254**:240-243.
- Garbers DL, Lowe DG: Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem*. 1994, **269**:30741-30744.
- 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.
- Gladwin MT: Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest*. 2006, **116**:2330-2332.
- Griffin BA, Adams SR, Tsien RY: Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*. 1998, **281**:269-272.
- Grossman E: Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care*. 2008, **31**:S185-S189.
- Haffner D, Hocher B, Müller D, Simon K, König K, Richter CM, Eggert B, Schwarz J, Godes M, Nissel R, Querfeld U: Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)2D3. *J Hypertens*. 2005, **23**:1067-1075.
- Han WK, Waikar SS, Johnson A, Betensky RA, Dent CL, Devarajan P, Bonventre JV: Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int*. 2008, **73**:863-869.
- Hardman JG, Sutherland EW: Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem*. 1969, **244**:6363-6370.
- Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G: Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett*. 1991, **292**:217-222.
- Hobbs AJ, Ignarro LJ: Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol*. 1996, **269**:134-148.
- Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999, **39**:191-220.

-
- Hobbs AJ: Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br J Pharmacol.* 2002, **136**:637-640.
- Hobbs AJ, Stasch JP: Soluble guanylate cyclase: allosteric activations and redox regulation. In: L. J. Ignarro (Ed). *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, second edition.* Academic Press, Burlington, MA, USA, 2009, pp. 301-326.
- Hoher B, George I, Diekmann F, Zart R, Rebstock J, Schwarz A, Thone-Reineke C, Neumayer HH, Bauer C: ETA receptor blockade induces fibrosis of the clipped kidney in two-kidney-one-clip renovascular hypertensive rats. *J Hypertens.* 2000, **18**:1807-1814.
- Hönicka 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.
- Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga JP, Tsien RY, Ellisman MH, Lohse MJ: A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods.* 2005, **2**:171-176.
- Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP: Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol.* 2009, **157**:781-795.
- Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P: cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol.* 2009, **191**:137-162.
- Hohenstein B, Daniel C, Wagner A, Stasch JP, Hugo C: Stimulation of soluble guanylyl cyclase inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005, **288**:F685-F693.
- Hsia HC, Schwarzbauer JE: Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem.* 2005, **280**:26641-26644.
- Hwang RD, Chen CC, Knecht DA: ReAsH: another viable option for in vivo protein labelling in Dictyostelium. *J Microsc.* 2009, **234**:9-15.
- Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981, **218**:739-749.
- Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988, **246**:218-26.
- Ignarro LJ: Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. In: H. Jörnvall (Ed). *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1996-2000.* World Scientific Publishing Co., Singapore, 2003, pp. 178-198.
- Iyer LM, Anantharaman V, Aravind L: Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics.* 2003, **4**:5.
- Jost CA, Reither G, Hoffmann C, Schultz C: Contribution of fluorophores to protein kinase C FRET probe performance. *ChemBioChem.* 2008, **9**:1379-1384.
- Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Sugiura R, Kuno T, Nakamura K, Kunitomo M: Downregulation of vascular soluble guanylate cyclase induced by high salt intake in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001, **134**:737-744.
-

- Kalk P, Godes M, Relle K, Rothkegel C, Hucke A, Stasch JP, Hocher B: NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol*. 2006, **148**:853-859.
- Karow DS, Pan D, Davis JH, Behrends S, Mathies RA, Marletta MA: Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*. 2005, **44**:16266-16274.
- Kleppisch T: Phosphodiesterases in the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**:71-92.
- Kloss S, Bouloumié A, Mülsch A: Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*. 2000, **35**:43-47.
- Knorr A, Hirth-Dietrich C, Alonso-Alija C, Harter M, Hahn M, Keim Y, Wunder F, Stasch JP: Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arzneimittelforschung*. 2008, **58**:71-80.
- Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM: YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*. 1994, **84**:4226-4233.
- Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G, Böhme E: The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett*. 1990, **266**:128-132.
- Koglin M, Vehse K, Budaesus L, Scholz H, Behrends S: Nitric oxide activates the β_2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J Biol Chem*. 2001, **276**:30737-30743.
- Komatsu Y, Itoh H, Suga S, Ogawa Y, Hama N, Kishimoto I, Nakagawa O, Igaki T, Doi K, Yoshimasa T, Nakao K: Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide in coculture with vascular smooth muscle cells. Role of the vascular natriuretic peptide system in vascular growth inhibition. *Circ Res*. 1996, **78**:606-614.
- Kosarikov DN, Lee JM, Uversky VN, Counts Gerber N: Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. *J Inorg Biochem*. 2001, **87**:267-276.
- Kots AY, Martin E, Sharina IG, Murad F: A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**:1-14.
- Kuhn M: Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**:47-69.
- Kuznetsova S, Zauner G, Schmauder R, Mayboroda OA, Deelder AM, Aartsma TJ, Canters GW: A Förster-resonance-energy transfer-based method for fluorescence detection of the protein redox state. *Anal Biochem*. 2001, **350**:52-60.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, **227**:680-685.
- Landy A: Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*. 1989, **58**:913-949.
- Lapp H, Mitrovic V, Franz N, Heuer H, Buerke M, Wolfertz J, Mueck W, Unger S, Wensing G, Frey R: Cinaciguat (BAY 58-2667) improves cardiopulmonary hemodynamics in patients with acute decompensated heart failure. *Circulation*. 2009, **119**:2781-2788.

- Lepesheva GI, Strushkevich NV, Usanov SA: Conformational dynamics and molecular interaction reactions of recombinant cytochrome p450_{scc} (CYP11A1) detected by fluorescence energy transfer. *Biochim Biophys Acta*. 1999, **1434**:31-43.
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP: Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003, **278**:8516-8525.
- Liu R, Hu D, Tan X, Lu HP: Revealing two-state protein-protein interactions of calmodulin by single-molecule spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 2006, **128**:10034-10042.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 1995, **4**:357-362.
- 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.
- Luedtke NW, Dexter RJ, Fried DB, Schepartz A: Surveying polypeptide and protein domain conformation and association with FIAsh and ReAsH. *Nat Chem Biol*. 2007, **3**:779-784.
- Ma X, Sayed N, Beuve A, van den Akker F: NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *EMBO J*. 2007, **26**:578-588.
- Ma X, Sayed N, Baskaran P, Beuve A, van den Akker F: PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *J Biol Chem*. 2008, **283**:1167-1178.
- Maas J, Binder R, Steinke W: Quantitative whole-body autoradiography: recommendations for the standardization of the method. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000, **31**:S15-S21.
- Marletta MA: Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol*. 1988, **1**:249-257.
- Marsh N, Marsh A: A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000, **27**:313-319.
- Martin E, Berka V, Bogatenkova E, Murad F, Tsai AL: Ligand selectivity of soluble guanylyl cyclase: effect of the hydrogen-bonding tyrosine in the distal heme pocket on binding of oxygen, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Biol Chem*. 2006, **281**:27836-27845.
- Mayer B, Andrew P: Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998, **358**:127-133.
- McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF: Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999, **34**:539-545.
- Melichar VO, Behr-Roussel D, Zabel U, Uttenthal LO, Rodrigo J, Rupin A, Verbeuren TJ, Kumar HSA, Schmidt HH: Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, **101**:16671-16676.
- Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, Manning RD, Jr.: Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 2003, **41**:1346-1352.
- Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D: Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest*. 2006, **116**:1731-1737.

- Meurer S, Pioch S, Pabst T, Opitz N, Schmidt PM, Beckhaus T, Wagner K, Matt S, Gegenbauer K, Geschka S, Karas M, Stasch JP, Schmidt HH, Müller-Esterl W: Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. *Circ Res*. 2009, **105**:33-41.
- Minsky M: Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 1988, **10**:128-138.
- Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, Bischoff E, Feurer A, Gerisch M, Kern A, Knorr A, Lang D, Muentner K, Radtke M, Schirok H, Schlemmer KH, Stahl E, Straub A, Wunder F, Stasch JP: Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *ChemMedChem*. 2009, **4**:853-865.
- Morley D, Keefer LK: Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993, **22**:S3-S9.
- Mülsch A, Bauersachs J, Schafer A, Stasch JP, Kast R, Busse R: Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol*. 1997, **120**:681-689.
- Münzel T, Daiber A, Mülsch A: Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005, **97**:618-628.
- Münzel T, Genth-Zotz S, Hink U: Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase: solution for all cardiorenal problems in heart failure? *Hypertension*. 2007, **49**:974-976.
- Murad F: Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. In: H. Jörnvall (Ed). *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1996-2000*. World Scientific Publishing Co., Singapore, Singapore, 2003, pp. 210-233.
- Murad F: Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*. 2006, **355**:2003-2011.
- Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F: Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*. 1990, **265**:16841-16845.
- Nikolaev VO, Lohse MJ: Novel techniques for real-time monitoring of cGMP in living cells. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**:229-243.
- Nioche P, Berka V, Vipond J, Minton N, Tsai AL, Raman CS: Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*. *Science*. 2004, **306**:1550-1553.
- Niu J, Kolattukudy PE: Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)*. 2009, **117**:95-109.
- Okamoto H: Osteopontin and cardiovascular system. *Mol Cell Biochem*. 2007, **300**:1-7.
- 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.
- Oliver PM, John SW, Purdy KE, Kim R, Maeda N, Goy MF, Smithies O: Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, **95**:2547-2551.
- Olney RC: C-type natriuretic peptide in growth: a new paradigm. *Growth Horm IGF Res*. 2006, **16**:S6-S14.

- Pagel-Langenickel I, Buttgereit J, Bader M, Langenickel TH: Natriuretic peptide receptor B signaling in the cardiovascular system: protection from cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 2007, **85**:797-810.
- Pellicena P, Karow DS, Boon EM, Marletta MA, Kuriyan J: Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, **101**:12854-12859.
- Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Chatelin S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Le Paslier D, Frezal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J: Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet.* 1996, **14**:461-464.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F: Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999, **135**:105-149.
- Potter LR, Hunter T: Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem.* 2001, **276**:6057-6060.
- Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM: Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol.* 2009, **191**:341-366.
- Pou S, Pou WS, Brecht DS, Snyder SH, Rosen GM: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992, **267**:24173-24176.
- Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, Juenger C, Frank D, Remppis A, Giannitsis E, Katus HA, Frey N: Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail.* 2008, **1**:43-49.
- Rothkegel C, Schmidt PM, Stoll F, Schröder H, Schmidt HH, Stasch JP: Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. *FEBS Lett.* 2006, **580**:4205-4213.
- Rothkegel C, Schmidt PM, Atkins DJ, Hoffmann LS, Schmidt HH, Schröder H, Stasch JP: Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo. *Mol Pharmacol.* 2007, **72**:1181-1190.
- Roy B, Mo E, Vernon J, Garthwaite J: Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors. *Br J Pharmacol.* 2008, **153**:1495-1504.
- Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH: Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1999, **85**:534-541.
- Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D: Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J.* 1998, **335**:125-130.
- Russwurm M, Wittau N, Koesling 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**:44647-44652.
- Russwurm M, Koesling D: NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 2004, **23**:4443-4450.
- Santos MG, Pegoraro M, Sandrini F, Macuco EC: Risk factors for the development of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Arq Bras Cardiol.* 2008, **90**:276-283.
- Schäfer A, Widder J, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J: Reduced basal nitric oxide bioavailability and platelet activation in young spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004, **67**:2273-2279.

- Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter KD, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosionek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F: Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2008, **32**:881-891.
- Schindler U, Strobel H, Schönafinger K, Linz W, Löhn M, Martorana PA, Rütten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Töpfer A, Pistorius A, Jannek C, Mülsch A: Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*. 2006, **69**:1260-1268.
- Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U: The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 1993, **1178**:153-175.
- Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP: NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**:309-339.
- 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 PM, Schramm M, Schröder H, Wunder F, Stasch JP: Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem*. 2004, **279**:3025-3032.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling 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.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T: Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008, **10**:1115-1126.
- Simchon S, Manger W, Blumberg G, Brensilver J, Cortell S: Impaired renal vasodilation and urinary cGMP excretion in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 1996, **27**:653-657.
- Stasch JP, Knorr A, Hirth-Dietrich C, Kramer T, Hübsch W, Dressel J, Fey P, Beuck M, Sander E, Frobel K, Kazda S: Long-term blockade of the angiotensin II receptor in renin transgenic rats, salt-loaded Dahl rats, and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Arzneimittelforschung*. 1997, **47**:1016-1023.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feuerer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schröder 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, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feuerer 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, Dembowski 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, Dembowski K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder 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*. 2002c, **136**:773-783.

- Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HH: Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest.* 2006, **116**:2552-2561.
- Stasch JP, Hobbs AJ: NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol.* 2009, **191**:277-308.
- Steinhilber ME, Cochrane KL, Field LJ: Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension.* 1990, **16**:301-307.
- Steinke W, Archimbaud Y, Becka M, Binder R, Busch U, Dupont P, Maas J: Quantitative distribution studies in animals: cross-validation of radioluminography versus liquid-scintillation measurement. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000, **31**:S33-S43.
- 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: 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.
- Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Dücke B, Feurer A, Fürstner C: NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001, **11**:781-784.
- Straub A, Benet-Buchholz J, Frode 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.
- 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.
- Takeda S, Kamiya N, Arai R, Nagamune T: Design of an artificial light-harvesting unit by protein engineering: cytochrome b_{562} -green fluorescent protein chimera. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, **289**:299-304.
- Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL: Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, **101**:17300-17305.
- Taylor NE, Glocka P, Liang M, Cowley AW, Jr.: NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. *Hypertension.* 2006, **47**:692-698.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR: Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G_{α} .GTP γ S. *Science.* 1997, **278**:1907-1916.
- Thoonen R, Buys E, Cauwels A, Rogge E, Nimmegeers S, Van den Hemel M, Hochepeid T, Van de Voorde J, Stasch JP, Brouckaert P: NO-insensitive sGC β 1 H105F knockin mice: if NO has no place to go. *BMC Pharmacol.* 2009, **9**:S41

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979, **76**:4350-4354.
- Wang Y, Kramer S, Loof T, Martini S, Kron S, Kawachi H, Shimizu F, Neumayer HH, Peters H: Enhancing cGMP in experimental progressive renal fibrosis: soluble guanylate cyclase stimulation vs. phosphodiesterase inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006, **290**:F167-F176.
- Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G, Koesling D: Mutation of His-105 in the β_1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, **91**:2592-2596.
- Wedgwood S, Steinhorn RH, Bunderson M, Wilham J, Lakshminrusimha S, Brennan LA, Black SM: Increased hydrogen peroxide downregulates soluble guanylate cyclase in the lungs of lambs with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005, **289**:L660-L666.
- Weinert EE, Plate L, Whited CA, Olea C, Jr., Marletta MA: Determinants of ligand affinity and heme reactivity in H-NOX domains. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010, **49**:720-723.
- 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.
- Wunder F, Stasch JP, Hütter J, Alonso-Alija C, Hüser J, Lohrmann E: A cell-based cGMP assay useful for ultra-high-throughput screening and identification of modulators of the nitric oxide/cGMP pathway. *Anal Biochem*. 2005, **339**:104-112.
- Xia T, Dimitropoulou C, Zeng J, Antonova GN, Snead C, Venema RC, Fulton D, Qian S, Patterson C, Papapetropoulos A, Catravas JD: Chaperone-dependent E3 ligase CHIP ubiquitinates and mediates proteasomal degradation of soluble guanylyl cyclase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007, **293**:H3080-H3087.
- Yamahara K, Itoh H, Chun TH, Ogawa Y, Yamashita J, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yurugi-Kobayashi T, Miyashita K, Tsujimoto H, Kook H, Feil R, Garbers DL, Hofmann F, Nakao K: Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, **100**:3404-3409.
- Yantsevich AV, Harnostai IN, Lukashevich OP, Gilep AA, Usanov SA: Engineering, expression, purification, and physicochemical characterization of a chimeric protein, full-length cytochrome b_5 -green fluorescence protein (HMWb₅-EGFP). *Biochemistry (Mosc)*. 2007, **72**:77-83.
- Yuen PS, Potter LR, Garbers DL: A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*. 1990, **29**:10872-10878.
- Zabel U, Hausler C, Weeger M, Schmidt HH: Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem*. 1999, **274**:18149-18152.
- Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY: Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002, **3**:906-918.
- Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA: A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 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.

- Zhou Z, Pyriochou A, Kotanidou A, Dalkas G, van Eickels M, Spyroulias G, Roussos C, Papapetropoulos A: Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, **295**:H1763-H1771.
- Zürn A, Zabel U, Vilardaga JP, Schindelin H, Lohse MJ, Hoffmann C: Fluorescence resonance energy transfer analysis of α_{2a} -adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes. *Mol Pharmacol.* 2009, **75**:534-541.

7. Eigene Publikationen

Originalarbeiten:

Hoffmann LS, Schmidt PM, Hoffmann C, Keim Y, Geschka S, Schmidt HH, Stasch JP. Fluorescence dequenching makes haem-free soluble guanylate cyclase detectable. *FEBS J.* (under review).

Sharkovska Y, Kalk P, Lawrenz B, Godes M, Hoffmann LS, Wellkisch K, Geschka S, Relle K, Hocher B, Stasch JP. Nitric oxide independent stimulation of soluble guanylate cyclase reduces organ damage in low- and high- renin models of hypertension. *J Hypertens.* (in press).

Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol.* 2009, **157**:781-795.

Lipka DB, Hoffmann LS, Heidel F, Markova B, Blum MC, Breitenbuecher F, Kasper S, Kindler T, Levine RL, Huber C, Fischer T. LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells. *Mol Cancer Ther.* 2008, **7**:1176-1184.

Rothkegel C, Schmidt PM, Atkins DJ, Hoffmann LS, Schmidt HH, Schröder H, Stasch JP. Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo. *Mol Pharmacol.* 2007, **72**:1181-1190.

Girzalsky W, Hoffmann LS, Schemenewitz A, Nolte A, Kunau WH, Erdmann R. Pex19p-dependent targeting of Pex17p, a peripheral component of the peroxisomal protein import machinery. *J Biol Chem.* 2006, **281**:19417-21945.

Poster und Vorträge:

Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *BMC Pharmacol.* 2009, **9**:P26 (Vortrag und Poster).

Kalk P, Sharkovska Y, Lawrenz B, Godes M, Hoffmann LS, Wellkisch K, Geschka S, Relle K, Hocher B, Stasch JP. Cardio-renal protection of riociguat (BAY 63-2521) in low- and high-renin models of hypertension. *BMC Pharmacol.* 2009, **9**:P30 (Poster).

Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP. Protection against oxidation-induced degradation of soluble guanylate cyclase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2009, **379**:19 (Vortrag).

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Kollegen, meiner Familie und meinen Freunden, die durch ihre Unterstützung (praktisch wie seelisch) wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Johannes-Peter Stasch für die Überlassung dieses spannenden Themas, sein Vertrauen, seine Geduld und die einmalige Betreuung. Ich danke Ihnen dafür, dass Sie trotz Ihres vollen Terminkalenders Zeit für Diskussionen und Korrekturen gefunden haben und dafür, dass ich so viele Dinge von Ihnen lernen durfte, die in keinem Lehrbuch zu finden sind.

Herrn Dr. Martin Bechem danke ich herzlich für die Möglichkeit, meine Arbeit am Herz-Kreislauf-Institut der Bayer Schering Pharma AG in Wuppertal anzufertigen.

Meinen lieben Laborkollegen Yvonne Keim, Andreas Hucke, Ralf Hartkopf und Karl Heinz Augstein danke ich unendlich für die unerschöpfliche Hilfsbereitschaft, das tolle Arbeitsklima und das Interesse an meiner Arbeit. Yvonne danke ich besonders für den angenehmen, reibungslosen Laboralltag, ihre tatkräftige Unterstützung und dafür, dass sie mich in meiner stressigen Endphase ertragen hat. Andi und Ralf danke ich für die großartige und engagierte Hilfe, ohne die meine Arbeit keine Tierversuche enthielte. Ich danke Euch dafür, dass ich von Euch lernen durfte und auf Eure Erfahrungen zurückgreifen durfte. Ich werde die Zeit mit Euch oft vermissen.

Dr. Axel Kretschmer danke ich für die tolle Einführung in das Gebiet der Biomarker und seinen Mitarbeitern Isabella Hutmacher und Andreas Goette für die Einarbeitung und die Bestimmung der Biomarker.

Für die engagierte Kooperation bei der Durchführung der Ganzkörper-Autoradiographien danke ich Herrn Dr. Wolfram Steinke und seinen Mitarbeiterinnen Daniela Asmussen und Claudia Kockerols.

Dr. Friederike Stoll danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Fragen zur Struktur der sGC.

Dr. Frank Wunder und Guido Buehler danke ich für die Hilfe mit dem cGMP-Reporter-system.

Meinen Doktorandenkolleginnen Sandra Geschka, Julia Gruppe, Katrin Nickel, Wiebke Janssen, Elodie Kienlen und Dr. Sina Habel danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, die Unterstützung und die schönen Gespräche und Unternehmungen.

Den Praktikanten Matthias Schnepfer, Martin Rothenhöfer, Maria Andree, Sarah Nicklas, Michael Reiche, Carolin Schimang und Sandra Winkelmann danke ich herzlich für die praktische Hilfe.

Meinen Vorgängern Dr. Christiane Rothkegel und Dr. Peter Schmidt danke ich für die tolle Einarbeitung, guten Ideen, die super Zusammenarbeit beim Verfassen der Manuskripte und beim Planen so mancher Versuche.

Für das tolle Arbeitsklima, die netten Gespräche und die Hilfsbereitschaft danke ich allen Mitarbeitern aus Gebäude 500 des Forschungszentrums und ganz besonders Stephan und Achim für die organisatorische und technische Unterstützung.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Schalksmühle, den 9. Juli 2010

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Linda Sarah Hoffmann
Geburtsdatum 23.01.1982
Adresse Im Gewerbepark 8, 58579 Schalksmühle
Geburtsort Herdecke
Eltern Renate Hoffmann, geb. Heute
Michael Hoffmann

Schulischer Werdegang

1988 - 1992 Grundschule Klagebach, Schalksmühle
1992 - 1994 St. Jacobus-Realschule, Breckerfeld
1994 - 2001 Anne Frank-Gymnasium, Halver. Abitur: Juni 2001

Beruflicher Werdegang

06/2001 – 08/2001 Praktikum, Toxikologie, Bayer HealthCare AG, Wuppertal
10/2001 – 09/2004 Biologie Studium an der Ruhr-Universität in Bochum
Bachelor of Science in Biologie: August 2004
Bachelorarbeit: "Analysen zur Interaktion der beiden Peroxine Pex17p und Pex19p aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*"
08/2003 – 09/2003 Werkstudentin, Bayer CropScience AG, Monheim
10/2004 – 09/2006 Biomedizin Studium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
Master of Science in Biomedizin: September 2006
Masterarbeit: "Untersuchungen zur Inhibition der JAK2-V617F-Kinase durch den Kinase-Inhibitor LS104"
08/2005 – 10/2005 Werkstudentin, Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt
11/2006 – 12/2009 Doktorandin, Bayer Schering Pharma AG, Wuppertal, Herz-Kreislauf-Forschung. Die Arbeit mit dem Thema „Untersuchungen zur Aktivierung der hämfreien Guanylat-cyclase“ wurde von Professor Dr Johannes-Peter Stasch betreut.