
**Molekularbiologische und pharmakologische
Untersuchungen zur Aktivierung der
löslichen Guanylatcyclyase**



Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Christiane Rothkegel
geboren am 30.03.1979 in Bonn

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. Johannes-Peter Stasch
2. Prof. Dr. rer. nat. Henning Schröder
3. Prof. Dr. med. Sönke Behrends

Halle (Saale), 5. Juli 2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012148

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012148>]

Meinen Eltern

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

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	8
1.1 HISTORIE	9
1.2 GUANYLATCYCLASEN	9
1.2.1 Membranständige Guanylatcyclasen	10
1.2.2 Lösliche Guanylatcyclasen	11
1.2.3 Atypische Guanylatcyclasen	12
1.3 STIMULATOREN, AKTIVATOREN UND INHIBITOREN DER SGC	13
1.3.1 Stickstoffmonoxid	13
1.3.2 Kohlenstoffmonoxid	14
1.3.3 Protoporphyrin IX	14
1.3.4 sGC-Stimulatoren	14
1.3.5 sGC-Aktivatoren	16
1.3.6 sGC-Inhibitor ODQ	17
1.4 cGMP-EFFEKTORSYSTEME	17
1.4.1 cGMP-regulierte Phosphodiesterasen	18
1.4.2 cGMP-abhängige Proteinkinasen	19
1.4.3 cGMP-gesteuerte Ionenkanäle	19
1.5 OXIDATIVER STRESS	20
1.6 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	21
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 SUBSTANZEN	24
2.2 GERÄTE	25
2.3 MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	27
2.4 LÖSUNGEN UND MEDIEN	28
2.5 PLASMIDE	32
2.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.7 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	41
2.8 KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE	44
2.9 ZELLKULTUR	46
2.10 ISOLIERTE GEFÄßE	47
2.11 KONSTRUKTION EINES HOMOLOGIEMODELLS DER HÄMBINDUNGS- DOMÄNE	50

3. ERGEBNISSE	51
3.1 CHARAKTERISIERUNG DER HÄMBINDUNG UND DER HÄMBINDUNGSTASCHE DER SGC	51
3.1.1 Charakterisierung von β_1 Ser ₁₃₇ -sGC	51
3.1.2 Konstruktion und Screening von sGC-Mutanten der Hämbindungstasche	55
3.1.3 Untersuchung der Expression der sGC-Mutanten	61
3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR DIMERISIERUNG DER α_1/β_1-SGC MITTELS BiFC	62
3.2.1 Generierung und Charakterisierung von BiFC-Fusionsproteinen	62
3.2.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten von α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC	65
3.3 UNTERSUCHUNG DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER SGC	72
3.3.1 Charakterisierung von α_1 -GFP-sGC und β_1 -DsRed-sGC Fusionsproteinen	72
3.3.2 Subzelluläre Lokalisation von GFP- α_1 -sGC und β_1 -sGC-DsRed	73
3.3.3 Immunhistochemie	75
3.4 VASORELAXIERENDE WIRKUNG DES SGC-AKTIVATORS BAY 58-2667 IN VITRO	76
3.4.1 Aorten von spontan hypertensiven Ratten	76
3.4.2 Arterien von Watanabe Kaninchen	77
3.4.3 Aorten von ApolipoproteinE Knockout Mäusen	77
3.4.4 Humane Arterien	78
4. DISKUSSION	79
4.1 AN DER SGC-AKTIVIERUNG BETEILIGTE AMINOSÄUREN	79
4.2 BiFC-UNTERSUCHUNGEN ZUR DIMERISIERUNG DER SGC	92
4.3 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER SGC	86
4.4 VASORELAXIERENDE WIRKUNG VON BAY 58-2667 AM ISOLIERTEN GEFÄß	94
5. ZUSAMMENFASSUNG	98
6. LITERATUR	101
7. EIGENE PUBLIKATIONEN	107
ANHANG	111
DANKSAGUNG	112
LEBENS LAUF	113

Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase(n)
ANP, BNP, CNP	Natriuretische Peptide
ApoE ^{-/-} -Maus	ApolipoproteinE Knockout Maus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation
BIS-TRIS	Bis[2-hydroxyethyl]iminotris[hydroxymethyl]-methan
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Ca ²⁺	Calcium
CHO-Zelle	Chinesische Hamster Ovarien-Zelle
Ci	Curie
CNG-Kanal	Cyclisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
CO	Kohlenstoffmonoxid
cpm	Zählereignisse pro Minute
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
EDRF	Endothelialer relaxierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
eYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FCS	Fötale Kälberserum
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	Eisen
GC	Guanylatcyclase
GCs	Guanylatcyclasen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTN	Nitroglycerin
GTP	Guanosintriphosphat

HASMC	Humane Glattmuskelzellen von Aorten
HCN-Kanal	Hyperpolarisations-aktivierter cyclisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
HO	Hämoxigenase
HRP	Meerrettichperoxidase
HTS	High-Throughput Screen(ing)
HUVEC	Humane Endothelzellen von Nabelschnurvenen
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KHD	Kinase-Homologie-Domäne
LSM	Laser Scanning Mikroskopie
mNOS	Mitochondriale NO-Synthase
MTP	Mikrotiterplatte
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase(n)
NZW	Weißer Neuseeländer Kaninchen
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PDEs	Phosphodiesterasen
pGC	Membrangebundene Guanylatcyclase
pGCs	Membrangebundene Guanylatcyclasen
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PPIX	Protoporphyrin IX
PSD	Postsynaptisches density protein
RLU	Relative Lichteinheit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte

sGC	Lösliche Guanylatcyclase(n)
SHR	Spontan hypertensive Ratte(n)
SNP	Natriumnitroprussid
TCA	Trichloressigsäure
TEA-HCl	Triethanolamin-Hydrochlorid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Enzymeinheit
WHHL	Watanabe Kaninchen mit vererbter Hyperlipidämie
WKY-Ratte	Wistar Kyoto Ratte
WT	Wildtyp
ZnPP-IX	Zink-Protoporphyrin IX

1 Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) führt über Aktivierung seines endogenen Rezeptors, der löslichen Guanylatcyclase (sGC), zur Bildung des „second messengers“ cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), das über verschiedene Effektorsysteme letztendlich eine Gefäßerweiterung bewirkt (Murad, 2006). Für die Charakterisierung von NO als eines der bedeutendsten Signalmoleküle des Herz-Kreislauf-Systems und die Aufklärung seines Signaltransduktionsweges wurden Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad im Jahr 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet (Furchgott, 1999; Ignarro, 1999; Murad, 1999).

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (z.B. systemischer und pulmonaler Hochdruck, Herzinsuffizienz, Atherosklerose) gehen einher mit einer Beeinträchtigung des NO-sGC-cGMP-Signalwegs (Evgenov et al., 2006; Moncada, 2006). Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist assoziiert mit einer verminderten Bioverfügbarkeit und einem reduzierten Ansprechen auf endogen produziertes NO (Evgenov et al., 2006). Seit mehr als 150 Jahren wird Nitroglycerin, ein organisches Nitrat, zur Therapie der Angina pectoris und der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt (Brunton, 1867). Erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass die Substanzklasse der organischen Nitrate im Körper nach Bioaktivierung das Gas NO freisetzt (Katsuki, 1977; Ignarro, 2002). Wegen ihres vorteilhaften hämodynamischen Profils zählen die organischen Nitrate nach wie vor zu den Standardtherapeutika zur Behandlung der Angina Pectoris. Die Wirkstoffklasse der organischen Nitrate besitzt neben den vielfältigen positiven Wirkungen auf das kardiovaskuläre System jedoch auch unerwünschte Eigenschaften. Aufgrund einer schnellen Toleranzentwicklung nach wiederholter Gabe sind diese nicht zur Dauertherapie einsetzbar und die Einnahmefähigkeit ist bei Patienten aufgrund der häufigen Nebenwirkung des Nitratkopfschmerzes vermindert. Auch konnte in klinischen Studien bisher noch nicht belegt werden, dass sich eine Therapie der Angina pectoris mit organischen Nitraten positiv auf die Überlebensrate auswirkt (Warnholtz et al., 2002a, Thadani und Rodgers, 2006). Substanzen, die den NO-Rezeptor, die sGC, direkt aktivieren und nur die therapeutisch gewünschten Wirkungen der organischen Nitrate aufweisen, könnten das Potential besitzen, die seit 150 Jahren etablierte Therapie der Nitrate sinnvoll zu ergänzen oder sogar zu ersetzen. Durch Entdeckung von Stimulatoren der sGC, wie beispielsweise BAY 41-2272, sowie Aktivatoren der sGC, wie BAY 58-2667, konnten erstmalig Wirkstoffklassen identifiziert werden, die die sGC NO-unabhängig aktivieren. Bislang veröffentlichte präklinische Daten dieser Substanzklassen lassen vermuten, dass sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren anderen Wirkstoffen, die den NO-sGC-cGMP-Signalweg modulieren, überlegen sind (Evgenov et al., 2006; Boerrigter et al., 2007; Münzel et al., 2007).

1.1 Historie

Die Entdeckung und Charakterisierung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) 1958 durch Rall und Sutherland veranlasste die Suche nach weiteren cyclischen Nukleotiden (Sutherland und Rall, 1969; Murad, 2006). cGMP wurde 1963 erstmals im Rattenurin und sechs Jahre später in fast allen Geweben nachgewiesen (Ashman et al., 1963; Goldberg et al., 1969). In den darauf folgenden Jahren wurden die für die katalytische Umwandlung von Guanosin triphosphat (GTP) zu cGMP verantwortlichen Enzyme, die Guanylatcyclasen (GCs), identifiziert. Aufgrund der Lokalisation in der Zelle erfolgte eine Einteilung der GCs in zwei Klassen: membranständige (pGC) und lösliche Guanylatcyclasen (sGC) (Hardman und Sutherland, 1969; Ishikawa et al., 1969; Schultz et al., 1969; White und Aurbach, 1969). Eine Aktivierung der sGC durch NO bzw. organische Nitrate wurde im Jahre 1977 gezeigt (Arnold et al., 1977; Katsuki et al., 1977). Zu damaliger Zeit war jedoch noch kein physiologischer Mechanismus bekannt durch den endogen das Atem- und Umweltgift NO gebildet wird. 1980 beschrieb Furchgott den endothelialen relaxierenden Faktor (EDRF), eine Substanz, die im Endothel der Blutgefäße gebildet und freigesetzt wird und eine Relaxation der Gefäße bewirkt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Später stellten Ignarro und Furchgott die Hypothese auf, dass es sich bei EDRF um NO handele. Dies konnte im Jahre 1987 experimentell bestätigt werden (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Bereits Anfang der 80er Jahre war die Produktion von Nitrat in aktivierten Makrophagen nachgewiesen worden (Green et al., 1981; Wagner et al., 1983). Basierend auf diesen Befunden wurde schließlich mit den NO-Synthasen (NOS) die letzte noch fehlende Komponente des NO-sGC-cGMP-Signalweges identifiziert (Marletta, 1988; Hevel et al., 1991). Mittlerweile sind vier Isoformen dieser NO-produzierenden Enzyme identifiziert worden: neuronale NOS (nNOS, NOS I), welche die Neurotransmission nitrinerner Neurone steuert; induzierbare NOS (iNOS, NOS II), die die Immunantwort moduliert; endotheliale NOS (eNOS, NOS III), welche verantwortlich für die endothelabhängige Relaxation ist, und mitochondriale NOS (mtNOS), die die Biogenese der Mitochondrien beeinflusst (Ghafourifar und Richter, 1997; Elfering et al., 2002; Nisoli et al., 2003).

1.2 Guanylatcyclasen

Die GCs gehören wie die Adenylatcyclasen (AC) zur Familie der Nukleotidcyclasen, die die Umwandlung ihres jeweiligen Substrates, ATP bzw. GTP, zum cyclisierten Nukleotid, cAMP bzw. cGMP, katalysieren (Tesmer und Sprang, 1998). Nukleotidcyclasen besitzen eine hoch konservierte katalytische Domäne, die sich aus zwei stark homologen bzw. identischen Untereinheiten zusammensetzt (Tesmer et al., 1997; Denninger und Marletta, 1999). Die katalytischen Domänen von GC und AC weisen eine so hohe Homologie auf, dass bereits

ein Austausch von drei Aminosäuren zu einer Veränderung der Substratspezifität zwischen ATP und GTP führt (Sunahara et al., 1998). Da alle bisher beschriebenen katalytischen Domänen der Nukleotidcyclasen in Kopf-Schwanz-Formation gegenüberliegende Untereinheiten besitzen, wird ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung vermutet. In der AC liegen die beiden katalytischen Domänen in einer Untereinheit vor (C1 und C2). Dadurch besitzt bereits das Monomer katalytische Aktivität, weshalb die AC auch als „Pseudo-Heterodimer“ bezeichnet wird (Denninger und Marletta, 1999). Monomere der GC besitzen jeweils nur eine der katalytischen Domänen. Aus diesem Grund muss die GC zur Ausbildung einer katalytischen Aktivität immer als Heterodimer vorliegen (zur Übersicht siehe Lucas et al., 2000; Potter et al., 2006).

1.2.1 Membranständige Guanylatcyclasen

Im Menschen sind bislang fünf funktionell aktive pGCs identifiziert worden (Mehats et al., 2002; Potter et al., 2006). Zwei der pGCs, GC-A und GC-B fungieren als Rezeptoren für die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP. GC-A vermittelt als Rezeptor für das atriale (ANP) und B-Typ (BNP) natriuretische Peptid deren renale und vaskuläre Wirkungen. Während GC-B durch das C-Typ (CNP) natriuretische Peptid aktiviert wird und das Knochenwachstum reguliert. GC-C moduliert durch Bindung der intestinalen Proteine Guanylin und Uroguanylin sowie von hitzestabilen Enterotoxinen den intestinalen Wasser- und Elektrolyt-Transport. Neben einer Beteiligung an der Flüssigkeitsregulation im Darm wird auch eine antiproliferative Wirkung der GC-C auf das Darmepithel postuliert (Pitari et al., 2003). GC-E und GC-F werden durch kleine Ca^{2+} -bindende Proteine moduliert und beeinflussen den Sehprozess (Feil und Kemp-Harper, 2006; Potter et al., 2006). Die Aktivierung unterschiedlicher Effektorsysteme verdeutlicht den komplexen Einfluss der pGC auf verschiedene Signalkaskaden und damit auf vielfältige physiologische Funktionen (zur Übersicht siehe Lucas et al., 2000; Feil und Kemp-Harper, 2006).

Die pGCs bestehen aus einer mäßig konservierten extrazellulären N-terminalen Domäne, die als Ligandenbindungsstelle fungiert. Dieser folgt eine transmembranäre Domäne, welche aus einer einzelnen hydrophoben α -Helix besteht und verantwortlich für die Verankerung des Rezeptors in der Membran ist. Auf diese folgt auf cytoplasmatischer Seite eine ungefähr 250 Aminosäuren lange Kinase-Homologie-Domäne (KHD). Wahrscheinlich moduliert die KHD die Aktivität der pGC, da die pGC in dieser Region durch andere Kinasen phosphoryliert wird (Lucas et al., 2000). Hinter der KHD folgt eine kurze Sequenz, die so genannte „Hinge-Region“. Diese Sequenz, welche die Struktur einer amphiphatischen α -Helix besitzt, scheint an der Dimerisierung der pGC beteiligt zu sein (Wilson und Chinkers, 1995). Ihr folgt am C-Terminus des Proteins die katalytische Domäne, in welcher in einer Ein-Schritt-Austauschreaktion die Cyclisierung von GTP zu cGMP erfolgt. Die pGC besitzen sowohl als Homodimer als auch als Oligomer katalytische Aktivität. Die katalytische

Konversion von cGMP durch die pGC wird durch Nukleotide, Pyrophosphate, Calcium (Ca^{2+}) und assoziierte Proteine beeinflusst. Neben der Synthese des „second messengers“ cGMP sind pGC, in Analogie zu den AC, auch in der Lage G-Proteine zu modulieren.

1.2.2 Lösliche Guanylatcyclasen

Es wurden bislang vier verschiedene Gene für die sGC identifiziert (α_1 , α_2 , β_1 , β_2), deren Molekulargewichte je nach Spezies und Isoform für die größeren α -Untereinheiten zwischen 73 kDa und 82 kDa und für die β -Untereinheiten zwischen 70 bis 76 kDa liegen (zur Übersicht siehe: Hobbs, 2000; Friebe et al., 2003). Die sGC fungiert als endogener Rezeptor für NO sowie für Kohlenstoffmonoxid (CO) (Murad, 2006). Auf Proteinebene wurden bisher funktionelle α_1/β_1 und α_2/β_1 Heterodimere nachgewiesen (Russwurm et al., 1998; Harteneck et al., 1999). Zur Formation eines katalytisch aktiven Heterodimers, bestehend aus α - und β -Untereinheit, ist eine Coexpression beider Untereinheiten zwingend erforderlich (Harteneck et al., 1990; Hönicka et al., 1999). Die ubiquitär vorkommende α_1/β_1 -sGC, an welcher die meisten enzymologischen Untersuchungen durchgeführt wurden, wird vor allem in der Lunge, im Gehirn und in Thrombozyten stark exprimiert, während die α_2/β_1 -sGC vorwiegend im Gehirn und in der Plazenta gebildet wird (zur Übersicht siehe Denninger und Marletta, 1999; Mergia et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass die α_2 -Untereinheit, die eine Konsensussequenz für eine Interaktion mit PDZ-Domänen besitzt, über diese Sequenz an synaptischen Membranen an einem Komplex aus nNOS, NMDA-Kanal und „postsynaptischen density protein“ (PSD-95) bindet. Daher wird eine Beteiligung der α_2/β_1 -sGC an der Steuerung der synaptischen Übertragung im Gehirn vermutet (Russwurm et al., 2001). Eine Assoziation der α_1/β_1 -sGC an die Zellmembran wurde in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes sowie der zellulären Ca^{2+} -Konzentration beschrieben (Zabel et al., 2002; Agullo et al., 2005).

Die Untereinheiten der sGC gliedern sich in eine N-terminale Domäne, einer sich daran anschließenden PAS-ähnlichen Domäne, einer darauf folgenden α -Helix und einer C-terminalen katalytischen Cyclasedomäne (zur Übersicht siehe Hobbs, 2000; Lucas et al., 2000; Cary et al., 2006). Die katalytische Domäne weist eine hohe Homologie zu den entsprechenden Domänen der pGC und AC auf, welches einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der pGC und AC andeutet. Aufgrund von Mutagenesestudien und Kopräzipitationsuntersuchungen wird vermutet, dass die PAS-ähnliche Domäne und die α -Helix an der Dimerisierung der Untereinheiten beteiligt sind (Zhao und Marletta, 1997; Zhou et al., 2004; Shiga und Suzuki, 2004; Wagner et al., 2005; Cary et al., 2006). Die ungefähr 200 Aminosäuren lange N-terminale Domäne der β -Untereinheit bildet die konservierte Hämbindungsdomäne (Iyer et al., 2003; Nioche et al., 2004; Pellicena et al., 2004; Karow et al., 2005). Die an dieser Domäne koordinierte prosthetische Hämgruppe ist für die

Aktivierung des Enzyms durch NO verantwortlich. Sie weist eine charakteristische Bande bei 431 nm im UV/Vis-Spektrum (Soret-Bande) auf, die sich durch Bindung von NO zu 389 nm verschiebt. Verschiedene spektroskopische Untersuchungen demonstrierten, dass das zentrale Eisenatom der Hämgruppe über Histidin₁₀₅ an der β_1 -Untereinheit komplexiert ist (Wedel et al., 1994). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Carboxylgruppen der Hämgruppe für die Bindung dieser an die sGC essentiell sind (Ignarro et al., 1984). Basierend auf der Beobachtung postulierte Ignarro, dass die Häm-Carboxylgruppen mit positiv geladenen Gruppen der sGC eine Ionenbindung eingehen und hierdurch zur Bindung der Hämgruppe beitragen (Ignarro et al., 1984). Kürzlich konnte durch Mutationsstudien nachgewiesen werden, dass es sich bei den postulierten Häm-Ankeraminosäuren um Tyr₁₃₅ und Arg₁₃₉ der β_1 -Untereinheit handelt (Schmidt et al., 2004). Hiermit konnte erstmals dokumentiert werden, dass die prosthetische Hämgruppe zusätzlich zu dem axialen Liganden His₁₀₅ über die Aminosäuren Tyr₁₃₅ und Arg₁₃₉ an der Hämbindungsdomäne koordiniert ist (Wedel et al., 1994; Schmidt et al., 2004). Spektroskopische Untersuchungen und Kristallisationsstudien der zur sGC-Sequenz homologen Hämbindungsdomäne des Bakteriums *Thermoanaerobacter tengcongensis* sowie Kristallisationsstudien des sGC-homologen Bakteriums *Nostoc* bestätigten dieses Ergebnis (Karow et al., 2004; Nioche et al., 2004; Pellicena et al., 2004; Ma et al., 2007).

1.2.3 Atypische Guanylatcyclasen

Die in Säugetieren ubiquitär exprimierte α_1/β_1 -sGC wird durch NO ungefähr maximal 200-fach aktiviert und muss ein Heterodimer ausbilden, um katalytisch aktiv zu sein. Kürzlich wurden jedoch sGC-Isoformen entdeckt, die nur in geringem Maße bzw. gar nicht durch NO aktiviert werden können. Auch werden die sGC-Isoformen nicht durch die NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren YC-1 und BAY 41-2272 stimuliert (Morton et al., 2005). Diese sGC-Isoformen besitzen teilweise als Homodimere katalytische Aktivität. Im Gegensatz zur α_1/β_1 -sGC, die keinen Sauerstoff (O₂) bindet, wird die Aktivität einiger dieser sGC-Isoformen durch O₂ reguliert (Gray et al., 2004; Morton, 2004). Zu der Klasse der als atypischen Guanylatcyclasen bezeichneten sGC-Isoformen zählen die in Wirbeltieren vorkommende β_2 -sGC sowie verschiedene sGC-Isoformen der wirbellosen Spezies *Manduca sexta*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*. Die im Menschen vorwiegend in Leber und Niere exprimierte atypische Guanylatcyclase β_2 -sGC ist bis heute noch nicht vollständig charakterisiert und deren physiologische Bedeutung ebenfalls noch weitgehend unbekannt. Die β_2 -sGC besitzt eine der β_1 -sGC vergleichbare Häm-domäne sowie der α_1/β_1 -sGC vergleichbare NO-Bindungseigenschaften, jedoch aktiviert NO die β_2 -Untereinheit nur maximal 4-fach (Koglin et al., 2001; Karow et al., 2005). Phylogenetische Recherchen lassen erkennen, dass die in Säugetieren exprimierte β_2 -sGC

einen höheren Verwandtschaftsgrad zu den atypischen sGC-Isoformen in wirbellosen Spezies aufweist als zu den ebenfalls in Säugetieren exprimierten „typischen“ α_1 -, α_2 - und β_1 -sGC-Isoformen (Fitzpatrick et al., 2006). Es wird postuliert, dass die β_2 -sGC vorwiegend in homodimerischer Form funktionell aktiv ist, wie es auch für die atypischen sGC β_3 der *M. sexta* und Gyc-88E der *D. melanogaster* gezeigt wurde (Nighorn et al., 1999; Koglin et al. 2001; Langlais et al., 2004; Poulos, 2006).

1.3 Stimulatoren, Aktivatoren und Inhibitoren der sGC

1.3.1 Stickstoffmonoxid

NO wird endogen bei der von NOS (nNOS, iNOS, eNOS, mtNOS) katalysierten Konversion von L-Arginin zu Citrullin freigesetzt (Mayer und Andrew, 1998; Murad, 2006). Als Gas diffundiert NO durch Membranen und kann daher sowohl autokrin als auch parakrin wirken. NO aktiviert seinen endogenen Rezeptor, die sGC, durch Bindung an dessen prosthetische Hämgruppe (Humbert et al., 1990; Stone und Marletta, 1996; Hönicka et al., 1999). Der genaue Mechanismus der sGC-Aktivierung durch NO ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und Gegenstand aktueller Diskussionen (Ignarro, 2002). Hauptvoraussetzung der sGC-Aktivierung durch NO ist, dass die Hämgruppe in reduzierter Form vorliegt. Die Entfernung des Häms oder die Oxidation des zentralen Eisenatoms der Hämgruppe führt zu einer sGC-Form, die sich durch NO nahezu nicht mehr aktivieren lässt (Ignarro et al., 1986; Förster et al., 1996). Das zentrale Eisenatom der Hämgruppe bildet durch Koordination an die vier Stickstoffatome des Häms und an den axialen Liganden His₁₀₅ einen fünffach koordinierten Histidyl-Häm-Komplex aus. Bindung von NO an diesen Komplex führt zur Bildung eines sechsfach koordinierten Histidin-Häm-NO-Intermediats, welches rasch in einen fünffach koordinierten NO-Häm-Komplex zerfällt. Die Lösung der Eisen-Histidin-Bindung resultiert in einer maximal 200-fachen Aktivierung der sGC (Ignarro et al., 1982b). Spektroskopisch ist der Übergang von einem fünffach koordinierten Histidyl-Häm-Komplex zu einem fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex durch eine Verschiebung der Soret Bande im UV/Vis Spektrum von 431 nm zu 389 nm nachweisbar. Neuere Studien sprechen jedoch dafür, dass dieses einfache binäre Aktivierungsmodell den Prozess der sGC-Aktivierung durch NO nur unzureichend beschreibt. Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Geschwindigkeit, mit der sich das sechsfach koordinierte Histidin-Häm-NO-Intermediat in den fünffach koordinierten aktivierten Nitrosyl-Häm-Komplex umwandelt, von der Konzentration an freiem NO abhängig ist (Zhao et al., 1999; Ballou et al., 2002; Bellamy et al., 2002). In spektroskopischen Untersuchungen wurde die Existenz eines sechsfach koordinierten Histidin-Häm-NO-Intermediats der sGC bestätigt (Russwurm und Koesling, 2004; Cary et al., 2005). Die nahezu inaktive NO-haltige-sGC wurde vorwiegend in Gegenwart von niedrigen NO-Konzentrationen gebildet. Zugabe von NO, dem

sGC-Substrat GTP oder den Katalyseprodukten cGMP und Pyrophosphat, überführten die inaktive NO-haltige-sGC in den vollständig aktivierten Zustand (Russwurm und Koesling, 2004; Cary et al., 2005). Im Gegensatz hierzu unterbanden physiologische Konzentrationen an ATP die Umwandlungsreaktion, was eine direkte Verbindung des NO-sGC-cGMP-Signalweges mit dem zellulären Energiestoffwechsel andeutet (Cary et al., 2005). Des Weiteren könnten diese Befunde ein Hinweis auf eine zweite NO-Bindungsstelle an der sGC sein.

1.3.2 Kohlenstoffmonoxid

CO wird endogen beim Abbau von Häm zu Biliverdin durch die Hämoxxygenasen (HO-1, HO-2, HO-3) freigesetzt (Ryter et al., 2002). Die CO-Bindungsstelle innerhalb der sGC ist, wie für NO, die prosthetische Hämgruppe. Bindung von CO an die sGC führt zur Ausbildung eines sechsfach koordinierten Carbonyl-Häm-Komplexes und maximal zu einer ungefähr 5-fachen Aktivierung der sGC (Friebe et al., 1996; Stone und Marletta, 1998; Hönicka et al., 1999; Denninger et al., 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Anwesenheit von sGC-Stimulatoren, wie YC-1, die Aktivierung der isolierten sGC durch CO der NO-induzierten Aktivierung vergleichbar ist (Friebe et al., 1996; Hönicka et al., 1999). Die physiologische Bedeutung der CO-induzierten Aktivierung der sGC ist bis heute noch weitgehend ungeklärt (zur Übersicht siehe: Kim et al., 2006).

1.3.3 Protoporphyrin IX

Protoporphyrin IX (PPIX), die eisenfreie Vorstufe des Häms, imitiert den fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex und führt so zu einer Aktivierung der sGC (Ignarro et al., 1984; Friebe et al., 1997; Friebe und Kösling, 1998). Experimentell wird bzw. wurde PPIX dazu benutzt, die Rolle des zentralen Eisenatoms der Hämgruppe und die Bedeutung der Eisen-Histidin-Bindung für die sGC-Aktivierung zu untersuchen (Ignarro et al., 1982a; Ignarro et al., 1984). Kürzlich wurde publiziert, dass aus der Porphyrinvorstufe δ -Aminolävulinsäure intrazellulär gebildetes PPIX eine Relaxation der Pulmonalarterie und eine Aktivierung der sGC bewirkt (Mignone et al., 2006). Mit dieser Untersuchung wurde erstmals die Bedeutung der Protoporphyrin vermittelten Aktivierung der sGC beschrieben, die endogen insbesondere in Gewebe mit hoher Syntheseaktivität, wie beispielsweise Tumoren, auftreten kann (Perkins, 2006).

1.3.4 sGC-Stimulatoren

Im Jahre 1994 wurde bei der Bayer AG in Wuppertal mit der Suche nach Substanzen, welche die cGMP-Synthese stimulieren, gestartet. Mittels Screening von ungefähr 20.000 Substanzen wurden 5-substituierte-2-Furaldehyd-Hydrazone-Derivate entdeckt, welche die sGC unabhängig von NO stimulieren konnten. Interessanterweise zeigte sich bei dieser Substanzklasse eine Erhöhung der Wirkung am isolierten Enzym und isolierten Gefäß durch

Tageslichteinwirkung. Solch eine photosensibilisierte Enzymaktivierung war jedoch für eine weitergehende Entwicklung dieser Substanzklasse als Herz-Kreislauf-Pharmaka hinderlich. Im gleichen Jahr wurde von Ko und Mitarbeitern mit YC-1 ein Indazolderivat beschrieben, das die Thrombozytenaggregation über eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Synthese inhibiert (Ko et al., 1994). Weitergehende Charakterisierungen von YC-1, welches eine deutliche strukturelle Ähnlichkeit zu der Bayer-Substanzklasse aufwies, ließen erkennen, dass mit dieser Substanz erstmals ein NO-unabhängiger, aber Häm-abhängiger Stimulator der sGC identifiziert wurde (Wu et al., 1995; Friebe et al., 1996; Mülsch et al., 1997; Hönicka et al., 1999). Nachteilig war jedoch, dass YC-1 eine sehr geringe Wirkstärke aufwies und unspezifisch Phosphodiesterasen (PDEs) inhibierte (Galle et al., 1999). Ausgehend von YC-1 als Leitsubstanz wurde nach Substanzen gesucht, welche eine höhere Wirkstärke als YC-1 besaßen und keine relevante Phosphodiesterase (PDE-) Hemmung aufwiesen. Dies führte zur Identifizierung der Pyrazolopyridin-Derivate, BAY 41-2272 und BAY 41-8543, die die sGC durch einen NO-unabhängigen, jedoch Häm-abhängigen Mechanismus stimulieren (Stasch et al., 2001; Straub et al., 2001; Koglin et al., 2002; Stasch et al., 2002a; b; c; Straub et al., 2002; Bischoff und Stasch, 2004). Diese beiden Substanzen bilden gemeinsam mit den kürzlich publizierten, strukturell diversen Substanzen CMF-1571 und A-350619 die neue Klasse der sGC-Stimulatoren (zur Übersicht siehe Evgenov et al., 2006). Gemeinsame Charakteristika dieser Substanzklasse sind eine NO-unabhängige und selektive Aktivierung der hämhaltigen sGC (Garthwaite et al., 1995; Förster et al., 1996; Friebe et al., 1996; Schrammel et al., 1996; Olesen et al., 1998; Hönicka et al., 1999; Martin et al., 2001; Stasch et al., 2001; Stasch et al., 2002a). Darüber hinaus zeigen die sGC-Stimulatoren in Kombination mit NO einen synergistischen Effekt auf die sGC-Aktivierung, welcher auf einer Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes basiert (Schmidt et al., 2004). Des Weiteren potenzieren sGC-Stimulatoren die durch CO-induzierte sGC-Aktivierung auf NO-vergleichbare Aktivierungslevel (Friebe et al., 1996; Stone und Marletta, 1998). Die genaue Bindungsstelle der sGC-Stimulatoren an der sGC ist bis heute Gegenstand der Diskussion (Evgenov et al., 2006). Da sGC-Stimulatoren die spektroskopischen Eigenschaften der Hämgruppe beeinflussen, wird einerseits vermutet, dass die sGC-Stimulator Bindungsstelle in der Nähe der Hämgruppe lokalisiert ist. Andererseits wird postuliert, dass sGC-Stimulatoren in Analogie zum AC-Aktivator Forskolin innerhalb der katalytischen Domäne binden (Tesmer et al., 1997; Mayer und Koesling, 2001; Poulos, 2006). Spektroskopische Untersuchungen mit der isolierten Hämbindungsdomäne (β_1 1-385) der sGC, welche keine katalytische Domäne besitzt, dokumentierten jedoch, dass die durch YC-1 induzierten spektroskopischen Veränderungen noch vorhanden waren (Denninger et al., 2000). Auch wurde in Mutationsstudien gezeigt, dass in N-terminal deletierten α_1 -sGC-Mutanten keine YC-1 aktivierenden Eigenschaften vorhanden waren (Koglin und Behrends, 2003). Die

Ergebnisse legen eine Bindungsstelle von YC-1 außerhalb der katalytischen Domäne nahe. In Photoaffinitätsstudien, durchgeführt von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen, mit photolabilen Bay 41-2272 und YC-1 Analoga wurde die α_1 -Untereinheit markiert (Stasch et al., 2001; Hering et al., 2006). Die in der Untersuchung von Stasch et. al. markierten Cysteine 238 und 243 der α_1 -Untereinheit scheinen jedoch nicht direkt an der Bindung der sGC-Stimulatoren beteiligt zu sein, da in anschließenden Mutationsstudien kein Effekt dieser Cysteine auf die durch BAY 41-2272 vermittelte Enzymstimulierung festgestellt werden konnte (Evgenov et al., 2006).

1.3.5 sGC-Aktivatoren

Die Entwicklung eines zellbasierten, schnellen und hochempfindlichen cGMP-Messsystems ermöglichte ein „High-Throughput Screening“ (HTS) zur Identifizierung von Substanzen, die die sGC aktivieren (Stasch et al., 2002; Wunder et al., 2005). Durch ein HTS von mehr als 900.000 Substanzen konnte eine neue Strukturklasse identifiziert werden, die die sGC bereits ab Konzentrationen von 0,1 nM konzentrationsabhängig aktiviert. Gemeinsame Charakteristika dieser Substanzklasse sind, dass sie in Kombination mit NO nur einen additiven Effekt auf die Enzymaktivierung ausüben und dass die Aktivierung des oxidierten oder hämfreien Enzyms im Vergleich zum hämhaltigen Enzym deutlich stärker ist (Stasch et al., 2006). Nach Identifizierung einer Leitstruktur aus dem HTS wurde in einem chemischen Syntheseprogramm BAY 58-2667 aus über 800 Substanzen als wirkstärkster Vertreter dieser als sGC-Aktivatoren bezeichneten Substanzklasse ausgewählt. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass BAY 58-2667 die oxidierte Hämgruppe verdrängt, die durch Schwächung der Eisen-Histidin-Bindung nur schwach an der sGC gebunden ist (Hobbs, 2000). Bei sehr hohen Konzentrationen ist BAY 58-2667 in der Lage auch die reduzierte, stark gebundene prosthetische Hämgruppe der sGC zu verdrängen (Schmidt et al., 2004). Am hämfreien Enzym inhibierten Metalloporphyrine, wie ZnPP-IX, welche die Hämgruppe der sGC ersetzen, die durch BAY 58-2667 induzierte sGC-Aktivierung konzentrationsabhängig (Schmidt et al., 2004; Stasch et al., 2006). Auch wurde gezeigt, dass das charakteristische sGC-Hämbindungsmotiv Tyr-x-Ser-x-Arg sowohl für die Interaktion der negativ geladenen Propionsäuren der Hämgruppe als auch für die Wirkung von BAY 58-2667 zwingend erforderlich ist (Pellicena et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005; Rothkegel et al., 2006). Strukturelle Alignments zeigten, dass BAY 58-2667 in der Lage ist, die räumliche Struktur der Hämgruppe zu imitieren (Schmidt et al., 2004). Vor diesem Hintergrund wird angenommen, dass die Bindungsstelle von BAY 58-2667 an der sGC identisch zur Bindungsstelle der Hämgruppe ist. Deshalb scheint BAY 58-2667 aufgrund dieser Bindungseigenschaften in der Lage zu sein, zwischen der reduzierten und der oxidierten und letztendlich hämfreien Form der sGC zu unterscheiden (Stasch et al., 2006). In Photoaffinitätsexperimenten mit einem photolabilen BAY 58-2667 Analogon wurde

eine weitere Bindungsstelle außerhalb der Hämbindungsdomäne identifiziert (Schmidt et al., 2003). Es wird vermutet, dass BAY 58-2667 über diese Bindungsstelle auch an die reduzierte Form der sGC binden kann. Kürzlich wurde mit dem Anthranilsäurederivat HMR-1766 eine Verbindung beschrieben, die ein vergleichbares Aktivierungsprofil zu BAY 58-2667 an der sGC aufweist (Schindler et al., 2006). HMR-1766 besitzt jedoch keine strukturelle Ähnlichkeit zu BAY 58-2667. Im Unterschied zu BAY 58-2667 aktiviert HMR-1766 die sGC erst im mikromolaren Konzentrationsbereich und ist damit wesentlich wirkschwächer als BAY 58-2667 (Schindler et al., 2006).

1.3.6 sGC-Inhibitor ODQ

ODQ (1H-(1,2,4)-Oxadiazol(4,3-a)quinoxalin-1-on) ist ein selektiver und spezifischer Inhibitor der sGC (Garthwaite et al., 1995; Schrammel et al., 1996; Olesen et al., 1997). Durch spektroskopische Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass ODQ das zentrale Eisenatom der Hämgruppe oxidiert. Die durch ODQ-induzierte Oxidation der Hämgruppe ist recht spezifisch, da ODQ erst in wesentlich höheren Konzentrationen zu einer unspezifischen Oxidation anderer Hämproteine führt (Feelisch et al. 1999; Zhao et al., 2000). ODQ zeigt auch keine Inhibition der pGC, der AC sowie der NOS. Durch diese Spezifität ist ODQ ein wertvolles Hilfsmittel, um die cGMP-abhängigen und unabhängigen Wirkungen von NO zu unterscheiden sowie die oxidierte Form der sGC näher zu charakterisieren.

1.4 cGMP-Effektorsysteme

Der durch die GCs aus GTP gebildete „second messenger“ cGMP bindet je nach zelltypischer Proteinausstattung an cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK), cGMP-regulierte PDEs und cGMP-regulierte Ionenkanäle (zur Übersicht siehe: Lucas et al., 2002). Über diese Effektorsysteme reguliert cGMP viele physiologische Prozesse, unter anderem die Relaxation und Proliferation von Glattmuskelzellen, die Herzfunktion, den Entzündungsprozess, die Thrombozytenaggregation und -adhäsion, den Sehprozess und die neuronale Signaltransduktion (Abb. 1.1) (Jeon et al., 2005; Bender und Beavo, 2006; Feil und Kemp-Harper, 2006; Hofmann et al., 2006; Pifferi et al., 2006; Jackson et al., 2007).

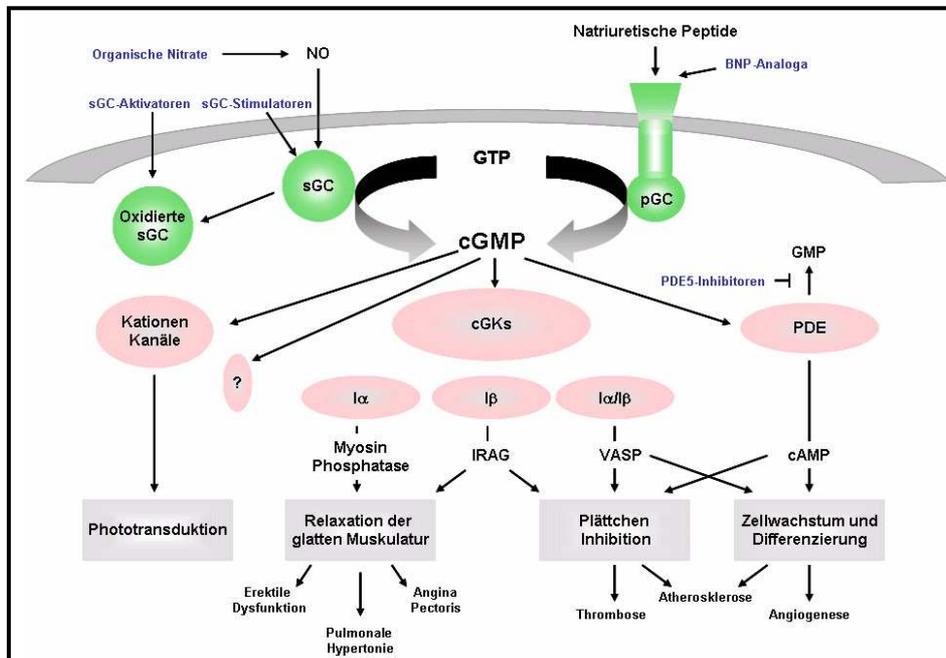


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des cGMP-Signalwegs. cGMP-generierende Systeme sind in Grün und cGMP-Effektorsysteme in Rot markiert. Arzneistoffe, die den cGMP-Signalweg beeinflussen, sind in Blau dargestellt (modifiziert nach Feil und Kemp-Harper, 2006).

1.4.1 cGMP-regulierte Phosphodiesterasen

Die Konzentration an intrazellulärem cGMP wird durch das Zusammenwirken von cGMP-bildenden GCs und cGMP-abbauenden PDEs bestimmt (Jeon et al., 2005; Bender und Beavo, 2006). Die Familie der PDEs wird aufgrund der Gewebeverteilung, Substratspezifität und Regulation in 11 Gen-Familien eingeteilt (PDE1-PDE11), die sich jeweils aus 1-4 verschiedenen Genen zusammensetzen. In Säugetieren existieren 25 Gene, die mehr als 50 PDEs codieren (Venter, 2001). Die PDEs 5, 6 und 9 katalysieren spezifisch den cGMP-Abbau, während die PDEs 4, 7 und 8 spezifisch den cAMP-Abbau katalysieren. Die PDEs 1, 2, 3, 10 und 11 katalysieren sowohl den cGMP- als auch den cAMP-Abbau. Wegen ihrer Substratspezifität und ihres gewebsspezifischen Expressionsmusters sind PDEs ein viel versprechender Angriffspunkt für die Entwicklung von Wirkstoffen, die den cGMP- bzw. den cAMP-Spiegel modulieren sollen. Bereits seit Jahrzehnten werden der unspezifische PDE-Inhibitor Theophyllin als Bronchodilator und der PDE3-Inhibitor Milrinone für die Kurzzeitbehandlung der Herzinsuffizienz in der Therapie eingesetzt. Des Weiteren wurden in den letzten 10 Jahre mehrere selektive Inhibitoren der PDE5 (Sildenafil, Viagra[®]; Tadalafil, Cialis[®]; Vardenafil, Levitra[®]) zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen (zur Übersicht siehe: Bender und Beavo, 2006; Kane und Klings, 2006). Seit kurzem wird Sildenafil zusätzlich unter dem Markennamen Revatio[®] zur Therapie der pulmonalen

Hypertonie eingesetzt (Evgenov et al., 2006). Inhibitoren der PDE4 befinden sich in der klinischen Prüfung zur Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen (Bender und Beavo, 2006).

1.4.2 cGMP-abhängige Proteinkinasen

cGK beeinflussen über eine Phosphorylierung von Proteinen, die den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel regulieren, verschiedene physiologische Prozesse, wie die Vasorelaxation, die Herzfunktion, die Plättchenaktivität, die Immunzelltätigkeit und die Neurotransmission (zur Übersicht siehe: Hofmann et al., 2006). In Säugetieren codieren zwei Gene drei cGK-Isoformen. Die lösliche cGK-Typ-I (cGKI) gliedert sich in eine α - und eine β -Isoform und wird vorwiegend in der glatten Muskulatur, in Plättchen und im kardiovaskulären System exprimiert. Während die membranständige cGK-Typ-II (cGKII) hauptsächlich im Intestinaltrakt, in der Niere und im Gehirn exprimiert wird. Untersuchungen mit cGK-Knockout Mäusen ließen erkennen, dass die cGKI vorwiegend im kardiovaskulären System aktiv ist und die vasorelaxierende Wirkung von cGMP zum Teil über eine Aktivierung von cGKI vermittelt wird (Pfeifer et al., 1998; Koeppen et al., 2004; Sausbier et al., 2005). Die cGKII ist ebenfalls an der Regulation des Herzkreislauf-Systems durch Reninausschüttung und Ionentransportregulation in der Niere beteiligt (Pfeifer et al., 1996; Wagner et al., 1998).

1.4.3 cGMP-gesteuerte Ionenkanäle

Ionenkanäle, die durch cyclische Nukleotide (cAMP und cGMP) reguliert werden, beeinflussen zahlreiche physiologische Prozesse. So übersetzen sie durch Kanalöffnung Veränderungen in der Konzentration an Signalmolekülen in Membranpotential, und zwar in Abhängigkeit vom intrazellulären cyclischen Nukleotid-Spiegel. Nach der Aktivierung der Ionenkanäle durch cyclische Nukleotide strömen Na^+ , K^+ oder Ca^{2+} in die Zelle, welche als „third messenger“ weitere Signalkaskaden regulieren (zur Übersicht siehe: Hofmann et al., 2005). Die Ionenkanäle gliedern sich in zwei Familien: cyclisch-Nukleotid-gesteuerte (CNG) und Hyperpolarisations-aktivierte cyclisch Nukleotid-gesteuerte (HCN) Ionenkanäle (Craven und Zagotta, 2006). CNG-Kanäle werden vorwiegend in olfaktorischen Neuronen und Photorezeptoren exprimiert, während HCN-Kanäle in Neuronen und im Herzen exprimiert werden (Hofmann et al., 2005). CNG- und HCN-Kanäle weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und gehören zur Überfamilie der aus sechs-Transmembran-Segmenten bestehenden Kanäle (Robinson und Siegelbaum, 2003). CNG-Kanäle sind Heterotetramere, die aus den homologen Untereinheiten A (CNGA1-CNGA4) und B (CNGB1 und CNGB3) zusammengesetzt sind. Die CNG-Kanäle werden durch Bindung von cyclischen Nukleotiden aktiviert. (Bradley et al., 2001). Die Familie der HCN-Kanäle besteht aus vier verschiedenen Typen (HCN1-HCN4), die eine 60%ige Sequenzidentität aufweisen. Neben einer Modulation durch cyclische Nukleotide werden HCN-Kanäle zusätzlich durch

Spannung aktiviert. HCN-Kanäle beeinflussen die Tätigkeit der Schrittmacherzellen des Herzens und sind daher ein Angriffsziel zur Entwicklung von Wirkstoffen, die zur Behandlung von Arrhythmien eingesetzt werden können. Kürzlich wurde mit Ivabradine (Procorlan®) der erste HCN-Kanal Blocker zur Therapie der stabilen Angina Pectoris in Deutschland zugelassen.

1.5 Oxidativer Stress

Unter „Oxidativem Stress“ versteht man eine vermehrte Bildung an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Körper. Oxidativer Stress ist assoziiert mit zahlreichen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie z.B. Bluthochdruck und Atherosklerose (Hare, 2004; Melichar et al., 2004; Guzik und Harrison, 2006; Boerrigter et al., 2007). Endogen werden ROS, wie Superoxid-Radikale, Hydroxy-Radikale und Wasserstoffperoxid, durch den aerobischen Metabolismus gebildet. Hauptquellen für endogen produzierte ROS sind NADPH-Oxidasen, Xanthinoxidasen und entkoppelte NOS (Warnholtz et al., 1999; Guzik und Harrison, 2006). Die ROS weisen eine hohe Reaktivität auf indem sie als starke Oxidantien wirken. Die NO-Bioverfügbarkeit vermindern ROS, indem sie mit NO zu dem starken Oxidans Peroxynitrit reagieren (Pryor und Squadrito, 1995; Bian et al., 2006). Auch oxidieren ROS den NOS-Cofaktor Tetrahydrobiopterin. Hierdurch erfolgt eine Entkopplung der NOS die dazu führt, dass diese ROS anstelle von NO produzieren und somit zu einer weiteren Erhöhung des ROS-Spiegels beitragen (Guzik und Harrison, 2006). Darüber hinaus wird die NO-sensitive sGC durch eine ROS-induzierte Oxidation des zentralen Eisen-Atoms der prosthetischen Hämgruppe der sGC in die oxidierte NO-insensitive Form überführt (Abb. 1.2) (Wedgwood et al., 2005; Gladwin, 2006; Stasch et al., 2006). Es gibt Untersuchungen, die dokumentieren, dass der Expressionslevel der sGC ebenfalls unter oxidativen Stress Bedingungen vermindert ist (Bauersachs et al., 1998; Ruetten et al., 1999; Kloss et al., 2000). Daher kann durch verbleibendes NO nur eine verminderte Aktivierung der sGC erfolgen. Dieses durch ROS-induzierte „NO-Resistenz-Syndrom“ geht einher mit einer Progression endothelialer und vaskulärer Dysfunktionen, welche letztendlich zu koronarer Herzkrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall führen (Gladwin, 2006; Stasch et al., 2006). Vor diesem Hintergrund ist auch erklärbar, weshalb teilweise unter NO-Donor Therapie keine Verbesserung, sondern eine Verschlechterung der endothelialen Dysfunktion beobachtet wurde (Warnholtz et al., 2002a; Münzel et al., 2007).

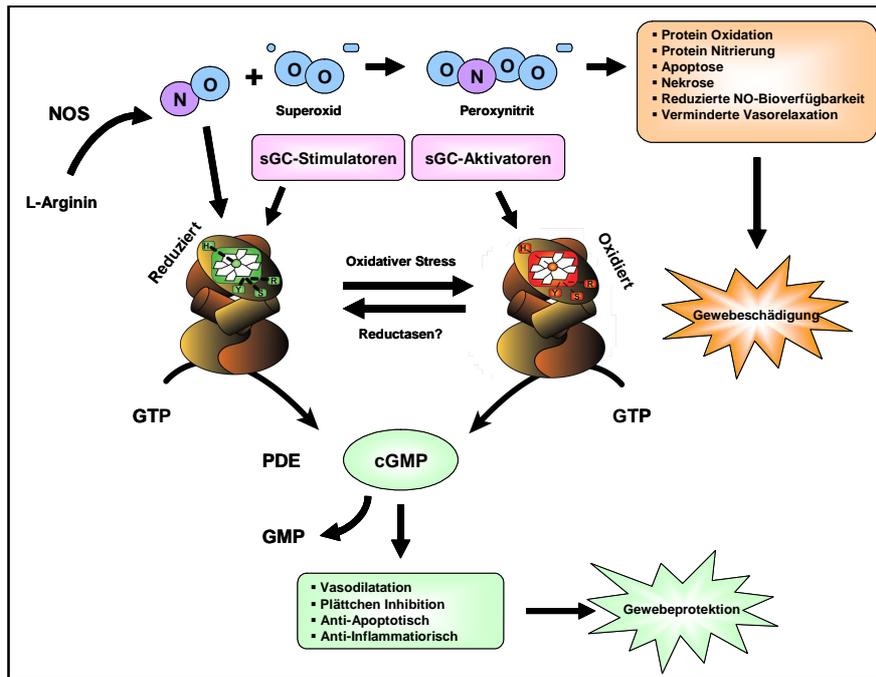


Abbildung 1.2: Redoxformen der sGC und Angriffspunkte von sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren (modifiziert nach Evgenov et al., 2006).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Entdeckung, dass NO über die Aktivierung seines ubiquitär vorkommenden endogenen Rezeptors sGC und der damit verbundenen cGMP-Katalyse zahlreiche physiologische Prozesse, wie die Vasodilatation, die Neurotransmission und die Plättchenaggregation, reguliert, rückte die Erforschung des NO-sGC-cGMP-Signalweges in den Fokus der Forschung (Murad, 2006).

In den letzten Jahren wurden Substanzen identifiziert, die die sGC unabhängig von NO aktivieren. Diese Substanzen lassen sich in zwei Klassen einteilen: die der NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren, wie BAY 41-2272, und die der NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren, wie BAY 58-2667. Die Generierung einer cGMP-Reporterzelllinie ermöglichte die cGMP-Produktion in lebenden Zellen auf Lumineszenzbasis zu messen. Durch die cGMP-Reporterzelllinie in Kombination mit sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren konnte zum ersten Mal intrazellulär zwischen hämfreier und hämhaltiger sGC unterschieden werden. Des Weiteren ermöglichte die cGMP-Reporterzelllinie, die Auswirkungen von Mutationen der sGC auf die katalytische Aktivität erstmals direkt in einer intrazellulären Umgebung zu untersuchen. Durch diese Methode konnten bereits Teile des Hämbindungsmotivs der sGC identifiziert werden (Schmidt et al., 2004). Kristallisationsstudien der zur sGC-Sequenz homologen Häm-bindungsdomänen des

Bakteriums *Thermoanaerobacter tencongensis* und *Nostoc* bestätigen diese ermittelten Ergebnisse (Karow et al., 2004; Nioche et al., 2004; Pellicena et al., 2004; Ma et al., 2007).

Um die Aktivierung der sGC weitergehend zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- ***Sind weitere Aminosäuren innerhalb der Hämbindungsdomäne der sGC an der Hämbindung beteiligt? Welche Aminosäuren der Hämbindungstasche sind an der intramolekularen Signaltransduktion der sGC beteiligt?***

Ausgehend von der Kristallstruktur der Hämbindungsdomäne des Bakteriums *Thermoanaerobacter tencongensis*, welche zur sGC-Sequenz homolog ist, ein Homologiemodell der sGC-Hämbindungsdomäne angefertigt. Auf Grundlage des Modells und einem anschließenden Sequenzalignment wurden konservierte Aminosäuren, die durch ihre Position zur Hämgruppe an der Bindung der Hämgruppe oder am intramolekularen Signaltransduktion beteiligt sein könnten, identifiziert. Die Aminosäuren wurden mutiert und das Aktivitätsprofil der Mutanten mittels transients Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie charakterisiert.

- ***Ist die Aminosäurestruktur der Hämbindungstasche für die bevorzugte Bindung von NO gegenüber O₂ an die prosthetische Hämgruppe verantwortlich?***

Dazu wurde ein Isoleucin der distalen Hämbindungstasche gegen ein polares Tyrosin ausgetauscht und das Aktivierungsprofil dieser Mutante mittels transients Transfektion in die cGMP-Reporterzelle charakterisiert.

- ***Welche Sequenzabschnitte sind für die Dimerisierung von α_1/β_1 -sGC verantwortlich?***

Hierzu wurde die kürzlich entwickelte Methode der bimolekularen Fluoreszenz Komplementation (BiFC) in Kombination mit der cGMP-Reporterzelllinie angewendet. Die codierenden Sequenzen für α_1 -sGC und β_1 -sGC wurden in die BiFC-Vektoren pBiFC-YN und pBiFC-YC kloniert. Es wurde ein Multisequenzalignment der postulierten Dimerisierungsdomänen zur Identifikation konservierter Regionen durchgeführt. Konservierte Aminosäuren wurden deletiert und die Deletionsmutanten transient in die cGMP-Reporterzellen transfiziert. Die Fähigkeit der Deletionsmutanten zur Dimerisation wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Das Aktivierungsprofil der Deletionsmutanten wurde mittels transients Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie charakterisiert.

- ***Wird die subzelluläre Lokalisation der sGC durch Aktivierung mit DEA/NO, BAY 41-2272 oder BAY 58-2667 beeinflusst?***

Es wurden Fusionsproteine von α_1 -sGC mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und β_1 -sGC mit DsRed generiert. Die subzelluläre Verteilung der sGC wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nach transienter Transfektion in humane Endothelzellen von Nabelschnurvenen (HUVEC), in humane Glattmuskelzellen von Aorten (HASMC) und cGMP-Reporterzellen ermittelt. Des Weiteren wurden immunhistochemische Untersuchungen mit GFP-markierten Sekundärantikörpern und anschließender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie an der GColf8.9.7-Zelllinie, einer cGMP-Reporterzelllinie, die mit sGC stabil transfiziert ist, durchgeführt.

- ***Kann die Selektivität von BAY 58-2667 für die oxidierte bzw. hämfreie Form der sGC auch auf erkrankte Gefäße übertragen werden?***

Hierzu wurde die Wirkung des NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivators BAY 58-2667 an isolierten Aorten von Ratten alleine und in Gegenwart des sGC-Oxidans ODQ getestet. Darüber hinaus wurde die Wirkung von BAY 58-2667 an isolierten Gefäßen von spontan hypertensiven Ratten (SHR), Watanabe Kaninchen mit vererbter Hyperlipidämie (WHHL), ApolipoproteinE Knockout Mäusen (ApoE^{-/-}) sowie an isolierten Arterien von Typ-II-Diabetikern jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgefäßen charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1 Substanzen

NO-Donor

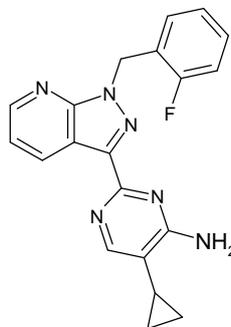
DEA/NO (2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid) wurde als NO-Donor eingesetzt. DEA/NO weist bei neutralem pH eine Halbwertszeit von 2 min auf. Daher wurde unmittelbar vor jedem Test eine 10 mM DEA/NO Stammlösung in 10 mM NaOH auf Eis hergestellt und in den jeweiligen Testpuffern auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt (Morley und Keefer, 1993; Morley et al., 1993).

sGC-Inhibitor

ODQ (1H-(1,2,4)-Oxadiazolo-(4,3a)-quinoxazin-1-one) wurde als sGC-Inhibitor verwendet. ODQ inhibiert durch Oxidation des zentralen Fe^{2+} -Atoms der prosthetischen Hämgruppe eine Stimulierung der sGC durch NO- oder Häm-abhängige sGC-Stimulatoren (YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543) (Yoshina und Kuo, 1978; Schrammel et al., 1996; Stasch et al., 2001, 2002a). ODQ weist eine Selektivität für die sGC auf, da erst in sehr hohen Konzentrationen auch andere Hämproteine unspezifisch oxidiert werden (Feelisch et al., 1999; Zhao et al., 2000). ODQ wurde zu 10 mM in DMSO gelöst und in Wasser (MilliQ-Qualität) verdünnt.

Häm-abhängiger sGC-Stimulator

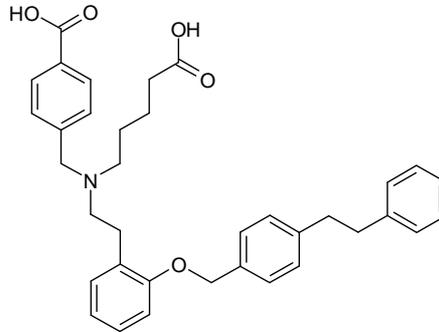
Es wurde der Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 verwendet (Stasch et al., 2001; Straub et al., 2001, 2002). BAY 41-2272 wurde in DMSO zu einer Konzentration von 10 mM DMSO gelöst und in den jeweiligen Testpuffern verdünnt.



BAY 41-2272

Häm-unabhängiger sGC-Aktivator

Als Häm-unabhängiger sGC-Aktivator wurde BAY 58-2667 in den Untersuchungen verwendet (Alonso-Alija et al., 2001). BAY 58-2667 wurde in DMSO gelöst (10 mM) und anschließend in den jeweiligen Testpuffern verdünnt.



BAY 58-2667

Protoporphyrin IX

PPIX, die eisenfreie Vorstufe des Häms, aktiviert durch Imitation des pentakoordinierten Häm-Nitrosyl-Komplexes die sGC (Ignarro et al, 1982a). PPIX wurde zu 10 mM in DMSO gelöst und in 10 mM NaOH auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt.

2.2 Geräte

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Agarosegelkammer	Agagel™ Standard	Biometra, Göttingen
Blot-Kammer	Trans-Blot™ Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
Blot-Kammer	Mini Trans-Blot™ Transfer Cell	BioRad, München
Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Heraeus, Düsseldorf
CCD-Kamera	Eigenbau	Bayer HealthCare, Wuppertal
Demineralisierungsanlage	MilliQ HF Water System	Millipore, Schwalbach
Densitometer	GS-710 Calibrated Imaging Densitometer™	BioRad, München
Elektrophorese-Apparatur	Protean II XI cell	BioRad, München
ELISA-Reader	SLT Spectra Elisa Reader	SLT, Crailsheim
Konfokal-Mikroskop	LSM 510	Zeiss, Jena

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller, Ort
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 TM	AGFA, Köln
Isolierte Organ Apparatur	Eigenbau	Bayer HealthCare, Wuppertal
Mikroskop	Axiovert 100, Olympus BH-2	Zeiss, Jena
PCR-Cycler	UNO-Thermoblock TM	Biometra, Göttingen
pH-Meter	pH-Meter 765 Kalimatic	Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Photo-Imager	BAS 5000 Scanner	RayTest, Straubenhardt
SpeedVac	Bachofer Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
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 TM	Mettler Toledo, Giessen
Wasserbad	Julabo 19A mit Thermostat	Julabo, Seelbach
Wasserbad	Julabo U3	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Biofuge A Heraeus Sepatech	Heraeus, Düsseldorf
Zentrifuge	Ultrazentrifuge mit Rotor 70.1Ti	Beckmann, München
Zentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Düsseldorf
Zentrifuge	Cryofuge 5000 Heraeus Sepatech	Heraeus, Düsseldorf

2.3 Materialien und Chemikalien

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Anti-Rabbit HRP-Detektions-Kit	Vectastain™ ABC	Vectorlabs, Wiesbaden
Autoradiographiefilme	ECL-Hyperfilm™	Amersham Biosciences, Freiburg
Blot-Membranen	Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose	BioRad, München
Blot-Filterpapier	Mini Trans-Blot® Filter Paper	BioRad, München
DNA-Dephosphorylierungs-Kit	Shrimp Alkine Phosphatase	Roche, Basel, Schweiz
DNA-Ligations-Kit	Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Basel, Schweiz
DNA-Gel-Extraktions-Kit	QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
ECL-Kit	ECL-Chemilumineszens-Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Fluoreszenzvektor	EGFP-N2	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzvektor	DsRed-C1	BD Biosciences, Heidelberg
Gelladepuffer	6 x Loading Dye	Fermentas, Leon-Rot
Maxi-Prep Kit	QIAprep™ Spin Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
Mini-Prep Kit	QIAprep™ Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Mutagenese-Kit	QuickChange™ Mutagenesis XL	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsendonukleasen	BsiWI, ClaI, HindIII, NotI	Roche, Basel, Schweiz
Szintillationsgefäße	20 ml Propylengefäße	Zinsser Analytic, Frankfurt
Transfektionsreagenz	Lipofectamin™, Plus™	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Glycin-Gel	ProGel Tris-Glycin 10%	Anamed, Darmstadt
UV-Einwegküvetten	UVette™	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturmaterial	Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturmaterial	Neugebauer Zählkammer	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturmaterial	Rubber Policemen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturmaterial	Mediumfiltriereinheiten (0,22 µM)	Costar, Cambridge, USA
Zellkultur-Objektträger	LabTek-II Chambered Coverglas	NalgeNunc, Naperville, USA

Chemikalien

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad, soweit nicht anders vermerkt, von den folgenden Firmen bezogen:

Alexis	Grünberg
Calbiochem	Bad Soden
Merck	Darmstadt
Riedel de Haen	Seelze
Sigma	Deisenhofen

Folgende Radiochemikalien wurden bezogen:

[α ³²P]-GTP (Spezifische Aktivität: 29,6 TBq/mmol) Perkin-Elmer, Rodgau-Jürgesheim

2.4 Lösungen und Medien

2.4.1 LB-Agarplatten

LB-Agarlösung	15 g Agar
	1000 ml LB-Broth Medium
	In Mikrowelle aufkochen, anschließend auf ca. 40°C abkühlen lassen
	1000 μ l Ampicillin (100 mg/ml) bzw. 1000 μ l Kanamycin (50 mg/ml) hinzupipettieren
	20 ml der Agaroselösung in eine sterile Petrischale pipettieren

2.4.2 Gelelektrophorese von DNA

Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (10 x)	48,4 g Tris-Base
	11,42 g Essigsäure
	20 ml 0,5 mM EDTA, pH 8,0
	Ad 1000 ml H ₂ O (MilliQ-Qualität)
Agaroselösung	1g Agarose (Molekularbiologie Qualität)
	100 ml 1 x TAE-Puffer
	In Mikrowelle aufkochen, anschließend etwas abkühlen lassen
	5 μ l Ethidiumbromid hinzugeben

2.4.3 Gelelektrophorese von Proteinen

SDS-Laufpuffer	100 mM Tris-HCl (ohne pH-Einstellung) 100 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Zellyse-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

2.4.4 Western Blot

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

2.4.5 Immuno-Sandwich-Assay

PBS	1 Tablette PBS (Oxoid, Hampshire, England) 100 ml H ₂ O (MilliQ-Qualität), pH 7,5
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) BSA
TBS-T 3% BSA 0,01% NaN ₃	TBS - T mit 3% (w/v) BSA und 0,01% (w/v) NaN ₃
ECL-Western Blot Reagenz	ECL-Lösung 1 (Peroxidsalzlösung) und ECL-Lösung 2 (Luminol und Verstärker) Im Verhältnis 1:1 mischen (Amersham, Freiburg)

2.4.6 sGC-Aktivitäts-Assay

Probenpuffer	50 mM TEA-HCl, pH 7,5 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 2 mg/ml BSA
Inkubationspuffer	125 mM TEA-HCl, pH 7,5 0,25 mM EGTA 2,5 mM DTT 2,5 mg/ml BSA 2,5 mM cGMP 2,5 mM IBMX 7,5 mM MgCl ₂ 12,5 mM Creatinphosphat 31,25 U/ml Creatinphosphokinase
Substratlösung	1 mM GTP mit ca. 100.000 cpm [α - ³² P]-GTP je Ansatz

2.4.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur

<i>E. Coli</i>	LB-Broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) Ampicillin (Sigma, Deisenhofen) Chloramphenicol (Invitrogen, Karlsruhe) Kanamycin (Invitrogen, Karlsruhe)
----------------	---

cGMP-Reporterzelllinie	MEM Alpha-Medium (Cat.-No.: 22571-020: Invitrogen, Karlsruhe) FCS (Cat.-No.:10500-064: Invitrogen, Karlsruhe) Penstrep 10000 U/ml (Cat.-No.: 15140-122: Invitrogen, Karlsruhe) Glutamin 200 mM (Cat.-No.: 25030-024: Invitrogen, Karlsruhe) Zeocin 100 mg/ml (Cat.-No.: 801935: Invitrogen, Karlsruhe)
GColf8.9.7	DMEM/Nut-mix-F12-Ham-Medium (Cat.-No: 31330-038: Invitrogen, Karlsruhe) FCS (Cat.-No.:10500-064: Invitrogen, Karlsruhe) Geneticin 1 mg/ml (Cat.-No.: 10131-027: Invitrogen, Karlsruhe) Penstrep 10000 U/ml (Cat.-No.: 15140-122: Invitrogen, Karlsruhe) Natrium-Pyruvat 1 mM (Cat.-No.: 11360-039: Invitrogen, Karlsruhe) Natrium-Bicarbonat 0,075% (Cat.-No: 25080-060: Invitrogen, Karlsruhe) Amphotericin 2,5 µg/ml (Cat.-No: 15290-026: Invitrogen, Karlsruhe) Zeocin 100 mg/ml (Cat.-No.: 801935: Invitrogen, Karlsruhe)
HUVEC	Medium 200 (Cat.-No.: M-200-500: Cascade Biologics, Mansfield, Grossbritannien) Low Serum Growth Supplement (Cat.-No.: S-030-10: Cascade Biologics, Mansfield, Grossbritannien)
HASMC	Medium 231 (Cat.-No.: M-231-500: Cascade Biologics, Mansfield, Grossbritannien) Smooth Muscle Cell Growth Supplement (Cat.-No.: S-007-25: Cascade Biologics, Mansfield, Grossbritannien) Smooth Muscle Differentiation Supplement (Cat.-No.: S-008-5: Cascade Biologics, Mansfield, Grossbritannien)
Zelldissoziationspuffer	Cell-Dissociation Buffer (Cat.-No.: 13150-016, Invitrogen, Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

2.4.8 Isolierte Organe

Krebs-Henseleit-Puffer 118 mM NaCl
 4,8 mM KCl
 1,0 mM CaCl₂
 1,4 mM MgSO₄
 25 mM KH₂PO₄
 19 mM D-Glucose
 pH 7,4

Modifizierter Krebs- 118 mM NaCl
 Henseleit-Puffer für 4,7 mM KCl
 Gefäße von ApoE^{-/-} - 2,5 mM CaCl₂
 Mäusen 1,2 mM MgSO₄
 1,2 mM KH₂PO₄
 25 mM NaHCO₃
 5,5 mM D-Glucose
 25 µM EDTA-Calcium-Salz
 pH 7,4

Zusatz für Ratten Aorta 2% FCS (Cat.-No.: 10500-064: Invitrogen, Karlsruhe)
 und Humangefäße Penstrep 10000 U/ml (Cat.-No.: 15140-122: Invitrogen, Karlsruhe)

2.5 Plasmide

Verwendung	Bezeichnung	Referenz	Selektions- marker
Vektor zur Expression der α_1 -sGC Untereinheit	pcDNA1/Amp- α_1 sGC	Invitrogen, Carlsbad, USA	ampR
Vektor zur Expression der β_1 -sGC Untereinheit	pRC/CMV- β_1 sGC	Invitrogen, Carlsbad, USA	ampR
Vektor zur Expression des Fusionsproteins von α_1 -sGC und GFP	EGFP-N2- α_1 sGC	BD Biosciences, Heidelberg	KanR
Vektor zur Expression des Fusionsproteins von β_1 -sGC und DsRed	β_1 sGC-DsRedC1	BD Biosciences, Heidelberg	KanR

Verwendung	Bezeichnung	Referenz	Selektionsmarker
Vektor zur Expression des Fusionsproteins von α_1 -sGC und des N-terminalen Endes von YFP	YN(1-154)- α_1 sGC	PD Tom Kerpolla, Ann Arbor, USA	ampR
Vektor zur Expression des Fusionsproteins von β_1 -sGC und des N-terminalen Endes von YFP	YN(1-154)- β_1 sGC	PD Tom Kerpolla, Ann Arbor, USA	ampR
Vektor zur Expression des Fusionsproteins von α_1 -sGC und des C-terminalen Endes von YFP	α_1 sGC - YC(155-238)	PD Tom Kerpolla, Ann Arbor, USA	ampR
Vektor zur Expression des Fusionsproteins von β_1 -sGC und des C-terminalen Endes von YFP	β_1 sGC- YC(155-238)	PD Tom Kerpolla, Ann Arbor, USA	ampR

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Mutagenese

Die Mutationen der sGC α - und β -Untereinheit wurden mit dem QuickChange™ XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Als Template wurden jeweils 20 ng des zu mutierenden Plasmids eingesetzt und eine Elongationszeit von 1 min je kb Plasmid gewählt. Die für die Mutationen verwendeten Primer sind im Anhang sowie in Tabelle 3.1 aufgeführt.

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

1%ige Agarosegele wurden zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Zur Gelherstellung wurde 1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, abgekühlt und mit 5 μ l Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 5 x Gelladepuffer versetzt, aufgetragen und bei einer Spannung von 150 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde eine 500 bp-Leiter (500 bp Ladder, Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht auf einem Gelscanner (GelDoc 2000, BioRad, München) mit der Software Quantity One (Version 4.23, BioRad).

2.6.3 Transformation von *E.Coli* und Plasmidgewinnung

Retransformation eines Plasmids

45 µl superkompetente *E.Coli* Zellen (XL-1 Blue Gold, Stratagene, La Jolla, USA) wurden mit 1 µl Mercaptoethanol 10 min auf Eis inkubiert, danach wurde 0,5 µl des Plasmids hinzugegeben und nach folgendem Protokoll verfahren:

Retransformation	30 min Inkubation auf Eis
	45 s Hitzeschock bei 42 °C
	2 min Inkubation auf Eis
	Zugabe von 500 µl SOC-Medium (42°C)
	Inkubation für 1 h bei 37°C
	Ausstreichen von 350 µl auf LB-Agarplatten mit Selektionsmarker
	Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C

Anschließend wurde eine 200 ml Maxi-Kultur (LB-Medium mit jeweiligem Selektionsmarker) angeimpft und für ca. 16 h bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und die Plasmide mittels Maxi-Präparation nach Herstellerangaben aufgereinigt (Qiaprep™ Spin Maxi, Qiagen, Hilden).

Transformation eines Ligations- bzw. eines Mutageneseansatzes

Zur Transformation eines Ligations- bzw. Mutageneseansatzes wurden 45 µl superkompetente *E.Coli* Zellen (XL-1 Blue Gold, Stratagene, La Jolla, USA) mit 1 µl Mercaptoethanol 10 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 1 µl des jeweiligen Ansatzes gemischt und nach folgendem Protokoll transformiert:

Transformation	30 min Inkubation auf Eis
	45 s Hitzeschock bei 42 °C
	2 min Inkubation auf Eis
	Zugabe von 500 µl SOC-Medium (42°C)
	Inkubation für 1 h bei 37°C
	Ausstreichen von 350 µl auf LB-Agarplatten mit Selektionsmarker
	Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C

Von jeder Ligation bzw. Mutagenese wurden fünf Klone gepickt und eine 2 ml Kultur (LB-Medium mit jeweiligem Selektionsmarker) angeimpft und mindestens 16 h inkubiert (37°C,

200 rpm). Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Plasmide mittels Mini-Präparation aufgereinigt (Qiaprep SpinTM Mini, Qiagen, Hilden). Die Überprüfung der Ligation bzw. der Mutation erfolgte durch Sequenzierung (Invitek, Berlin).

2.6.4 Restriktionsverdau

Um ein Plasmid für eine Ligation bzw. zur Überprüfung einer Ligation oder des korrekten Einfügens einer Schnittstelle zu linearisieren, wurde ein Restriktionsverdau mit den jeweiligen gewünschten Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Für einen Doppelverdau wurde folgender Ansatz verwendet:

Restriktionsansatz	2 µl 10 x Restriktionspuffer (enzymspezifisch)
	1 µl Enzym A
	1 µl Enzym B
	1 µg DNA
	ad 20 µl H ₂ O (DNAse frei)

Der Ansatz wurde 1 h bei der jeweiligen optimalen Schnitttemperatur der Restriktionsendonuklease inkubiert, mit 4 µl 5 x Gel-Ladepuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die linearisierten DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem Gel-Extraktions-Kit QiaQuickTM (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers.

2.6.5 Klonierung der cDNA

sGC-Fusionsproteine

Zur Untersuchung der Lokalisation der sGC-Untereinheiten innerhalb der Zelle wurde die cDNA für die α_1 -Untereinheit aus dem Vektor α_1 -pcDNA/Amp^r (Invitrogen, Karlsruhe) in den Fluoreszenzvektor EGFP-N2 (BD Biosciences, Heidelberg) und die β_1 -Untereinheit aus β_1 -cRC/CMV (Invitrogen, Karlsruhe) in den Fluoreszenzvektor DsRed-C1 (BD Biosciences, Heidelberg) kloniert. Dazu wurde die cDNA mittels HindIII und XbaI aus dem Ursprungsvektor geschnitten und die Zielvektoren mit HindIII und XbaI linearisiert. Die Fragmente wurden jeweils in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt und aus der Gelmatrix mittels QiaQuickTM Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die Ligation erfolgte wie folgt:

Ligationsansatz	2,5 µl 10 x T4-Ligase-Puffer
	1 µl T4-DNA-Ligase
	100 ng HindIII/XbaI linearisierter Vektor
	x ng DNA (Vektor:Insert - 1:5)
	ad 25 µl H ₂ O (DNase frei)

Der Ansatz wurde 16 h bei 4°C inkubiert und anschließend wurde 1 µl des Ansatzes in superkompetente *E.Coli* Zellen (XL1-Gold™) transformiert (siehe 2.6.3) und auf LB-Agarplatten (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurden drei Kolonien gepickt und mit diesen 2 ml Übernachtskulturen (LB-Medium, 50 µg/ml Kanamycin) angeimpft. Anschließend wurden die Plasmide mittels Mini-Präparation isoliert (Qiaprep™ Spin Mini, Qiagen, Hilden). Die Ligation wurde mittels Sequenzierung überprüft (Invitak, Berlin).

sGC-Fusionsproteine mit BiFC-Vektoren

Zur Untersuchung der Dimerisierung der sGC-Untereinheiten wurde die cDNA der α_1 -Untereinheit aus pcDNA/Ampl (Invitrogen, Karlsruhe) und der β_1 -Untereinheit aus pcRC/CMV (Invitrogen, Karlsruhe) in pBiFC-YC sowie pBiFC-YN (Tom Kerpolla, Ann Arbor, Michigan, USA) umklontiert. Bei pBiFC-YN handelt es sich um einen Vektor, der den N-terminalen Teil (1-154) des „enhanced Yellow Fluorescent Protein“ (eYFP) enthält, wohingegen pBiFC-YC den C-terminalen Teil des eYFP (155-239) codiert. Den Sequenzen für YN und YC sind die Linkersequenzen „RPACKIPNDLQKVMNH“ bzw. „RSIAT“ vorangestellt. Eine gelbe Fluoreszenz, analog zum intakten eYFP, tritt nur auf, wenn YC und YN in räumliche Nähe kommen (Abb. 2.1) (Hu et al., 2002).

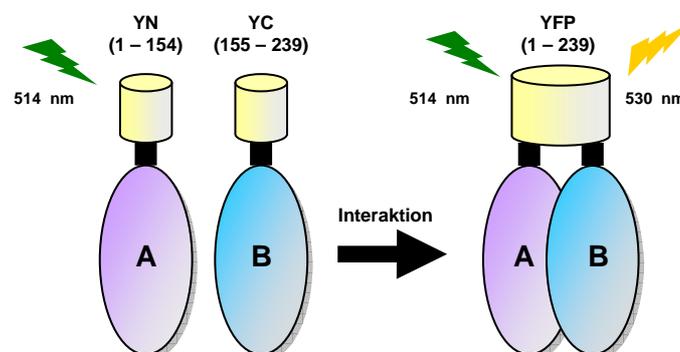


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des BiFC-Prinzips. Protein A und B sind an das N- bzw. C-terminale Fragment von YFP fusioniert. Ohne Interaktion zwischen A und B erfolgt keine Fluoreszenz durch die YFP-Fragmente. Durch Interaktion von Protein A und B kommen die YFP-Fragmente in räumliche Nähe und bilden ein funktionelles Fluorophor aus, welches nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge (514 nm) eine Fluoreszenz emittiert (530 nm).

cDNA	Donor (cDNA) Plasmid	Zielvektor	Restriktions- endonukleasen	Konstrukt Name
α_1 -sGC	pcDNA1/Amp (Invitrogen)	YC 1-154 in HA/CMV (Kerpolla)	BsiWI/Clal	α_1 -YCV (N-terminal) α_1 -YCH (C-terminal)
β_1 -sGC	pRC/CMV (Invitrogen)	YC 1-154 in HA/CMV (Kerpolla)	BsiWI/Clal	β_1 -YCV (N-terminal) β_1 -YCH (C-terminal)
α_1 -sGC	pcDNA1/Amp (Invitrogen)	YN 155-238 in pFlag/CMV (Kerpolla)	BsiWI/Clal	α_1 -YNV (N-terminal) α_1 -YNH (C-terminal)
β_1 -sGC	pRC/CMV (Invitrogen)	YN 155-238 in pFlag/CMV (Kerpolla)	BsiWI/Clal	β_1 -YNV (N-terminal) β_1 -YNH (C-terminal)

2.6.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (Biophotometer, Eppendorf) in Einwegküvetten (UVette™, Eppendorf) bestimmt. Durch Verdünnung wurde die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Die OD₂₆₀ sollte in einem Bereich von 0,1 bis 0,8 liegen.

2.6.7 Transiente Cotransfektion der sGC-Untereinheiten in die cGMP-Reporterzelllinie

Um das Aktivitätsmuster der Fusionsproteine von sGC und Fluoreszenzproteinen sowie die Auswirkung von Mutationen der sGC auf die Aktivierbarkeit des Enzyms durch NO, den sGC-Stimulator BAY 41-2272 und den sGC-Aktivator BAY 58-2667 zu untersuchen, wurden die jeweiligen Vektoren für die α_1 - und β_1 -Untereinheit der sGC in eine cGMP-Reporterzelllinie transient cotransfiziert.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 10.000 Zellen/Well in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen nach folgendem optimierten Protokoll mit den Transfektionsreagenzien Lipofectamin™ und Plus™ (Invitrogen, Karlsruhe) transient transfiziert:

DNA-Lösung	1 Well	96er Platte
sGC α_1 -Vektor	36 ng	3,5 µg
sGC β_1 -Vektor	36 ng	3,5 µg
Optimem-Medium	5 µl	480 µl
Plus™-Reagenz	0,25 µl	24 µl
Komplexierung der DNA mit dem Plus™-Reagenz 15 min bei Raumtemperatur (RT)		

Lipofectamin™-Lösung	1 Well	96er Platte
Lipofectamin™	0,6 µl	57 µl
Optimem-Medium	5 µl	480 µl
Lipofectamin™-Lösung zur DNA/Plus™-Lösung geben		
Komplexierung der DNA mit Lipofectamin™ 30 min bei RT		

Verdünnung mit Optimem-Medium

	1 Well	96er Platte
Optimem-Medium	90 µl	8,6 ml
Medium aus den 96-Well-Platten entfernen		
100 µl der Transfektionslösung je Well pipettieren		
3 h bei 37°C inkubieren		
Transfektionsmedium entfernen		
100 µl 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 2.6.9).

2.6.8 Transiente Transfektion von cGMP-Reporterzellen, HUVEC und HASMC für die Konfokalmikroskopie

Um die subzelluläre Lokalisation der sGC und die Dimerisierung der Untereinheiten der sGC zu untersuchen, wurden die Vektoren der Fusionsproteine von α_1 - und β_1 -Untereinheit der sGC mit den Fluoreszenzproteinen EGFP, DsRed und eYFP-Teilstücken transient in die cGMP-Reporterzelllinie cotransfiziert. Für die Lokalisationsstudien wurden zusätzlich HUVEC und HASMC transient mit GFP- α_1/β_1 -sGC transfiziert.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen/Kammer in 8-Kammer-Zellkulturobjektträgern ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen nach folgendem optimierten Protokoll mit den Transfektionsreagenzien Lipofectamin™ und Plus™ (Invitrogen, Karlsruhe) transient transfiziert:

DNA-Lösung	1 Kammer	8-Kammer Objektträger
sGC α_1 -Vektor	250 ng	2,0 μ g
sGC β_1 -Vektor	250 ng	2,0 μ g
Optimem-Medium	50 μ l	400 μ l
Plus TM -Reagenz	0,84 μ l	6,72 μ l

Komplexierung der DNA mit dem PlusTM-Reagenz 15 min bei RT

LipofectaminTM-Lösung	1 Kammer	8-Kammer Objektträger
Lipofectamin TM	4,2 μ l	33,6 μ l
Optimem-Medium	50 μ l	400 μ l

LipofectaminTM-Lösung zur DNA/PlusTM-Lösung geben
 Komplexierung der DNA mit LipofectaminTM 30 min bei RT

Verdünnung mit Optimem-Medium

	1 Kammer	8-Kammer Objektträger
Optimem-Medium	100 μ l	0,8 ml

Medium aus den 8-Kammer Objektträgern entfernen
 200 μ l der Transfektionslösung je Kammer pipettieren
 3 h bei 37°C inkubieren
 Transfektionsmedium entfernen
 200 μ l Kulturmedium ohne Selektionsmarker je Kammer 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 für die Messung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop vorbereitet (siehe 2.8).

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

Ein intrazelluläres cGMP-Messsystem wurde durch die stabile Transfektion einer chinesischen Hamster Ovarien (CHO)-Zelle mit Aequorin und einem Ca²⁺-leitenden cyclischen-Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal (CNG2A) generiert (Wunder et al., 2005). Das Messsystem beruht darauf, dass Aequorin, ein Protein der pazifischen Leuchtqualle *Aequorea forskalea* (Hastings et al., 1969; Shimomura und Johnson, 1970), in Gegenwart der Cofaktoren Coelenterazin und Ca²⁺ eine Biolumineszenz aussendet. Diese Biolumineszenz ist direkt proportional zum cGMP-Gehalt, da cGMP die Öffnung der CNG2A-Kanäle und damit den Ca²⁺ Einstrom reguliert. In diese Reporterzelllinie wurden die

codierenden Plasmide für die nativen bzw. die mutierten α_1 - und β_1 -sGC Untereinheiten transient cotransfiziert. Die Zellen wurden für 3 h vor der Transfektion mit Coelenterazin (Cafty, 200 mM IBMX, 0,83 μ g/ml Coelenterazin) bei 37°C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurde die transient exprimierte sGC durch Zugabe der jeweiligen Substanz für 10 min bei RT stimuliert. Durch Zugabe von 10 mM CaCl_2 -Lösung je Well in einer lichtdichten CCD-Kamera wurde die Biolumineszenz initiiert. Die erfolgte Biolumineszenz wurde über einen Zeitraum von 60 s aufgenommen. Dieses Testsystem ermöglicht es, die Aktivierbarkeit der sGC durch Substanzen und den Einfluss von Mutationen im intrazellulären System zu untersuchen.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte durch ein Farbreagens (Protein Assay, BioRad), basierend auf einer Methode von Bradford (1976). 10 μ l Probe wurden mit 200 μ l Farbstofflösung in einer 96-Well-Platte gemischt und 10 min bei RT zur stabilen Ausbildung eines 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 Herstellung eines subzellulären Extraktes

Die zu testenden Zellen wurden aus konfluenten Zellkulturflaschen (175 cm² Bodenfläche) mit Zelldissoziationspuffer abgelöst, abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4°C) und das Zellpellet in 500 μ l Zellysepuffer resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Ultraschallbehandlung (60 s) zerstört. Anschließend wurden lösliche zelluläre Bestandteile von den Membranbestandteilen durch Ultrazentrifugation (50.000 g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Die im Überstand befindlichen löslichen Proteine wurden mittels Gelelektrophorese, wie unter 2.7.3 beschrieben, aufgetrennt und detektiert.

2.7.3 Gelelektrophorese von Proteinen

Für die Untersuchung von Proteinen wurden diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamid (SDS-PAGE) Minigele nach Laemmli (1970) für das Gelsystem Mini-Protean II (BioRad, München) verwendet. SDS bewirkt die Entfaltung der Proteine und maskiert deren Eigenladung, daher werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Glycin wird in diesem System als Trägerion eingesetzt. Es wurden 10%ige Trenngele (ProGel, Anamed, Darmstadt) verwendet.

Das Gel wurde in der vertikalen Proteingelkammer (BioRad, München) fixiert und mit Laufpuffer geflutet. Die Proteinproben wurden mit Laemmli-Probenpuffer (siehe 2.4.3)

versetzt und anschließend 5 min bei 95°C denaturiert. Proteine und Zellbestandteile, die nicht in Lösung gingen, wurden unmittelbar vor dem Auftragen abzentrifugiert (Tischzentrifuge: 10.000 rpm, 3 min). Die Auftragemenge der Proteine betrug 10 µg und der Gellauf erfolgte bei 200 V im Kühlraum über einen Zeitraum von 90 min.

2.7.4 Western Blot

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach einer von Towbin (1979) entwickelten Methode auf eine Nitrocellulose-Membran passender Größe transferiert. Hierfür wurden das zu blottende Gel, die Nitrocellulose-Membran und die „Fiberpads“ in Transferpuffer (siehe 2.4.4) äquilibriert. Anschließend wurde ein Sandwich aus Gel, Membran und „Fiberpads“ luftblasenfrei in eine Blotkassette gelegt. Diese Kassette wurde in eine mit eiskaltem Transferpuffer befüllte Blotkammer überführt (Mini Blot Transfer Cell™) und der Transfer bei 100 V für 1 h im Kühlraum durchgeführt. Hiernach wurden die Proteine detektiert (siehe 2.7.5).

2.7.5 Anfärbung von Proteinen auf Membranen

Die von Harlow und Lane 1988 entwickelte Methode des „Immuno-Sandwich-Assays“ basiert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Die zur Detektion der gewünschten Proteinbanden eingesetzten Antikörper binden an einem Epitop des zu detektierenden Enzyms. Hierzu wurde die Nitrocellulose-Membran nach erfolgtem Proteintransfer 60 min bei 4°C in TBS-T/3% (w/v) BSA, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, inkubiert. Die verwendeten spezifischen Antikörper wurden für die α_1 -Untereinheit 1:3000 (Cayman, Ann Arbor, USA), für die β_1 -Untereinheit 1:2000 (Cayman, Ann Arbor, USA) und für Aktin 1:5000 (Sigma, Deisenhofen) in TBS-T/3% (w/v) BSA/0,01% Natriumazid verdünnt. Die Membran wurde nach dreimal fünfminütigem Waschen in TBS-T über Nacht bei 4°C im Rundumschüttler mit der jeweiligen Antikörperlösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal in TBS-T gewaschen (5 min), um überschüssigen Erstantikörper zu entfernen. Der biotinylierte Zweitantikörper, Anti-Kaninchen-IgG-Biotin für polyklonale in Kaninchen generierte Erstantikörper (Vectastain ABC Kit, Vectorlabs, Wiesbaden), wurde gemäß Herstellerangaben in TBS-T verdünnt und die Membran 30 min darin inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (5 min) in TBS-T wurde die Membran 30 min, gemäß Herstellerangaben, in einer Lösung aus Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (Vectastain ABC Kit, Vectorlabs, Wiesbaden) inkubiert. Anschließend wurde diese dreimal 30 min in PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Lumineszenz, die durch Zugabe von ECL-Reagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) erzeugt wurde und durch Exposition auf einen ECL-Hyperfilm (Amersham Biosciences, Freiburg) in der Dunkelkammer detektiert

wurde. Die Filme wurden am Densitometer eingescannt und mit Hilfe der Software Quantity One (BioRad, München) ausgewertet.

2.7.6 Immunhistochemie

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der sGC mittels Immunhistochemie wurden GColf8.9.7-Zellen in einer Dichte von 20.000 Zellen/Zellkammer (NuncNalgene, Naperville, USA) ausgesät. Die GColf8.9.7.-Zelllinie ist eine mit α_1/β_1 -sGC stabil transfizierte cGMP-Reporterzelle. 48 h nach der Aussaat wurden die Zellen 10 min bei RT mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272, dem NO-Donor DEA/NO, dem sGC-Inhibitor ODQ oder PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und danach 1 h bei RT mit 3%iger BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht mit einem Primärantikörpergemisch gegen die α_1 -sGC (1:3000, Cayman, Ann Arbor, USA) und β_1 -sGC (1:2000, Cayman, Ann Arbor, USA) Untereinheit bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt, die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 1 h mit dem EGFP-markierten Sekundärantikörper Alexa 488 (1:1000, Invitrogen, Karlsruhe) bei RT inkubiert. Da Fluoreszenzfarbstoffe generell lichtempfindlich sind, wurden die Zellen ab diesem Schritt durch Alufolie vor Lichteinstrahlung geschützt. Nach der Entfernung des Sekundärantikörpers wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Membran durch zehnmütige Inkubation bei RT mit Alexa 594-WGA (1:400, Invitrogen, Karlsruhe), einem rot fluoreszierenden Farbstoff, der sich in die Membran einlagert, angefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop, wie unter 2.8. beschrieben, mikroskopiert.

2.7.7 sGC-Aktivitäts-Assay

Aktivitätsmessung am hämhaltigen Enzym

Nach einer von Hönicka (1999) entwickelten Methode wurde über die Bildung von $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ zu $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$ die Aktivität der isolierten sGC bzw. von sGC-haltigen Zellhomogenaten gemessen. Die sGC-Präparation wurde gegebenenfalls, je nach spezifischer Aktivität, vor dem Assay in Probenpuffer verdünnt.

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

Bis auf die Substratlösung wurden alle Bestandteile auf Eis zusammenpipettiert und hiernach im 37° warmen Wasserbad inkubiert. Nach dreiminütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl GTP-Substratlösung gestartet und nach weiterer zehnminütiger Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 400 µl Zinkacetat (100 mM) und 500 µl Natriumcarbonat (120 mM) abgestoppt. Anschließend wurde der von Zinkcarbonat mit nicht umgesetzten GTP gebildete weiße Niederschlag abzentrifugiert (5 min, 2800 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 mittels 10 ml Tris-HCl (100 mM, pH 7,5) mit einer Ausbeute von 60 % eluiert und in 20 ml Szintillationsgefäßen aufgefangen. Im Anschluss wurde die Aktivität der Proben in einem Flüssigkeits-Szintillations-Counter gemessen und die spezifische Aktivität der Proben nach folgender Gleichung bestimmt:

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

W = Wiederfindungsrate (0,6)

P = Enzymmenge (µg)

t = Zeitdauer des Assays (min)

Aktivitätsmessung am hämfreien Enzym

Um die Aktivität hämfreier sGC-Präparationen zu bestimmen, wurde das Enzym nach einer Methode von Förster hämfrei gemacht (Förster et al., 1996). Die sGC-Präparation wurde in Probenpuffer (siehe 2.4.6) mit 0,5% Tween-20 versetzt, was zu einem Verlust der prosthetischen Hämgruppe führt. Der Test wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, die 1955 von Marvin Minsky entwickelt wurde, wird unter anderem für die Detektion fluoreszierender Proteine auf zellulärer Ebene verwendet (Minsky, 1988). Das Prinzip der Mikroskopiermethode basiert auf einem Laser, dessen monochromatisches Licht mit der Wellenlänge, die dem Absorptionsmaximum des fluoreszierenden Proteins entspricht, über einen dichroischen Spiegel auf die Probe gelenkt wird. Das von dem fluoreszierenden Protein emittierte Licht wird durch den dichroischen Spiegel hindurchgelassen und über einen Detektor zu digitalen Bildinformationen verarbeitet. Eine konfokal, das heißt in konjugierter Ebene zur Probe, angebrachte Lochblende fokussiert das Licht der Probe, während das Streulicht aus anderen Schichten

herausgefiltert wird. Hierdurch ist die Fokussierung auf eine einzige Schnittebene der Probe möglich. Durch die computergesteuerte Rasterung mit dem Laser wird eine Vielzahl von Schnittbildern erzeugt, welche anschließend zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden können.

Für die Messung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden Zellen in 8-Kammer Objektträgern (NuncNalgene, Naperville, USA) kultiviert und transient mit dem jeweiligen fluoreszierenden Fusionsprotein der sGC transfiziert (siehe 2.6.7). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 250 µl PBS/Kammer gewaschen, um FCS-Reste, welche die Fluoreszenzmessung stören, zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen je nach Fragestellung mit 250 µl sGC-aktivierender Substanz 10 min bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls wurde die Zellmembran mit Alexa 594-WGA (1:400, Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen erneut zweimal mit 250 µl PBS gewaschen und mit 250 µl 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, um den Zellzustand zu erhalten. Die nachfolgende Messung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop erfolgte bei folgenden Aufnahmeparametern:

Vergrößerung	63-fach bzw. für HUVEC 24-fach
Anregung	GFP/DsRed: 488 nm Ar-Laser und 543 nm He/Ne-Laser YFP: 514 nm Ar- Laser
Photomultiplier 1	GFP: 518 - 524 (Fluoreszenz, grün)
Photomultiplier 2	DsRed: 680 - 690 (Fluoreszenz, rot)
Photomultiplier 3	YFP: 505 – 600 (Fluoreszenz, gelb)
Geschwindigkeit der Abtastung:	983,04 ms

Vor Beginn der Aufnahmen wurden Kontrast und Rauschunterdrückung bei der jeweiligen Geräteeinstellung für alle verwendeten Kanäle optimiert. Von den exprimierenden Zellen wurden bei 63-facher bzw. 24-facher Vergrößerung Aufnahmeserien durch die verschiedenen Schnittebenen aufgenommen. Je nach Lage und Dicke der exprimierenden Zelle wurde die gesamte Zelle mit 10-20 Aufnahmen in der z-Achse dokumentiert. Durch die 6-12 fache Abtastung einer Schnittebene wurde der Hintergrund weitgehend reduziert. Von jedem Transfektionsansatz wurden 3 Zellen/Zellkammer ausgewählt und mit Hilfe der integrierten CCD-Kamera dokumentiert. Über die Bildbearbeitungssoftware LSM 510 der Anlage wurden die Bilder zu jeweils einer Aufnahme zusammengeführt.

2.9 Zellkultur

2.9.1 Prokaryotische Zellen

Die *E.Coli* Stämme „XL-1 Blue supercompetent cell“ (dam^+) (Stratagene, La Jolla, USA) und „SCS-110“ (dam^-) (Stratagene, La Jolla, USA) wurden zur Transformation und Retransformation von Plasmiden verwendet. Der dam^- *E.Coli* Stamm „SCS-110“ wurde lediglich zur Transformation von Plasmiden, die mit XbaI oder ClaI verdaut werden sollten, eingesetzt, da in dam^+ Zellen die Erkennungssequenzen dieser Restriktionsendonukleasen methyliert vorliegen und daher nicht durch die Restriktionsendonukleasen erkannt werden. Für alle anderen Transformationen von Mutagenesen und Klonierungen sowie für Retransformationen wurde der dam^+ „XL-1 Blue supercompetent cell“ *E.Coli* Stamm verwendet. Die Kultivierung beider Stämme erfolgte in LB-Medium bzw. LB-Agarplatten bei 37°C.

2.9.2 Eukaryotische Zellen

Die cGMP-Reporterzelllinie wurde zur Untersuchung des Aktivitätsprofils von sGC-Mutanten und für die Untersuchungen zur Translokation und Dimerisierung der sGC verwendet. Für die Untersuchungen zur Translokation wurden zusätzlich HUVEC (Cascade Biologics, Mansfield, UK) und HASMC (Cascade Biologics, Mansfield, UK) eingesetzt. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde die mit sGC stabil transfizierte cGMP-Reporterzelllinie GColf8.9.7-Zelllinie verwendet.

Das Medium für die cGMP-Reporterzelllinie, eine stabil mit dem cGMP-abhängigen CNG2A-Ionenkanal und Aequorin transfizierte CHO-Zelle, setzte sich wie folgt zusammen:

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

Die Zellen wurden alle drei Tage mit Zelldissoziationspuffer aus den Zellkulturflaschen (175 cm² Bodenfläche) abgelöst und 1:10 in Medium verdünnt in neue Zellkulturflaschen passagiert.

Für die mit sGC stabil transfizierte cGMP-Reporterzelllinie, GColf8.9.7., wurde folgende Mediumzusammensetzung verwendet:

500 ml DMEM/Nut-Mix F12
50 ml FCS (10%)
10 ml Geneticin (2%)
5 ml Penstrep (1%)
5 ml Na-pyruvat (1%)
5 ml Na-bicarbonat (1%)
5 ml Amphotericin (1%)
1250 µl Zeocin (0,25 mg/ml)

Die Zellen wurden alle drei Tage mit Zelldissoziationspuffer aus den Zellkulturflaschen (175 cm² Bodenfläche) abgelöst und 1:10 in Medium verdünnt in neue Zellkulturflaschen passagiert.

HUVEC wurden in folgendem Medium kultiviert:

500 ml Medium 200
10 ml Low Serum Growth Supplement

Die Zellen wurden alle drei Tage mit Trypsin/EDTA gewaschen und abgelöst. Nach 10 min waren die Zellen vollständig vom Zellkulturflaschenboden abgelöst, sie wurden 1:5 in Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen (175 cm² Bodenfläche) passagiert.

Die HASMC wurden in folgendem Medium kultiviert:

500 ml Medium 231
25 ml Smooth Muscle Growth Supplement
5 ml Smooth Muscle Cell Differentiation Supplement

Die HASMC wurden nach dem gleichen Protokoll, wie oben für die HUVEC beschrieben, passagiert, mit der Ausnahme, dass die HASMC im Verhältnis 1:3 in Medium verdünnt wurden.

2.10 Isolierte Gefäße

2.10.1 Aorten von spontan hypertensiven Ratten

Die vasorelaxierende Wirkung von Substanzen an Aorten von sechs Wochen alten SHR und normotensiven Ratten (Wistar Kyoto/MOI, Taconic, Hudson, USA) wurde wie folgt untersucht: Die Ratten wurden mit einer Überdosis Phenobarbital getötet, die Bauchaorten herauspräpariert, vom umliegenden Gewebe abgetrennt und in 5 mm große Stücke geteilt. Während der Präparation wurde darauf geachtet, dass das Endothel nicht beschädigt wird. Nach der Isolierung wurden die Aortenringe in FCS-haltigen Krebs-Henseleit-Puffer

überführt und für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ in diesem inkubiert. Die Gefäße wurden unter einer Anfangsspannung von 2 g in die mit Krebs-Henseleit-Puffer (37°C, 5% CO₂) befüllten 5 ml Gefäßbäder der Organapparatur eingehängt und hiernach für 90 min äquiliibriert. Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde alle 15 min während des gesamten Versuchsablaufes erneuert, außer während der Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven. Die Kontraktionen wurden isometrisch über einen Statham-UC2-Verstärker aufgezeichnet, der an ein DAS1802HS-Datenermittlungsboard (Keithley Instruments, Cleveland, USA) angeschlossen war. Nach der Äquilibrationsperiode wurden die Gefäße mit 80 mM KCl-Lösung kontrahiert, um die Funktion der Gefäße zu testen. Jeder Kontraktion folgte eine Serie von 16 Waschzyklen und eine Erholungsperiode von 28 min. Nach dem Auswaschen der KCl-Lösung wurden die Gefäße mehrmals mit Phenylephrinlösung (3x10⁻⁸ g/ml, Neosynephrin-POS[®] Ursapharm, Saarbrücken) kontrahiert, bis ein stabiles Kontraktionsplateau erreicht war. Anschließend wurde die gefäßrelaxierende Eigenschaft der zu untersuchenden Substanzen durch kumulative Zugabe ermittelt.

2.10.2 Arterien von Watanabe Kaninchen

Die Vasorelaxation von Saphena-Arterien von 1,5-jährigen männlichen weißen Neuseeländer Kaninchen (2-3 kg) (NZW; E.S.D. Romans Elevage Scientifique des Dombes, Chatillon sur Chlaronne, France) und männlichen atherosklerotischen Watanabe Kaninchen (WHHL; CRP:WHHL Covance Research Products, Denver, USA) wurde wie folgt untersucht: Die Kaninchen wurden mit einer Überdosis Thiopental (Trapanal[®], Altana, Konstanz) getötet. Die Saphena-Arterien wurden herauspräpariert, von umliegendem Gewebe getrennt und in 3 mm breite Ringe geteilt. Diese Ringe wurden sofort unter einer Vorspannung von 4 g in die mit Krebs-Henseleit-Puffer (37°C, 5% CO₂) befüllten 5 ml Organbäder eingehängt. Die Ermittlung der Daten erfolgte wie unter 2.10.1 für Ratten Aortenringe beschrieben.

2.10.3 Aorten von ApolipoproteinE Knockout Mäusen

Männliche ApoE^{-/-}-Mäuse wurden ab einem Alter von sechs bis acht Wochen mit normalem Futter oder mit einer Hochfettdiät 16 Wochen lang ernährt. Die Hochfettdiät besteht, angelehnt an die in westlichen Industrienationen übliche Nahrungszusammensetzung, aus 21% Fett, 0,15% Cholesterol und 19,5% Casein (Ssniff, Soest). Die Mäuse wurden unter Vollnarkose mit Thiopental (Trapanal[®], Altana, Konstanz) dekaptiert, die Baucharterien isoliert und in 1,5 mm breite Stücke präpariert. Die Aortenringe wurden sofort unter einer Anfangsspannung von 0,5 g in 5 ml Organbäder, die mit 37°C warmer Krebs-Henseleit-Lösung (5% CO₂) befüllt waren, eingehängt. Die Aortenringe wurden mit 100 nM Kaliumchlorid-Lösung dreimal vorkontrahiert. Jeder Kontraktion folgte eine Serie von 16

Waschzyklen und eine Erholungsperiode von 28 min. Hiernach wurden die Aortenringe durch das Thromboxanalogon 9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy-Prostaglandin-F2 α (U46619) (3×10^{-9} g/ml, Cayman, Ann Arbor, USA) maximal kontrahiert. Nachdem die Maximalkontraktur ein Plateau erreicht hatte, wurden die Testverbindungen kumulativ zur Organbadlösung hinzugefügt und deren vasorelaxierende Wirkung ermittelt. Die Daten wurden, wie unter 2.10.1, beschrieben protokolliert.

2.10.4 Humane Arterien

Die relaxierende Wirkung von BAY 58-2667 wurde auch an humanen Gefäßen untersucht. In die Studie wurden Patienten, die sich einer Hüftoperation unterzogen, eingeschlossen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Alter zwischen 50 und 75 Jahren
- keine Risikofaktoren für Atherosklerose und kein Diabetes-Typ-II
oder
- mehr als zwei Risikofaktoren für Atherosklerose und Diabetes-Typ-II seit
mindestens zwei Jahren

Folgende Ausschlusskriterien wurden verwendet:

- Alter unter 50 und über 75
- Diabetes-Typ-I
- Vasodilatations-Therapie während der Operation

Die Krankheitsgeschichte der eingeschlossenen Patienten wurde mit einem Standardbogen dokumentiert, welcher folgende Punkte ermittelte:

- Art der Operation und Art der Anästhesie
- Zusätzliche Erkrankungen/Vorkommnisse
- Standard Laborwerte
- Regelmäßige Medikation

Während einer Hüftoperation wurden Arterien mit einem Durchmesser zwischen 1,5 mm und 2,5 mm vom Mesocolon gelöst und 2 cm lange Stücke wurden vorsichtig von Fett und anhaftendem Gewebe getrennt. Die präparierten Arterien wurden unmittelbar danach in einen Behälter mit eisgekühlter FCS- und Antibiotika-haltiger Krebs-Henseleit-Lösung überführt und sofort ins Untersuchungslabor transportiert. Dort wurde die Relaxation der Gefäße, wie unter 2.10.1 für Ratten Aorta beschrieben, ermittelt.

Die durchgeführte Studie war im Einklang mit der Erklärung von Helsinki und durch die Ethik-Kommission der Universität Witten/Herdecke genehmigt (Nr. 82/2004).

2.11 Konstruktion eines Homologiemodells der Hämbindungsdomäne

Mit Hilfe des Struktur-Vorhersage-Programms Prime[®] (Prime Schrödinger LLC, Portland, USA) wurde ein Homologiemodell der Hämbindungsdomäne (β_1 1-195) der sGC angefertigt. Als Basis für das Modell wurde die Kristallstruktur der Häbdomäne von *Thermoanaerobacter tencongensis* (1 U55.pdb) verwendet, welche 19% Sequenzidentität zur Hämbindungsdomäne der sGC besitzt (Pellicena et al., 2004; Nioche et al., 2004).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Hämbindung und der Hämbindungsstasche der sGC

Der genaue Aufbau der hämbindenden Domäne der sGC ist aufgrund einer fehlenden Kristallstruktur der nativen sGC bislang unbekannt. Durch spektroskopische Untersuchungen wurde der N-terminale Bereich der β_1 -Untereinheit als Hämbindungsregion identifiziert. Innerhalb dieser Region konnten durch Mutagenesestudien His₁₀₅ als zentraler Ligand des Eisens der Hämgruppe sowie Tyr₁₃₅ und Arg₁₃₉ als Ankeraminosäuren der Hämpropionate identifiziert werden.

3.1.1 Charakterisierung von β_1 Ser₁₃₇

Ein Multisequenzalignment der Hämbindungsdomäne der sGC verschiedener Spezies zeigte, dass zwischen den identifizierten Ankeraminosäuren der prosthetischen Hämgruppe, Tyr₁₃₅ und Arg₁₃₉, ein hoch konserviertes Serin lokalisiert ist. Der hohe Konservierungsgrad und die Lage zwischen Tyr₁₃₅ und Arg₁₃₉ ließen eine Beteiligung von β_1 Ser₁₃₇ an der Hämbindung vermuten. Um die Bedeutung von β_1 Ser₁₃₇ auf die Hämbindung zu untersuchen, wurde β_1 Ser₁₃₇ gegen Alanin ausgetauscht und das Aktivitätsprofil der β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC mittels transienter Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie und in sGC-Aktivitätsmessungen charakterisiert (siehe 2.6.7 und 2.7.7).

Mit Wildtyp-sGC (WT-sGC) transient transfizierte cGMP-Reporterzellen wiesen ein für hämhaltige sGC typisches Aktivierungsprofil auf (Abb. 3.1). Inkubation mit dem NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 führte zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation des Enzyms. In Gegenwart von 10 nM DEA/NO, einer Konzentration, die selbst nur einen minimal aktivierenden Effekt ausübt, zeigte sich eine überadditive Stimulierung der WT-sGC (Abb. 3.1 A). Der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte die WT-sGC konzentrationsabhängig mit einem EC₅₀-Wert von 97 nM. Durch Zugabe von ODQ (10 μ M) wurde die durch BAY 58-2667 induzierte Aktivierung der WT-sGC verstärkt (Abb. 3.1 B).

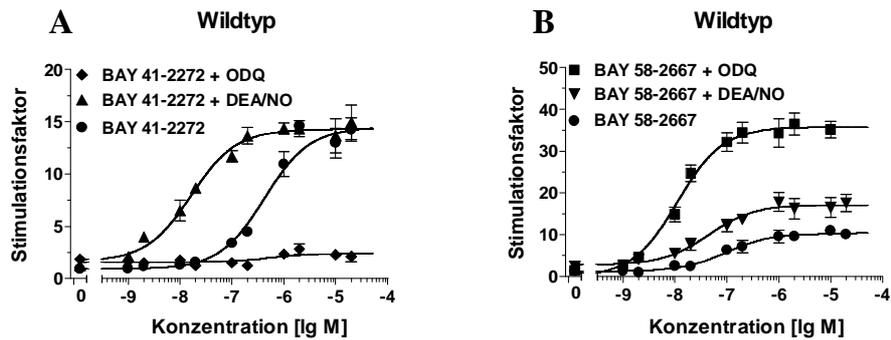


Abbildung 3.1: Konzentrationsabhängige Aktivierung von WT-sGC durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 (A) und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 (B) alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Die in cGMP-Reporterzellen transient exprimierte β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC wurde durch den sGC-Stimulator BAY 41-2272 maximal 7-fach stimuliert. In Gegenwart von DEA/NO (10 nM) wurde eine Verstärkung der durch BAY 41-2272 induzierten Stimulierung auf maximal 13-fach beobachtet (Abb. 3.2 A). Inkubation mit dem sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte die β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC maximal 19-fach. Zugabe von ODQ (10 μ M) führte zu keiner deutlichen Verstärkung der durch BAY 58-2667 induzierten Enzymaktivierung (Abb. 3.2 B).

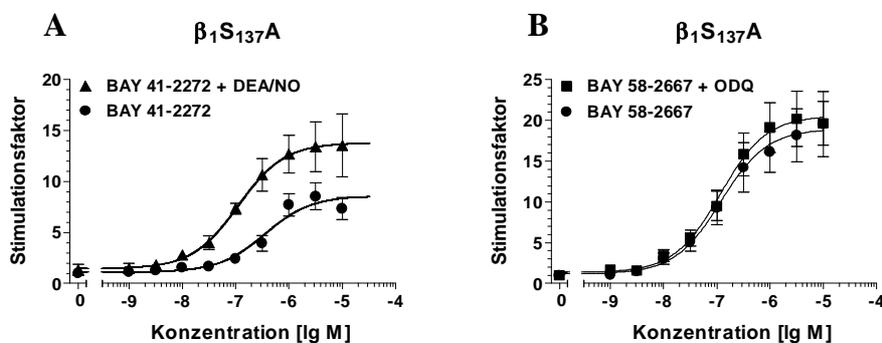


Abbildung 3.2: Konzentrationsabhängige Aktivierung von β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 (A) und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 (B) alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Der NO-Donor DEA/NO stimulierte in cGMP-Reporterzellen transient exprimierte WT-sGC mit einem EC₅₀ von 60 nM maximal 9-fach. Demgegenüber konnte die in cGMP-Reporterzellen transient exprimierte β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC durch DEA/NO nur maximal 5-fach mit einem EC₅₀-Wert von 70 nM stimuliert werden (Abb. 3.3).

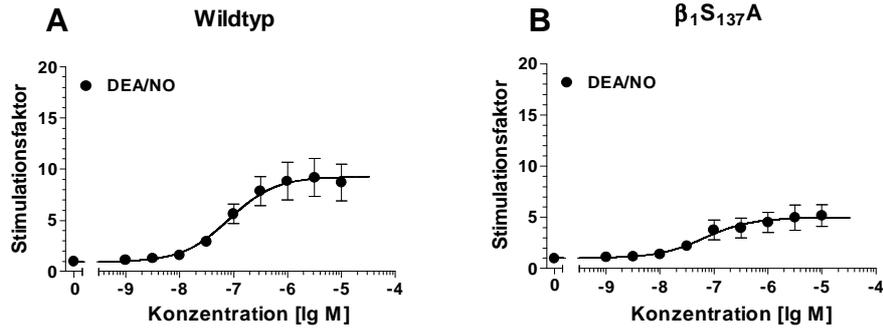


Abbildung 3.3: Konzentrationsabhängige Stimulierung von WT-sGC (A) und $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC (B) durch den NO-Donor DEA/NO in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Für sGC-Aktivitätsmessungen wurden cGMP-Zellen transient mit WT-sGC oder $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC transfiziert, lysiert und der die sGC enthaltene 100.000 x g Überstand ohne weitere Aufreinigung im sGC-Aktivitätstest eingesetzt.

Das WT-sGC Lysat wies ein für hämhaltige sGC typisches Aktivierungsprofil auf. Inkubation mit dem NO-Donor DEA/NO (10 μM) resultierte in einer 119-fachen Stimulation (Abb. 3.4).

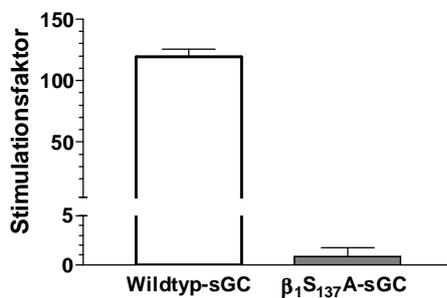


Abbildung 3.4: Aktivierung des WT-sGC und $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC haltigen 100,000 x g Überstands durch den NO-Donor DEA/NO (10 μM).

Der NO-unabhängige, aber Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 stimulierte das WT-sGC-Lysat maximal 30-fach. Zugabe von 100 nM DEA/NO, einer Konzentration, die die sGC 43-fach stimuliert, potenzierte die durch BAY 41-2272 induzierte Enzymaktivierung auf 223-fach (Abb. 3.5 A). BAY 58-2667, der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator, aktivierte die WT-sGC 33-fach, Zugabe von ODQ (10 μM) verstärkte die durch BAY 58-2667 induzierte Aktivierung auf 107-fach (Abb. 3.5 B). Demgegenüber konnte das $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC haltige Lysat weder mit DEA/NO (10 μM) noch mit dem NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (100 nM) stimuliert werden (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte das $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC-Lysat konzentrationsabhängig bis maximal 91-fach. Die durch BAY 58-2667 induzierte Aktivierung wurde jedoch durch Zugabe von 10 μM ODQ nicht verstärkt (Abb. 3.5).

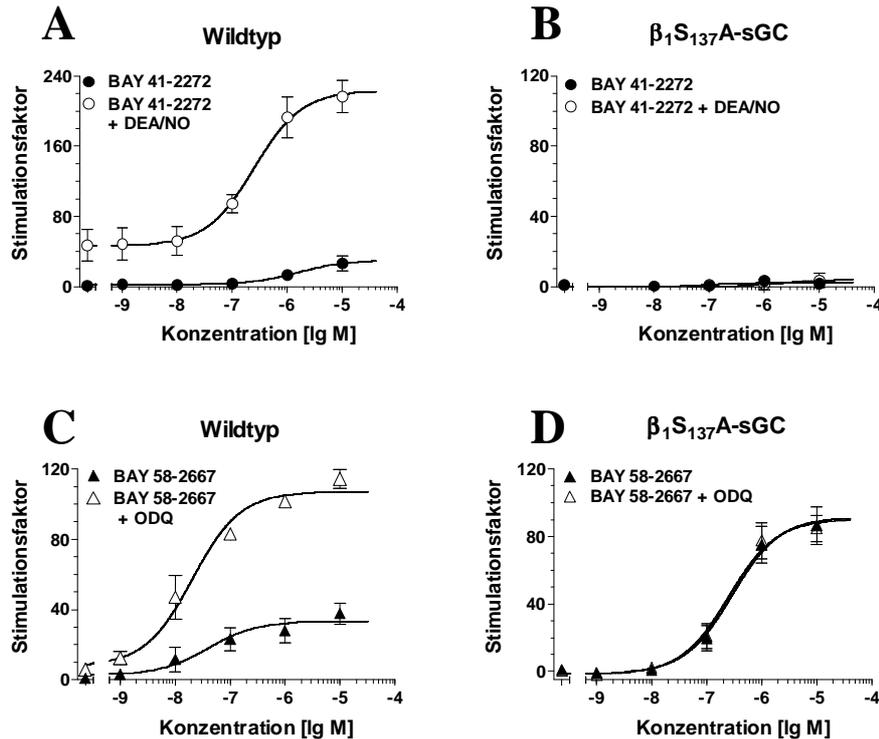


Abbildung 3.5: Konzentrationsabhängige Aktivierung des WT-sGC (A,C) und β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC (B,D) haltigen 100,000 x g Überstands durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 (A,B) und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 (C,D) alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M).

Um den Einfluss von β_1 Ser₁₃₇Ala auf die Hämbindung genauer zu untersuchen, wurde versucht, die β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC-Mutante mit PPIX zu rekonstituieren. PPIX, die eisenfreie Vorstufe des Häms, aktiviert die sGC durch Imitation des Nitrosyl-Häm-Komplexes. WT-sGC und β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC wurden transient in cGMP-Reporterzellen exprimiert und das Zelllysate zur PPIX-Rekonstitution verwendet. Die Rekonstitution wurde in Gegenwart von Tween-20 durchgeführt, um einerseits die native Hämgruppe zu entfernen und andererseits die Rekonstitution mit PPIX zu erleichtern. PPIX aktivierte das WT-sGC-Lysat konzentrationsabhängig maximal 34-fach, während eine Aktivierung des β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC haltigen Lysats nicht erfolgte (Abb. 3.6). Zugabe des sGC-Stimulators BAY 41-2272 (1 μ M), der aufgrund der Häm-abhängigen Wirkung als intrinsische Kontrolle der Rekonstitution verwendet wurde, potenzierte die durch PPIX induzierte Stimulation des WT-sGC-Lysats auf maximal 148-fach (Abb. 3.6 A). In Gegenwart von BAY 41-2272 (1 μ M) induzierte PPIX auch eine konzentrationsabhängige Stimulation des β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC-Lysats allerdings nur bis maximal 25-fach (Abb. 3.6 B).

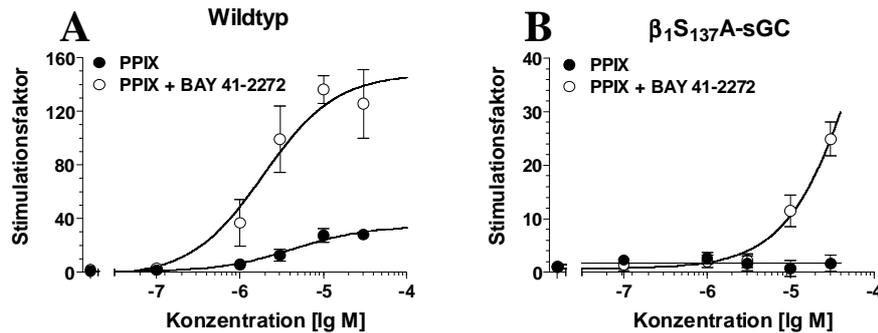


Abbildung 3.6: Konzentrationsabhängige Aktivierung des WT-sGC (A) und β_1 Ser₁₃₇Ala-sGC (B) haltigen 100,000 x g Überstands durch PPIX alleine oder in Gegenwart von BAY 41-2272 (1 μ M).

3.1.2 Konstruktion und Screening von sGC-Mutanten der Hämbindungstasche

Im Jahre 2004 wurde die Kristallstruktur der O₂-bindenden Häm-domäne des Prokaryonten *Thermoanaerobacter tencongensis*, welche 19% Sequenzidentität zur NO-bindenden Häm-domäne der sGC aufweist, veröffentlicht. Basierend auf dieser Kristallstruktur, konnte ein Homologiemodell der Ratten-sGC angefertigt werden (Abb. 3.7).

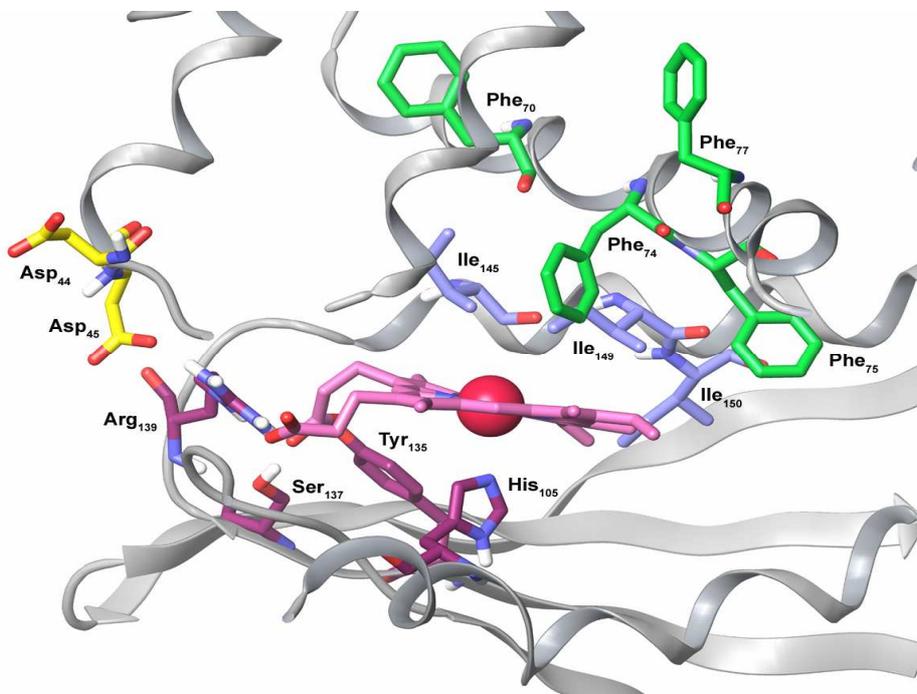


Abbildung 3.7: Homologiemodell der Hämbindungstasche der sGC, basierend auf der Kristallstruktur der Häm-domäne des sGC-homologen prokaryotischen Bakteriums *Thermoanaerobacter tencongensis* (1 U55.pdb). Dargestellt ist die Orientierung von His₁₀₅, der Ankeramino-säuren der Hämpropionate, Tyr₁₃₅ und Arg₁₃₉, und im Rahmen dieser Arbeit charakterisierter Aminosäuren zur Hämgruppe (aus Rothkegel et al., 2006).

Zusätzlich wurde ein BLAST-Search der putativen Hämbindungsdomäne mit anschließendem Multisequenzalignment durchgeführt, um konservierte Aminosäuren innerhalb der Hämbindungsdomäne zu identifizieren. Der BLAST-Search der Hämbindungsdomäne der Ratten-sGC (β_1 1-200) identifizierte verschiedene β_1 -, β_2 - sowie α_1 - und α_2 -Untereinheiten diverser Spezies. Im anschließenden Multisequenzalignment wurden ausschließlich Sequenzen verwendet, deren Fähigkeit zur Hämbindung bekannt war (Abb. 3.8).

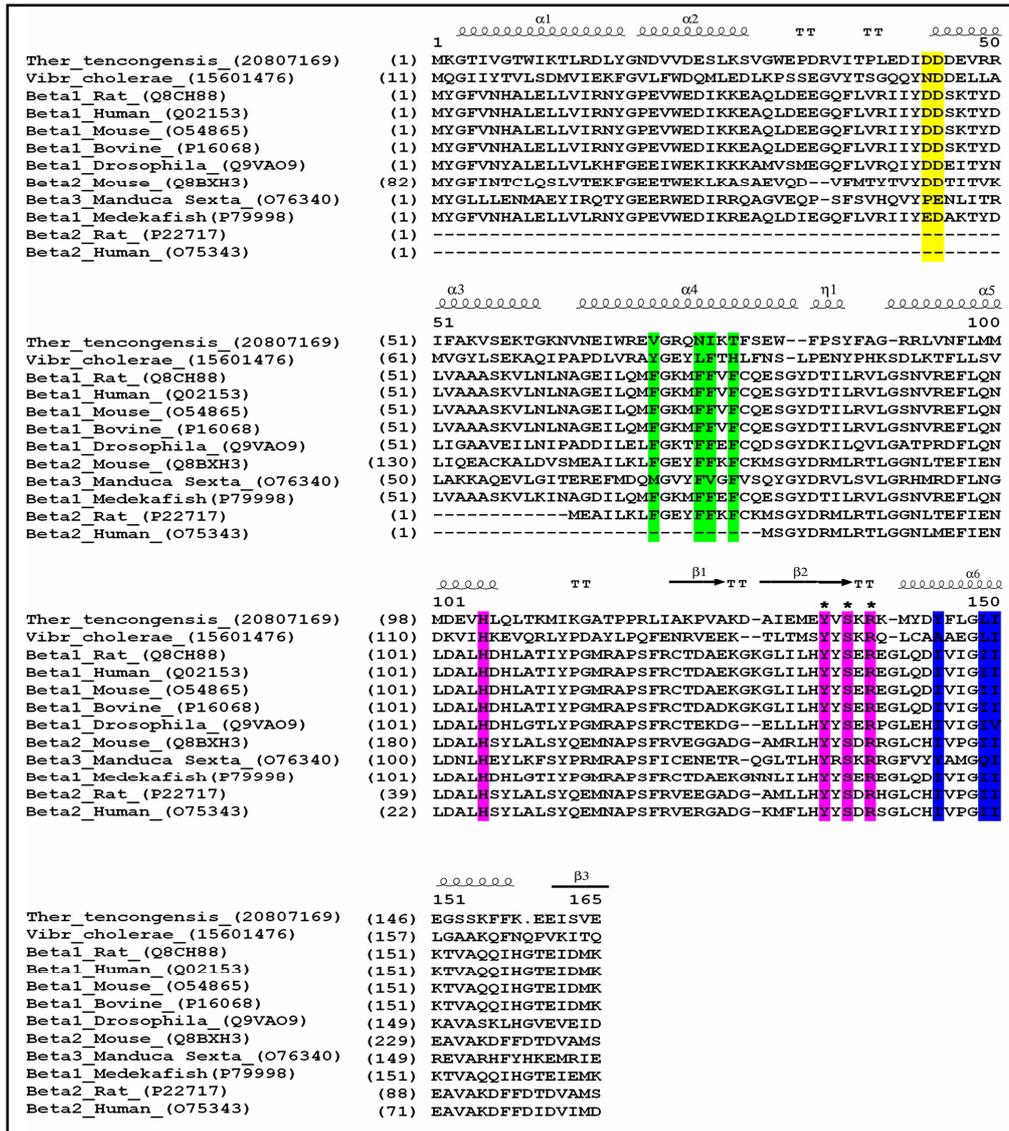


Abbildung 3.8: Multisequenzalignment eukaryotischer und prokaryotischer Hämbindungsproteine, welche eine Homologie zur hämbindenden Domäne der Ratten-sGC aufweisen. Die postulierte Sekundärstruktur ist oberhalb des Alignments angegeben, Pfeile symbolisieren β -Faltblätter, Spiralen stehen für α -Helices und TT für Windungen. Die Nummerierung entspricht der β_1 -Untereinheit der Ratten-sGC. Hydrophobe Aminosäuren, die die Hämbindungstasche auskleiden, sind grün unterlegt, Asp₄₄ und Asp₄₅ sind in Gelb markiert und konservierte Isoleucine blau. Das Hämbindungsmotiv Tyr₁₃₅-X-Ser₁₃₇-X-Arg₁₃₉ ist durch Sterne markiert (aus Rothkegel et al., 2006).

Auf Grundlage des Homologiemodells der sGC in Kombination mit dem durchgeführten Multisequenzalignment wurden Aminosäuren identifiziert, welche wegen ihrer Position in Relation zur Hämgruppe und ihres Konservierungsgrades für die intramolekulare Signaltransduktion der sGC eine Rolle spielen könnten. Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Aminosäuren wurden ausgetauscht und die Mutanten mittels transients Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie charakterisiert (siehe 2.6.7).

$\beta_1 Y_{2A}$	5'-GCGGTACACCATGGCCGGTTTTGTGAACC-3'
$\beta_1 F_{4A}$	5'-CACCATGTACGGTGCTGTGAACCATGCCC-3'
$\beta_1 V_{5A}$	5'-CATGTACGGTTTTGCGAACCATGCCCTG -3'
$\beta_1 V_{5G}$	5'-CATGTACGGTTTTGGGAACCATGCCCTG-3'
$\beta_1 L_{51G}$	5'-CCAAAACCTATGACGGAGTGGCTGCTGCGAGC-3'
$\beta_1 Y_{43A}$	5'-CAGTTTCTTGTGAGAATAATCGCCGGATCATTCCAAAACCTATGAC-3'
* $\beta_1 D_{44A}$	5'-CTTGTGAGAATAATCTACGCCATTCCAAAACCTATGAC-3'
* $\beta_1 D_{45A}$	5'-GTGAGAATAATCTACGATGCCATCCAAAACCTATGACTTG-3'
$\beta_1 F_{70A}$	5'-CCTGCAGATGGCTGGGAAGAT-3'
$\beta_1 M_{73A}$	5'-GCAGATGTTTGGGAAGGCGTTTTTCGTCTTCTGTGC-3'
* $\beta_1 F_{74A}$	5'-CAGATGTTTGGGAAGATGGCATTTCGTCTTCTGTCAAGAG-3'
* $\beta_1 F_{74Y}$	5'-GATGTTTGGGAAGATGTATTTTCGTCTTCTGTCAAG-3'
$\beta_1 F_{74L}$	5'-GATGTTTGGGAAGATGCTTTTCGTCTTCTGTGC-3'
$\beta_1 F_{75A}$	5'-GATGTTTGGGAAGATGTTTCCCGTCTTCTGTCAAGAGTC-3'
$\beta_1 F_{77A}$	5'-GGGAAGATGTTCTTCGTGCGCATGTCAAGAGTCTGGCTATG-3'
$\beta_1 C_{78A}$	5'-GATGTTTTTCGTCTTCGCTCAAGAGTCTGGCTATG-3'
$\beta_1 Y_{83A}$	5'CTTCTGTCAAGAGTCTGGCGCAGATACCATCTTGCGTGTGC-3'
$\beta_1 I_{86A}$	5'-CTGGCTATGATACCGCCTTGCGTGTCCCTG-3'
$\beta_1 F_{97A}$	5'-GATCTAATGTCAGGGAGGCTTTGCAGAACCTCGAC-3'
$\beta_1 L_{101A}$	5'-GAGTTTTTGCAGAACGCGAGACGCCCTGCACGAC-3'
$\beta_1 L_{104A}$	5'-GAACCTCGACGCCGACACGACCACCTC-3'
$\beta_1 L_{108A}$	5'-CTGCACGACCACGCGAGCCACCATCTAC -3'
$\beta_1 Y_{112A}$	5'-CTCGCCACCATCGCACCCAGGGATGCG-3'
$\beta_1 P_{118G}$	5'-CCAGGGATGCGCGCAGGTTTCTTCCGGTGCACC-3'
$\beta_1 F_{120A}$	5'-GGATGCGCGCACCTTCCGCGACGGTGCACCGATGCAG -3'
$\beta_1 L_{133A}$	5'-GCAAAGGGCTCATTGCGCACTACTACTCGG-3'
* $\beta_1 I_{145A}$	5'-GAGGGGCTTCAGGACGCTGTGATCGGGATTATC-3'
* $\beta_1 I_{145Y}$	5'-GAGGGGCTTCAGGACTATGTGATCGGGATTATC-3'
$\beta_1 I_{148A}$	5'-CAGGACATTGTGATCGCGATTATCAAGACTGTAG-3'
$\beta_1 I_{149A}$	5'-GACATTGTGATCGGGAATATCAAGACTGTAGC-3'
$\beta_1 I_{149A}/I_{150A}$	5'-CAGGACATTGTGATCGGAGCTGCTAAGACTGTAGCTCAAC-3'
$\beta_1 V_{146A}$	5'-GGCTTCAGGACATTGCGATCGGGATTATCAAG-3'
$\beta_1 Y_{192F}$	5'-CAAAGAAGAGGATTTTGTGCGAAGATCTGGACAGGTTTG-3'

Tabelle 3.1: Primer, die verwendet wurden, um die Mutationen innerhalb der Hämbindungstasche zu generieren. Sterne markieren Aminosäuren, die für die Aktivierung der sGC von Bedeutung sein könnten.

Ein Austausch von $\beta_1\text{Asp}_{44}$ und $\beta_1\text{Asp}_{45}$ gegen Alanin führte zu Enzymen, die durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 nicht mehr stimuliert werden konnten. Während BAY 41-2272 auch in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) keine Stimulation der $\beta_1\text{Asp}_{44}\text{Ala}$ -sGC erzeugte, konnte die $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC durch eine Kombination von BAY 41-2272 und DEA/NO konzentrationsabhängig bis maximal 32-fach stimuliert werden (Abb. 3.9 A, C). Der Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte beide Mutanten konzentrationsabhängig, wobei die jeweiligen EC_{50} -Werte um den Faktor 30 ($\beta_1\text{Asp}_{44}\text{Ala}$ -sGC) bzw. 6 ($\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC) über dem EC_{50} -Wert des WT-Enzyms lagen (Tab. 3.2). Zugabe von ODQ (10 μM) führte für beide untersuchten Enzyme zu keiner Steigerung der durch BAY 58-2667 induzierten Aktivierung (Abb. 3.9).

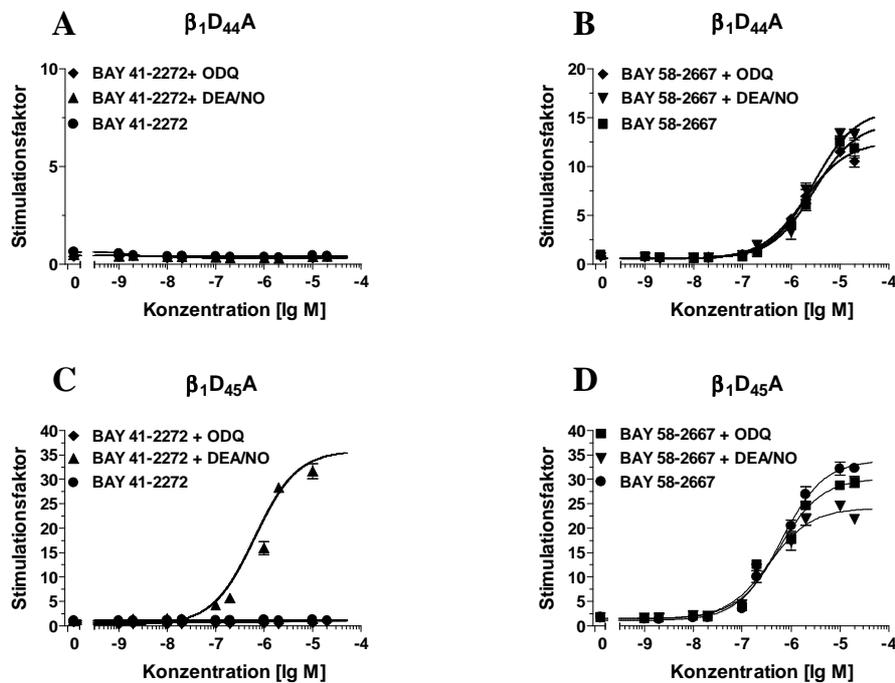


Abbildung 3.9: Konzentrationsabhängige Aktivierung von $\beta_1\text{Asp}_{44}\text{Ala}$ -sGC (A,B) und $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC (C,D) durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μM) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Der NO-Donor DEA/NO stimuliert in cGMP-Reporterzellen transient exprimierte WT-sGC konzentrationsabhängig maximal 10-fach. Zugabe des sGC-Stimulators BAY 41-2272 (1 μM) potenzierte die durch DEA/NO induzierte Stimulation auf maximal 25-fach (Abb. 3.10 A). Im Gegensatz dazu führte DEA/NO zu keiner Stimulierung der $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC. In Gegenwart des Häm-abhängigen sGC-Stimulators BAY 41-2272 (1 μM) konnte jedoch eine konzentrationsabhängige Stimulation der $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC bis maximal 20-fach erzielt werden (Abb. 3.10 B).

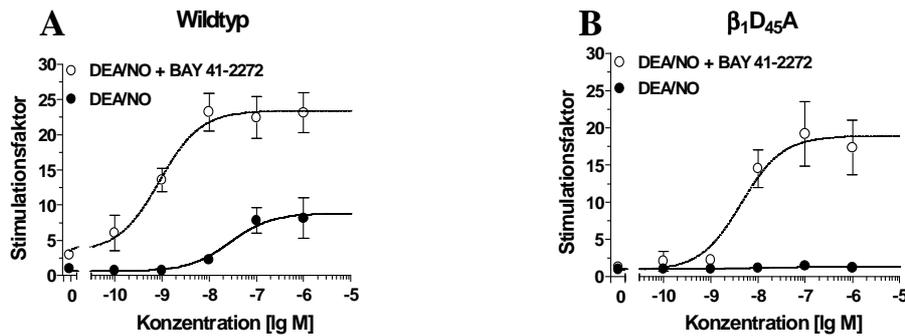


Abbildung 3.10: Konzentrationsabhängige Aktivierung von WT-sGC (A) und $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC (B) durch DEA/NO alleine und in Gegenwart des Häm-abhängigen sGC-Stimulators BAY 41-2272 (1 μM) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Ein Austausch von $\beta_1\text{Phe}_{74}$ gegen Alanin resultierte in einem Enzym, welches das typische Aktivierungsprofil hämfreier sGC aufwies. $\beta_1\text{Phe}_{74}\text{Ala}$ -sGC konnte durch BAY 41-2272 alleine oder in Kombination mit DEA/NO (10 nM) nicht stimuliert werden. Die durch BAY 58-2667 induzierte konzentrationsabhängige Aktivierung auf maximal 30-fach konnte durch Zugabe von ODQ (10 μM) nicht verstärkt werden (Abb. 3.11). Demgegenüber führte eine Substitution von $\beta_1\text{Phe}_{74}$ mit Tyrosin zu einem dem WT-Enzym vergleichbaren Aktivitätsprofil, jedoch mit um Faktor 1,3 bis 3,0 schwächeren Stimulationen im Vergleich zum WT-Enzym (Abb. 3.11 C, D; Tab. 3.2).

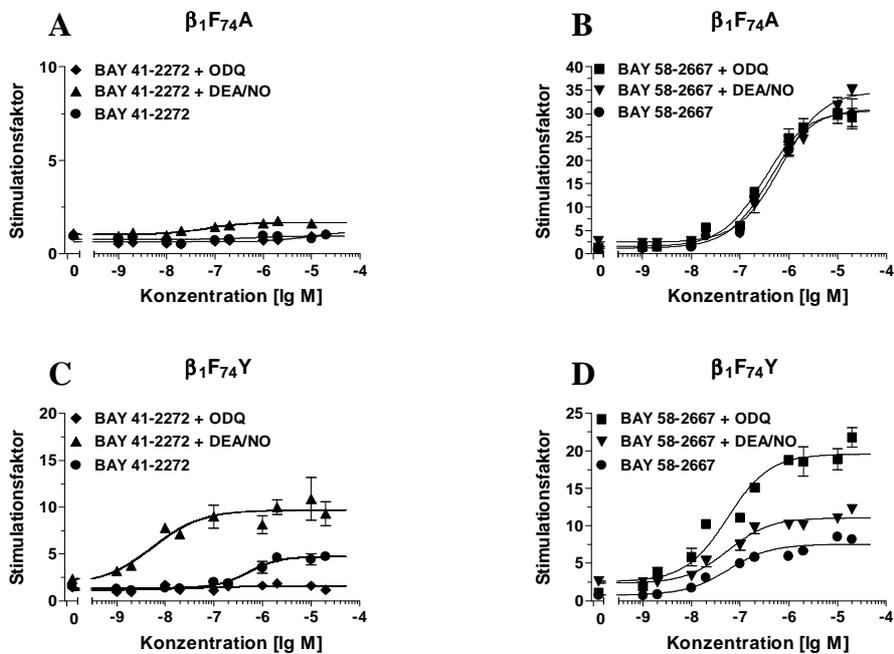


Abbildung 3.11: Konzentrationsabhängige Aktivierung von $\beta_1\text{Phe}_{74}\text{Ala}$ -sGC (A, B) und $\beta_1\text{Phe}_{74}\text{Tyr}$ -sGC (C, D) durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μM) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Mutante	BAY 41-2272 (1 nM – 30 µM)					
	Kontrolle		+ DEA/NO (10 nM)		+ ODQ (10 µM)	
	EC ₅₀	x-fach	EC ₅₀	x-fach	EC ₅₀	x-fach
WT	258 ± 24	14,8 ± 0,09	10 ± 3,5	15 ± 0,67	n.d.	2,1 ± 0,05
$\beta_1D_{44}A$	n.d.	1 ± 0,01	n.d.	1 ± 0,01	n.d.	1 ± 0,03
$\beta_1D_{45}A$	n.d.	1,25 ± 0,01	640 ± 40	31,7 ± 0,15	n.d.	1 ± 0,08
$\beta_1F_{74}A$	n.d.	1 ± 0,04	n.d.	1,6 ± 0,1	n.d.	1,6 ± 0,09
$\beta_1F_{74}Y$	837 ± 92	4,75 ± 0,02	4,1 ± 0,7	9,3 ± 0,13	n.d.	1,2 ± 0,06
$\beta_1I_{145}A$	1000 ± 16,5	7,7 ± 0,04	96 ± 5	10,3 ± 0,06	n.d.	2 ± 0,01
$\beta_1I_{145}Y$	430 ± 22,3	5,6 ± 0,05	46 ± 11	10,5 ± 0,04	n.d.	1,3 ± 0,01
Mutante	BAY 58-2667 (1 nM – 30 µM)					
	Kontrolle		+ DEA/NO (10 nM)		+ ODQ (10 µM)	
	EC ₅₀	x-fach	EC ₅₀	x-fach	EC ₅₀	x-fach
WT	98 ± 9,7	9,2 ± 0,12	13,4 ± 2,8	16,1 ± 0,2	9,8 ± 2,3	35,4 ± 0,08
$\beta_1D_{44}A$	2910 ± 25	14,1 ± 0,2	2790 ± 63	14,7 ± 0,15	1820 ± 365	13,5 ± 0,2
$\beta_1D_{45}A$	634 ± 105	32,2 ± 0,13	350 ± 19	24,6 ± 0,06	560 ± 104	28,8 ± 0,06
$\beta_1F_{74}A$	414 ± 64	30,3 ± 0,3	690 ± 83	31,6 ± 0,2	317 ± 56	30,0 ± 0,1
$\beta_1F_{74}Y$	57 ± 5	8,3 ± 0,03	55 ± 2	12,3 ± 0,03	50 ± 3	21,8 ± 0,1
$\beta_1I_{145}A$	23 ± 2,4	4,8 ± 0,2	15 ± 1,3	7,8 ± 0,06	7,6 ± 1,8	9,9 ± 0,03
$\beta_1I_{145}Y$	86 ± 2,9	6,5 ± 0,03	47 ± 4,3	8,6 ± 0,02	72 ± 1,7	7,6 ± 0,07

Tabelle 3.2: EC₅₀-Werte (nm) und maximale Aktivierungsfaktoren durch BAY 41-2272 und BAY 58-2667 in An- und Abwesenheit von DEA/NO (10 nM) sowie ODQ (10 µM) für WT-sGC und die charakterisierten sGC-Mutanten (n.d. = nicht detektierbar).

Eine Substitution von β_1I_{145} sowohl gegen Alanin als auch gegen Tyrosin führte zu Aktivierungsprofilen, die dem WT-Enzym vergleichbar waren. Der NO-unabhängige, aber Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 führte zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation sowohl der $\beta_1I_{145}Ala$ -sGC als auch der $\beta_1I_{145}Tyr$ -sGC. Die durch BAY 41-2272 induzierte Stimulation wurde jeweils durch Zugabe von DEA/NO (10 nM) verstärkt. Die konzentrationsabhängige Aktivierung der $\beta_1I_{145}Ala$ -sGC und der $\beta_1I_{145}Tyr$ -sGC durch den NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 konnte durch Zugabe von ODQ (10 µM) verstärkt werden (Abb. 3.12).

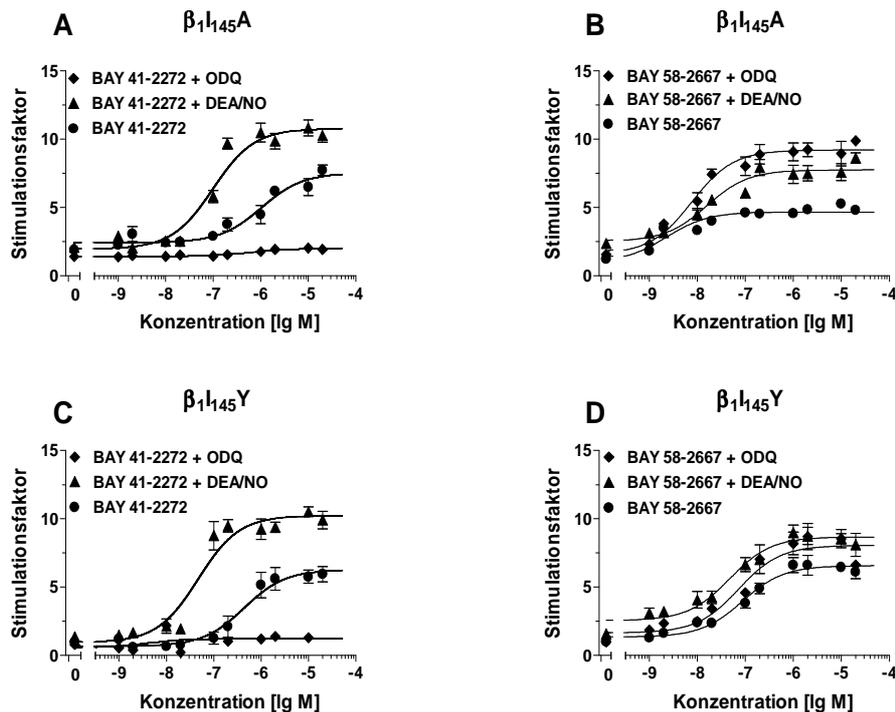


Abbildung 3.12: Konzentrationsabhängige Aktivierung von $\beta_1Ile_{145}Ala$ -sGC (A,B) und $\beta_1Ile_{145}Tyr$ -sGC (C,D) durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Alle anderen in Tabelle 3.1 aufgeführten und untersuchten Mutanten zeigten ein Aktivierungsprofil, das dem nativen Enzym vergleichbar war.

3.1.3 Untersuchung der Expression der sGC-Mutanten

Die transiente Expression des WT-Enzyms und der untersuchten Mutanten in den cGMP-Reporterzellen wurde mittels Western Blot überprüft. Polyklonale Antikörper, die gegen die C-Termini der α_1 - bzw. der β_1 -Untereinheit gerichtet waren, detektierten in allen Zelllysaten der transfizierten cGMP-Zellen spezifisch die jeweilige Untereinheit. In Zelllysaten nicht transfizierter cGMP-Reporterzellen wurde keine sGC erkannt. Aktin, welches in Zelllysaten mittels eines monoklonalen β -Aktin Antikörpers erkannt wurde, diente als Kontrolle der aufgetragenen Gesamtproteinmenge. Im Vergleich zu Aktin war der Expressionsstatus von allen untersuchten sGC-Mutanten auf vergleichbarem Niveau (Abb. 3.13).

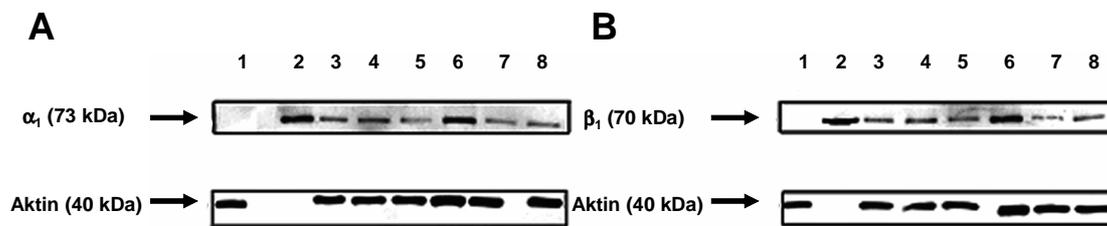


Abbildung 3.13: Repräsentative Western Blots der cytosolischen Fraktionen von transient transfizierten cGMP-Reporterzellen. Die Detektion der sGC-Untereinheiten erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen die sGC-Untereinheiten. β -Aktin wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen β -Aktin detektiert. Bande 1: 10 μ g cytosolische Fraktion untransfizierter cGMP-Reporterzellen, Bande 2: 10 ng Ratten-sGC aufgereinigt aus Sf9-Zellen, Bande 3: 10 μ g cytosolische Fraktion von WT-sGC, Bande 4: β_1 Asp₄₄Ala-sGC, Bande 5: β_1 Asp₄₅Ala-sGC, Bande 6: β_1 Phe₇₄Ala-sGC, Bande 7: β_1 Ile₁₄₅Ala-sGC, Bande 8: β_1 Ile₁₄₅Tyr-sGC transient transfiziert in cGMP-Reporterzellen. (A) Primäre Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit der sGC. (B) Primäre Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit der sGC.

3.2 Untersuchungen zur Dimerisierung der α_1/β_1 -sGC mittels BiFC

Die sGC ist ein obligates Heterodimer aus α - und β -Untereinheit. Bislang sind funktionell aktive Heterodimere der ubiquitär exprimierten α_1/β_1 -sGC und der vorwiegend in Gehirn, Uterus und Plazenta exprimierten α_2/β_1 -sGC bekannt. Spezifische Sequenzen, die die Heterodimerisation und damit die Expression funktionell aktiver sGC vermitteln, sind jedoch bisher noch weitgehend unbekannt. Zur Identifizierung solcher Sequenzabschnitte wurde die Heterodimerisation der α_1/β_1 -sGC in lebenden Zellen mittels BiFC in Kombination mit der cGMP-Reporterzelle untersucht.

3.2.1 Generierung und Charakterisierung von BiFC-Fusionsproteinen

BiFC beruht auf der Emission eines Fluoreszenzsignals zweier nichtfluoreszierender Fragmente von YFP, wenn diese durch Interaktion ihrer Fusionspartner in räumliche Nähe gelangen (siehe Abb. 2.1). Um ein fluoreszierendes α_1/β_1 -sGC Heterodimer zu generieren, wurde das N-terminale YFP-Fragment (YN) und das C-terminale YFP-Fragment (YC) an den N-Terminus (YNV, YCV) und den C-Terminus (YNH, YCH) sowohl der α_1 - als auch der β_1 -Untereinheit der sGC fusioniert (siehe 2.6.5). Die Fusionsproteine wurden in die cGMP-Reporterzelllinie transient cotransfiziert, das Aktivitätsprofil mittels Lumineszenzmessung und das Dimerisationsprofil mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ermittelt.

3.2.1.1 Charakterisierung von α_1/β_1 -sGC-Fusionsproteinen

Die Coexpression von α_1/β_1 -sGC-Fusionsproteinen in der cGMP-Reporterzelle resultierte in einer messbaren Fluoreszenz im zellulären Cytosol für die Kombinationen α_1 -YCH/ β_1 -YNH-sGC und α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC (Abb. 3.14 A, C, D). Demgegenüber zeigte die Expression unfusionierter α_1/β_1 -sGC, der Fusionsproteine alleine und anderer α_1/β_1 -sGC-Fusionsproteinkombinationen keine detektierbare Fluoreszenz (Abb. 3.14 A, B).

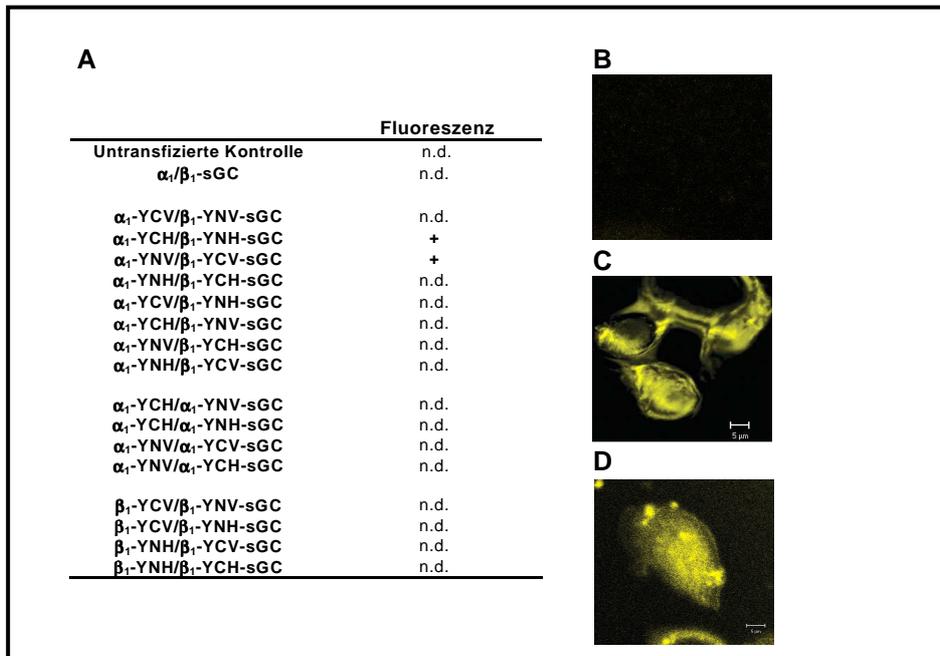


Abbildung 3.14: Überblick über die Fluoreszenzsignale verschiedener Kombinationen der N-terminal fusionierten sGC-Chimären α_1 -YNV, α_1 -YCV, β_1 -YNV, β_1 -YCV und der C-terminal fusionierten sGC-Chimären α_1 -YNH, α_1 -YCH, β_1 -YNH, β_1 -YCH, gemessen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen (A). Fluoreszenzsignale von α_1/β_1 -sGC (B), α_1 -YCH/ β_1 -YNH-sGC (C) und α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC (D) in repräsentativen, transient transfizierten cGMP-Reporterzellen, gemessen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Die Expression der sGC-Fusionsproteine in der cGMP-Reporterzelle wurde durch Western Blots überprüft. Die verwendeten Antikörper, die gegen den C-Terminus der jeweiligen Untereinheit gerichtet sind, detektierten die fusionierten sGC-Untereinheiten in einem 100.000 x g Überstand transfizierter Zellen, während keine sGC in untransfizierten Zellen detektierbar war. Aktin diente als Kontrolle der aufgetragenen Gesamtproteinmenge und wurde in den Zelllysaten mittels eines monoklonalen β -Aktin Antikörpers detektiert (Abb. 3.15).

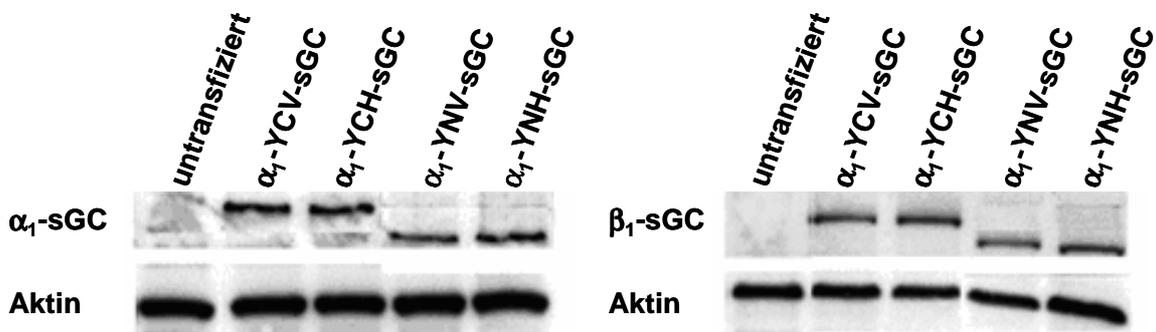


Abbildung 3.15: Repräsentative Western Blots der cytosolischen Fraktion von transient transfizierten und untransfizierten cGMP-Reporterzellen. Untereinheiten der sGC wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen die α_1 -sGC und die β_1 -sGC detektiert. Aktin wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen β -Aktin detektiert. Oberhalb der Blots sind die aufgetragenen Proteine angegeben.

Hinsichtlich der Enzymaktivität stimulierte der NO-unabhängige, aber Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 in cGMP-Reporterzellen transient cotransfizierte, unfusionierte α_1/β_1 -sGC konzentrationsabhängig mit einem EC_{50} -Wert von 464 nM (Abb. 3.16 A). Zugabe von DEA/NO (1 nM) verursachte eine Verstärkung der durch BAY 41-2272 induzierten sGC-Stimulierung und eine Verringerung des EC_{50} -Wertes auf 188 nM (Abb. 3.16 A). Der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte α_1/β_1 -sGC maximal 15-fach. Zugabe von ODQ (10 μ M) erhöhte die durch BAY 58-2667 induzierte Aktivierung auf maximal 30-fach (Abb. 3.16 B).

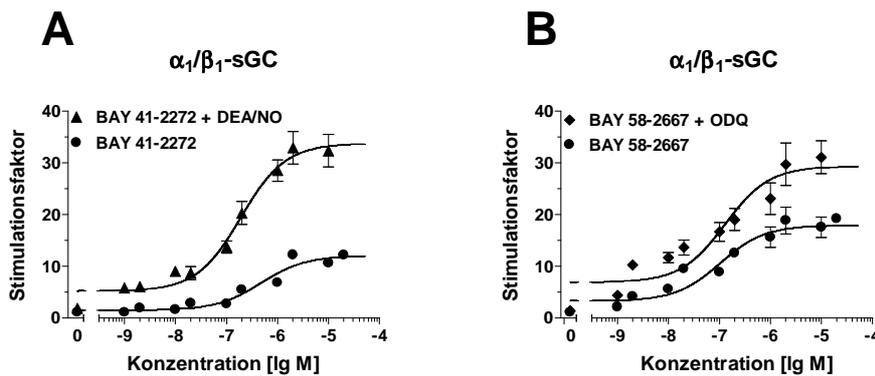


Abbildung 3.16: Konzentrationsabhängige Aktivierung von α_1/β_1 -sGC durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 (A) und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 (B) alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (1 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

Im Gegensatz zur unfusionierten α_1/β_1 -sGC konnte α_1 -YCH/ β_1 -YNH-sGC weder durch den sGC-Stimulator BAY 41-2272 noch durch den sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Kombination mit DEA/NO bzw. ODQ aktiviert werden (Abb. 3.17 A, B). Demgegenüber resultierte die Coexpression von YN, fusioniert an den N-Terminus von α_1 -sGC, und YC, fusioniert an den N-Terminus von β_1 -sGC (α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC), in einem der unfusionierten α_1/β_1 -sGC vergleichbaren Aktivitätsprofil. Der sGC-Stimulator BAY 41-2272 verursachte eine konzentrationsabhängige Stimulierung der α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC mit einem EC_{50} -Wert von 511 nM, welche durch Zugabe von DEA/NO (1 nM) potenziert wurde (Abb. 3.17 C). Der sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC konzentrationsabhängig mit einem EC_{50} -Wert von 15 nM. Zugabe von ODQ verstärkte die durch BAY 58-2667 induzierte Aktivierung und verringerte den EC_{50} -Wert auf 3,9 nM (Abb. 3.17 D). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die folgenden Untersuchungen zur Dimerisierung mit der α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC durchgeführt.

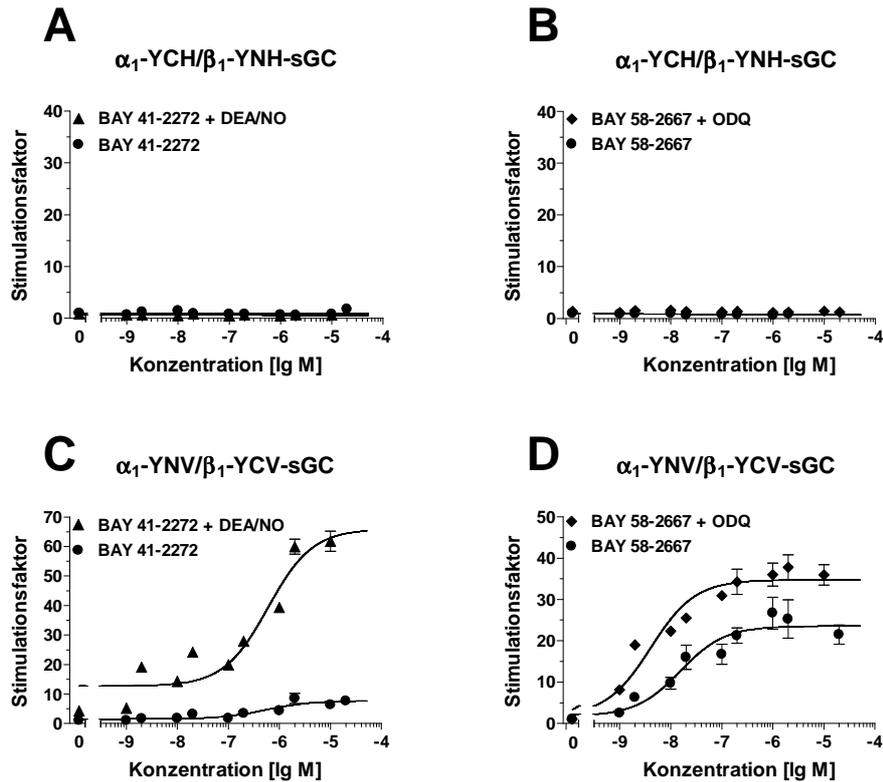


Abbildung 3.17: Konzentrationsabhängige Aktivierung von α_1 -YCH/ β_1 -YNH-sGC (A,B) und α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC (C,D) durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (1 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

3.2.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten von α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC

Zur Identifizierung von spezifischen, an der Heterodimerisation von α_1 / β_1 -sGC beteiligten Aminosäuren wurde ein Multisequenzalignment angefertigt, um konservierte Bereiche innerhalb der postulierten Dimerisierungsdomänen zu identifizieren (Abb. 3.18 A). Innerhalb der identifizierten konservierten Bereiche wurden Aminosäuren in Blöcken deletiert (Abb. 3.18 B). Die generierten Deletionsmutanten wurden transient in cGMP-Reporterzellen transfiziert und die Fähigkeit zur Heterodimerisierung mittels BiFC sowie das Aktivierungsprofil der Deletionsmutanten mittels Lumineszenz charakterisiert.

Coexpression von $\alpha_1(\Delta 283-292)$ -YNV-sGC, $\alpha_1(\Delta 373-382)$ -YNV-sGC, $\alpha_1(\Delta 383-392)$ -YNV-sGC, $\alpha_1(\Delta 393-402)$ -YNV-sGC, $\alpha_1(\Delta 460-469)$ -YNV-sGC und $\alpha_1(\Delta 470-479)$ -YNV-sGC mit β_1 -YCV-sGC sowie $\beta_1(\Delta 334-343)$ -YCV-sGC, $\beta_1(\Delta 401-410)$ -YCV-sGC und $\beta_1(\Delta 411-420)$ -YCV-sGC mit α_1 -YNV-sGC resultierte in einer messbaren, der α_1 -YNV/ β_1 -YCV-sGC vergleichbaren Fluoreszenz (Abb. 3.19 A). Durch Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass die Expression aller getesteten Mutanten auf vergleichbarem Niveau war (Abb. 3.19 B).

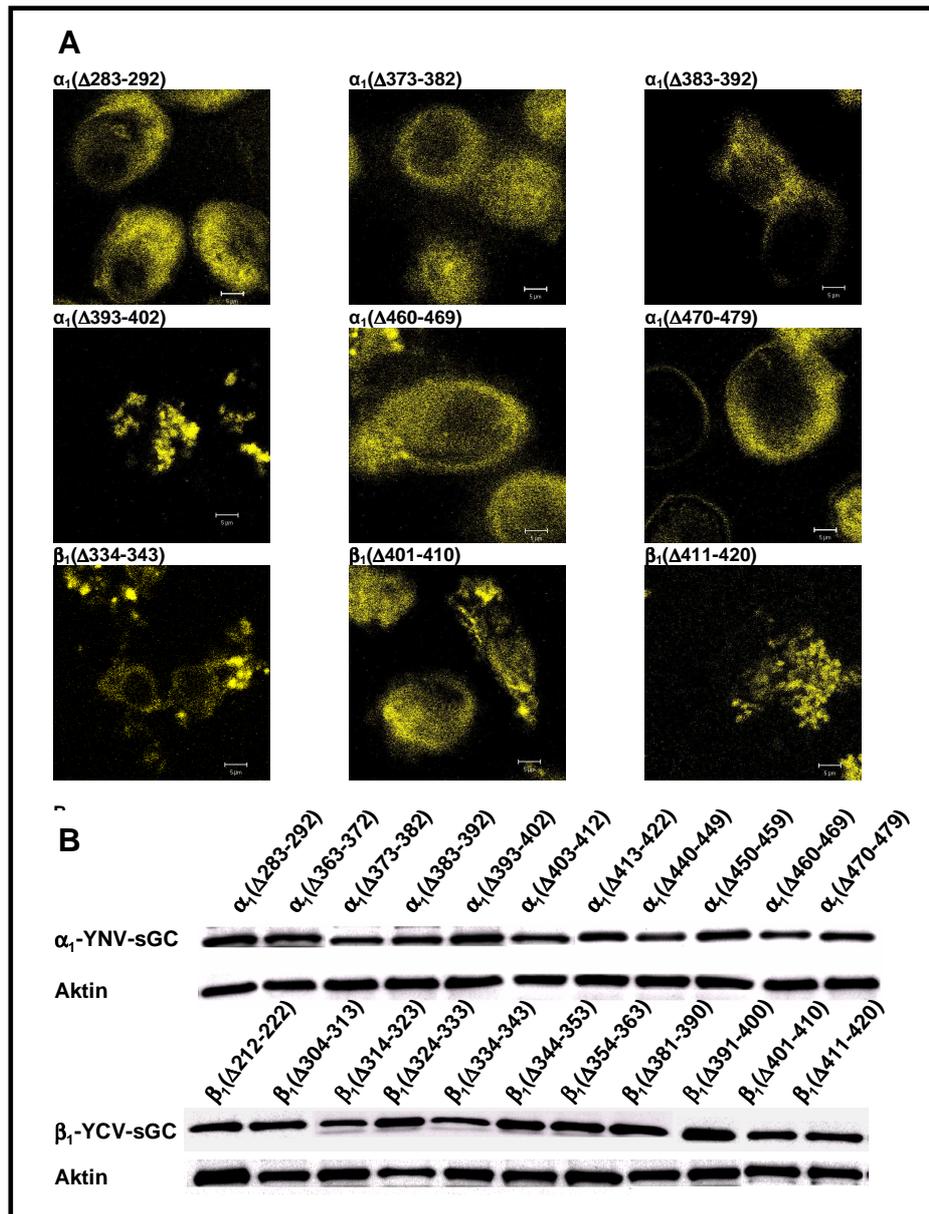


Abbildung 3.19: (A) Fluoreszenzsignale von repräsentativen transient transfizierten cGMP-Reporterzellen. (B) Western Blots der cytosolischen Fraktion von transient transfizierten cGMP-Reporterzellen. Die Untereinheiten der sGC wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen die α_1 -sGC und die β_1 -sGC detektiert. Aktin wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen β -Aktin detektiert. Oberhalb der Blots sind die aufgetragenen Proteine angegeben.

Deletion der Aminosäuresegmente α_1 283-292, α_1 373-402 und β_1 334-343 führte zu keiner deutlichen Veränderung des Aktivitätsprofils im Vergleich zum nativen Enzym. Der NO-unabhängige und Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 stimulierte $\alpha_1(\Delta 283-292)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC konzentrationsabhängig bis maximal 25-fach (Abb. 3.20 A). Die BAY 41-2272-vermittelte Aktivierung wurde durch Zugabe von DEA/NO auf das maximal 150-fache des Basalwerts potenziert (Abb. 3.20 A). Im Fall von $\alpha_1(\Delta 373-382)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC induzierte BAY 41-2272 eine konzentrationsabhängige, maximal 90-fache Stimulation, welche in Gegenwart von DEA/NO auf das 200-fache potenziert wurde (Abb. 3.20 C). $\alpha_1(\Delta 383-392)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC wurde durch BAY 41-2272 maximal 3-fach stimuliert und Zugabe von DEA/NO potenzierte die BAY 41-2272-induzierte Aktivierung auf maximal 10-fach (Abb. 3.20 E). Demgegenüber konnten $\alpha_1(\Delta 393-402)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC und α_1 -YNV/ $\beta_1(\Delta 334-343)$ -YCV-sGC nur in Gegenwart von DEA/NO durch BAY 41-2272 konzentrationsabhängig bis maximal 25-fach bzw. 12-fach stimuliert werden (Abb. 3.20 G, I). Der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 induzierte eine konzentrationsabhängige Aktivierung von $\alpha_1(\Delta 283-292)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC bis maximal 60-fach (Abb. 3.20 B). $\alpha_1(\Delta 373-382)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC wurde durch BAY 58-2667 maximal 20-fach aktiviert und $\alpha_1(\Delta 383-392)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC maximal 130-fach (Abb. 3.20 D, F). Im Falle von $\alpha_1(\Delta 393-402)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC und α_1 -YNV/ $\beta_1(\Delta 334-343)$ -YCV-sGC bewirkte BAY 58-2667 eine Aktivierung auf maximal 5-fach bzw. 2-fach (Abb. 3.20 H, J). Zugabe von ODQ potenzierte die BAY 58-2667-induzierte Enzymaktivierung nur für $\alpha_1(\Delta 373-382)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC (Abb. 3.20 D). Alle anderen in Tabelle 3.3 aufgeführten Deletionsmutanten ließen weder eine messbare Fluoreszenz erkennen noch konnten diese durch den sGC-Stimulator BAY 41-2272 oder den sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO und ODQ aktiviert werden.

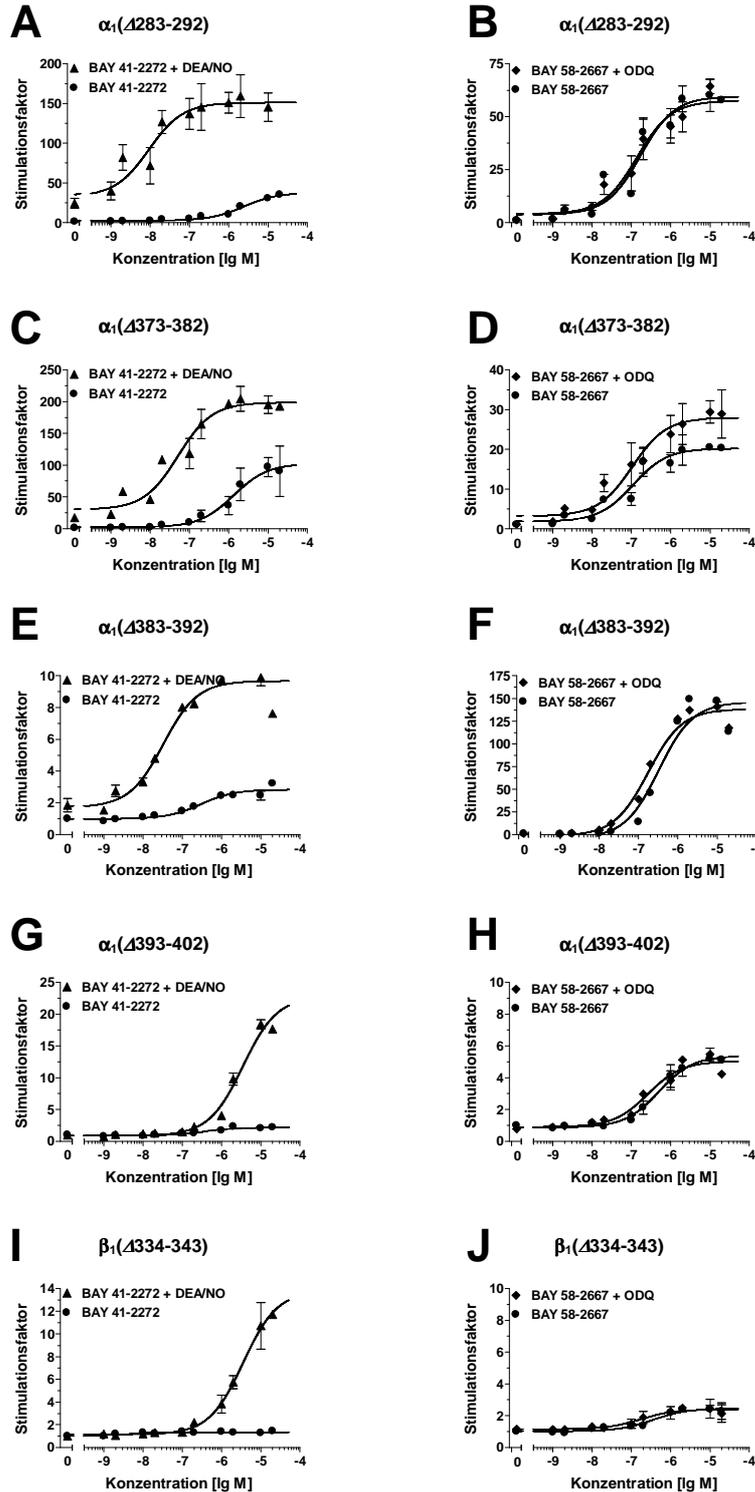


Abbildung 3.20: Konzentrationsabhängige Aktivierung von $\alpha_1(\Delta 283-292)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC (A,B), $\alpha_1(\Delta 373-382)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC (C,D), $\alpha_1(\Delta 383-392)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC (E,F), $\alpha_1(\Delta 393-402)$ -YNV/ β_1 -YCV-sGC (G,H) und α_1 -YNV/ $\beta_1(\Delta 334-343)$ -YCV-sGC durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (1 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

	EC ₅₀ -Werte (nM)				Fluoreszenz
	BAY 41-2272	BAY 41-2272 + DEA/NO (1 nM)	BAY 58-2667	BAY 58-2667 + ODQ (10 µM)	
Untransfizierte Kontrolle	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α_1/β_1 -sGC	464 ± 0,09	188 ± 0,11	99 ± 0,12	100 ± 0,70	n.d.
α_1 -YINV/ β_1 -YCV-sGC	511 ± 0,11	587 ± 0,25	15 ± 0,18	3,9 ± 0,14	+
Deletionsmutanten von α_1-YINV cotransfiziert mit β_1-YCV					
α_1 -YINV(Δ 283-292)	2300 ± 0,10	9 ± 0,25	166 ± 0,17	136 ± 0,16	+
α_1 -YINV(Δ 363-372)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α_1 -YINV(Δ 373-382)	1301 ± 0,22	50 ± 0,15	100 ± 0,16	102 ± 0,19	+
α_1 -YINV(Δ 383-392)	289 ± 0,15	32 ± 0,10	318 ± 0,12	170 ± 0,07	+
α_1 -YINV(Δ 393-402)	n.d.	3410 ± 0,08	488 ± 0,12	253 ± 0,13	+
α_1 -YINV(Δ 403-412)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α_1 -YINV(Δ 413-422)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α_1 -YINV(Δ 440-449)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α_1 -YINV(Δ 450-459)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α_1 -YINV(Δ 460-469)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
α_1 -YINV(Δ 470-479)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
Deletionsmutanten von β_1-YCV cotransfiziert mit α_1-YINV					
β_1 -YCV(Δ 212-222)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 304-313)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 314-323)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 324-333)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 334-343)	n.d.	3500 ± 0,11	337 ± 0,22	158 ± 0,29	+
β_1 -YCV(Δ 344-353)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 354-363)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 381-390)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 391-400)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β_1 -YCV(Δ 401-410)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
β_1 -YCV(Δ 411-420)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+

Tabelle 3.3: EC₅₀-Werte der Aktivierung von α_1 -YINV/ β_1 -YCV-sGC-Deletionsmutanten durch BAY 41-2272 oder BAY 58-2667. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 1 nM bis 30 µM alleine oder in Gegenwart einer fixen Konzentration von DEA/NO (1 nM) oder ODQ (10 µM) appliziert. Die Dimerisationsfähigkeit der Deletionsmutanten wurde mittels BiFC geprüft.

3.3 Untersuchung der subzellulären Lokalisation der sGC

3.3.1 Charakterisierung von α_1 -GFP-sGC und β_1 -DsRed-sGC Fusionsproteinen

Um die subzelluläre Lokalisation der sGC in der Zelle zu untersuchen, wurde GFP an den N-Terminus von α_1 -sGC und DsRed an den C-Terminus von β_1 -sGC fusioniert (siehe 2.6.5). Die generierten Fusionsproteine GFP- α_1 -sGC und β_1 -sGC-DsRed wurden transient in cGMP-Reporterzellen transfiziert. Das Aktivitätsprofil der sGC-Fusionsproteine wurde mit dem NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und dem NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO bzw. ODQ charakterisiert.

Die generierten sGC-Fusionsproteine zeigten ein dem unfusionierten Enzym vergleichbares Aktivierungsprofil. GFP- α_1 -sGC wurde durch BAY 41-2272 konzentrationsabhängig mit einem EC_{50} -Wert von 317 nM maximal 8-fach stimuliert. Die BAY 41-2272-induzierte Stimulierung konnte durch Zugabe von 10 nM DEA/NO auf maximal 30-fach potenziert werden. Der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte GFP- α_1 -sGC maximal 10-fach. Durch Zugabe von 10 μ M ODQ wurde die durch BAY 58-2667 induzierte Aktivierung auf maximal 17,5-fach gesteigert (Abb. 3.22 A, B). β_1 -sGC-DsRed wurde durch den NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 maximal 10-fach stimuliert. Zugabe von DEA/NO verstärkte die BAY 41-2272-induzierte Stimulierung auf maximal 35-fach. Der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktivierte β_1 -sGC-DsRed maximal 7-fach, in Gegenwart von ODQ war die BAY 58-2667-induzierte Aktivierung auf maximal 16-fach verstärkt (Abb. 3.22 C, D).

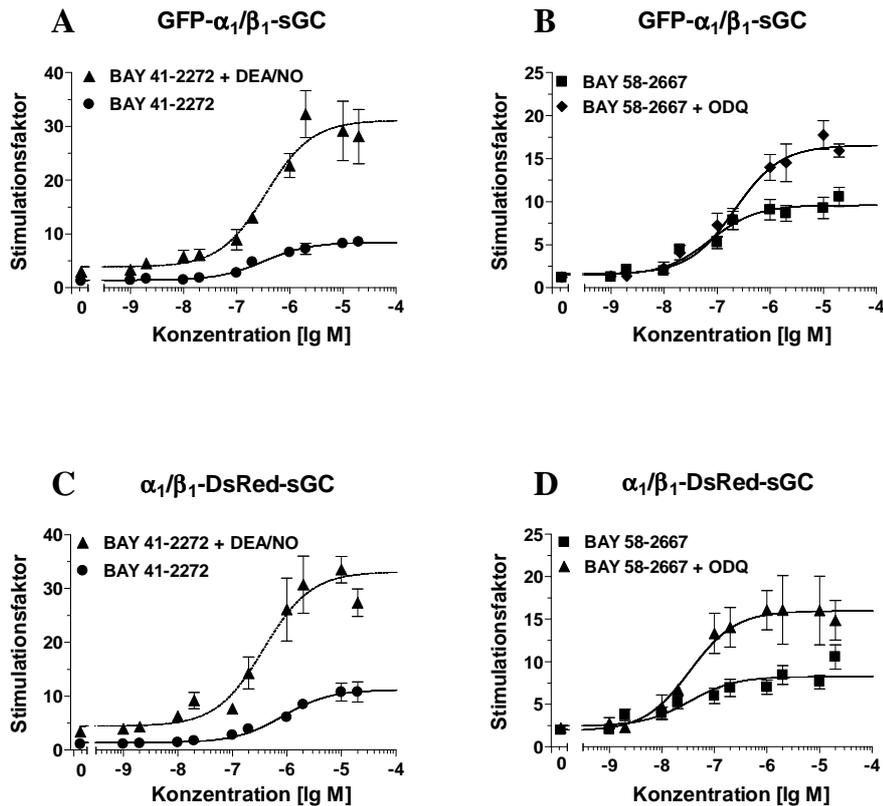


Abbildung 3.22: Konzentrationsabhängige Aktivierung von GFP- α_1/β_1 -sGC (A,B) und α_1/β_1 -DsRed-sGC (C,D) durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und den Häm-unabhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 alleine oder in Gegenwart von DEA/NO (10 nM) bzw. ODQ (10 μ M) in transient transfizierten cGMP-Reporterzellen.

3.3.2 Subzelluläre Lokalisation von GFP- α_1 -sGC und β_1 -sGC-DsRed

Mit GFP- α_1/β_1 -sGC und α_1/β_1 -DsRed-sGC transient transfizierte cGMP-Reporterzellen wiesen eine rein cytosolische Verteilung sowohl von GFP- α_1 -sGC als auch von β_1 -sGC-DsRed auf (Abb. 3.23). Inkubation der Zellen mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 (1 μ M), dem sGC-Aktivator BAY 58-2667 (1 μ M), dem NO-Donor DEA/NO (1 μ M) oder dem sGC-Inhibitor ODQ (10 μ M) führte zu keiner deutlichen Veränderung der subzellulären Verteilung der sGC (Abb. 3.23).

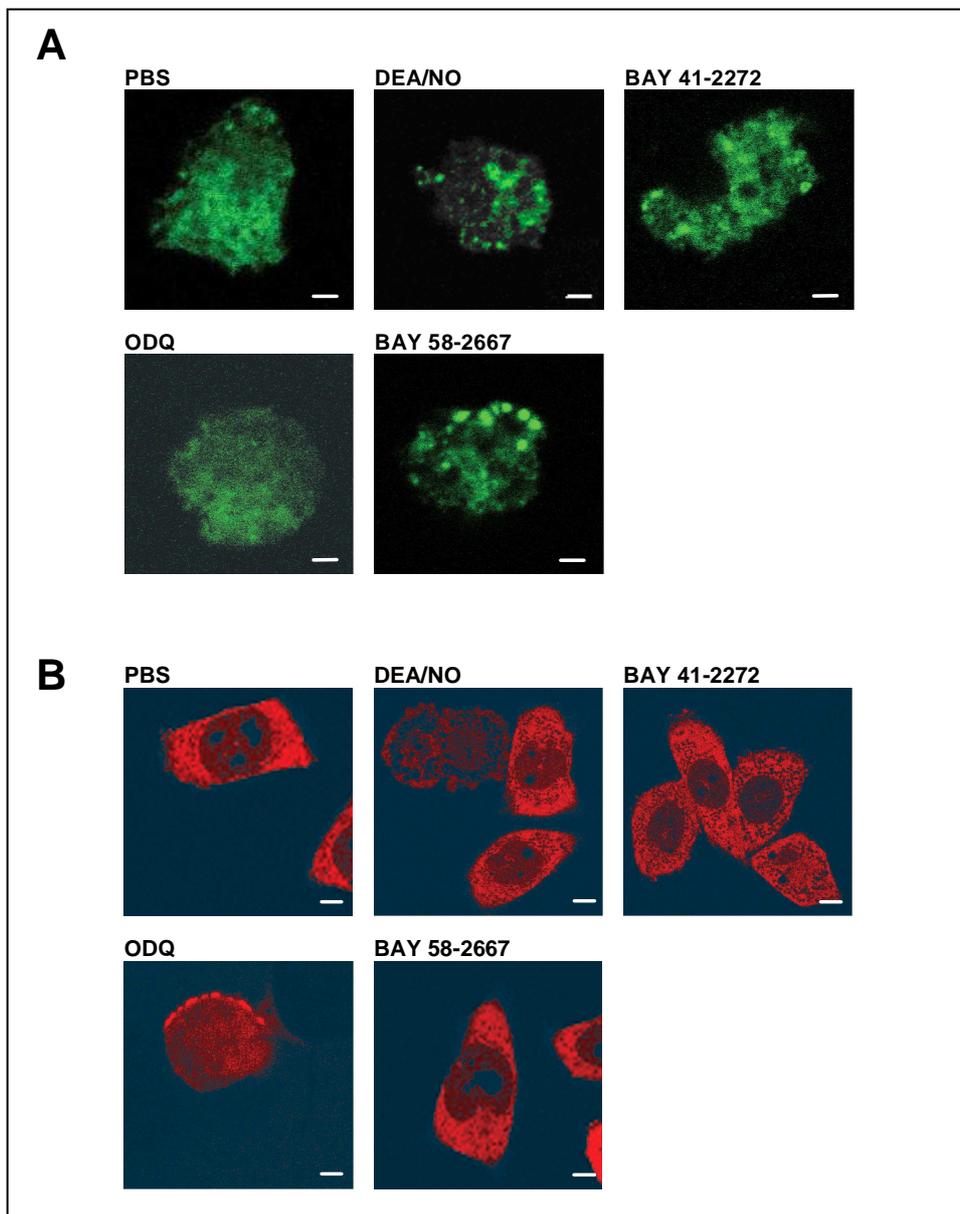


Abbildung 3.23: Repräsentative mit GFP- α_1/β_1 -sGC (A) und mit α_1/β_1 -DsRed-sGC (B) transient transfizierte cGMP-Reporterzellen, gemessen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung. Vor der Messung wurden die Zellen 10 min bei 37°C mit PBS, DEA/NO (1 μ M), BAY 41-2272 (1 μ M), ODQ (10 μ M) oder BAY 58-2667 (1 μ M) inkubiert.

Um zu untersuchen, ob die zelluläre Verteilung der sGC abhängig vom exprimierenden Zelltyp ist, wurden neben den cGMP-Reporterzellen auch HUVEC und HASMC transient mit GFP- α_1/β_1 -sGC cotransfiziert. Sowohl in den HUVEC als auch in den HASMC war die Verteilung der sGC vor und nach Inkubation mit BAY 41-2272 (1 μ M), BAY 58-2667 (1 μ M) oder DEA/NO (1 μ M) rein cytosolisch (Abb. 3.24). Auffällig war jedoch, dass in den HUVEC die sGC nicht im ganzen Cytosol verteilt, sondern vorwiegend in bestimmten Arealen lokalisiert war (Abb. 3.24 A).

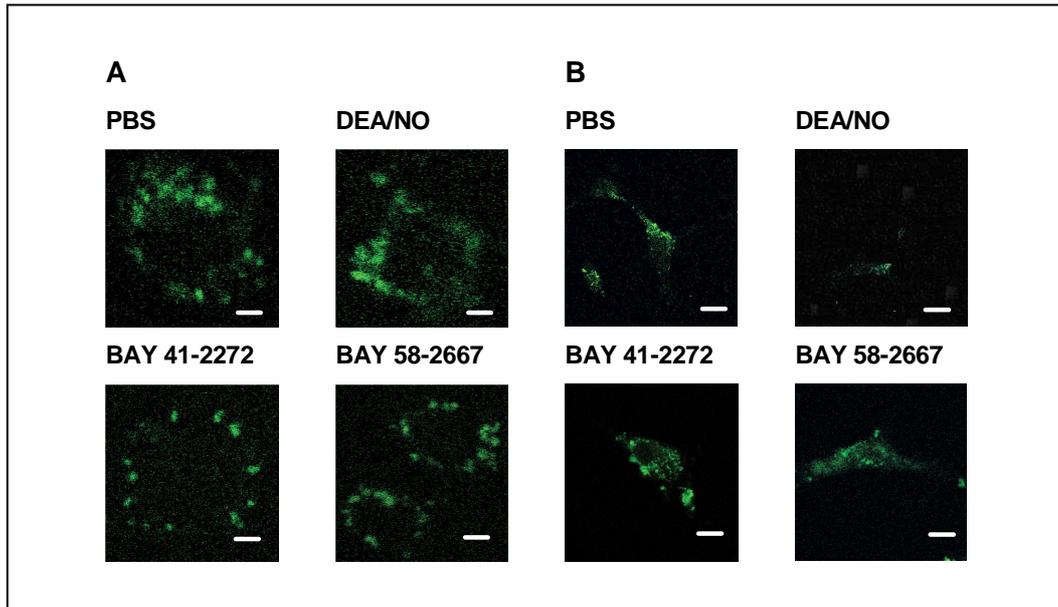


Abbildung 3.24: Repräsentative mit GFP- α_1/β_1 -sGC transient transfizierte HUVEC (A) und HASMC (B), gemessen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop in 63-facher (A) bzw. 24-facher (B) Vergrößerung. Vor der Messung wurden die Zellen 10 min bei 37°C mit PBS, DEA/NO (1 μ M), BAY 41-2272 (1 μ M) oder BAY 58-2667 (1 μ M) inkubiert.

3.3.3 Immunhistochemie

Um auszuschließen, dass eine Fusion der sGC an die Fluoreszenzproteine eine Änderung der subzellulären Lokalisation zur Folge hat, wurden zusätzlich cGMP-Reporterzellen, die stabil mit α_1/β_1 -sGC transfiziert sind, immunhistochemisch untersucht. Die α_1/β_1 -sGC wurde durch polyklonale Primärantikörper, die gegen die C-Termini der α_1 - und der β_1 -Untereinheit gerichtet sind, detektiert und mit dem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper Alexa 488 sichtbar gemacht. Die Zellmembran wurde mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Alexa 594-WGA angefärbt. Für die unstimulierte α_1/β_1 -sGC war eine rein cytosolische Verteilung zu beobachten. Inkubation der mit sGC stabil transfizierten Zellen mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 (1 μ M), dem NO-Donor DEA/NO (10 μ M) oder dem sGC-Inhibitor ODQ (10 μ M) führte zu keiner deutlichen Veränderung der subzellulären Lokalisation (Abb. 3.25).

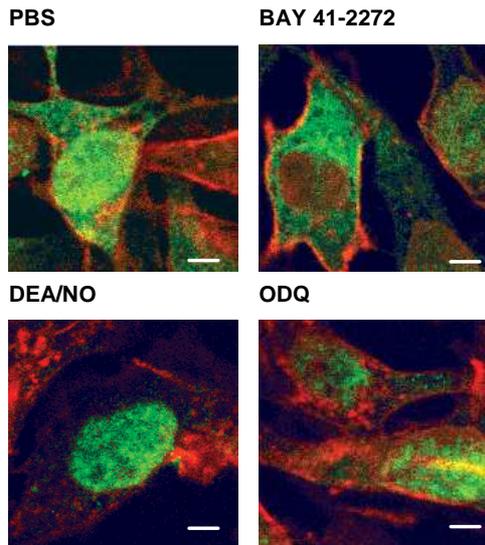


Abbildung 3.25:

Subzelluläre Lokalisation von α_1/β_1 -sGC in repräsentativen, stabil transfizierten cGMP-Reporterzellen. Die sGC-Untereinheiten wurden mit Primärantikörpern gegen die α_1 - und die β_1 -Untereinheit detektiert und mit Alexa 488-markierten Sekundärantikörpern visualisiert. Die Membran wurde mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Alexa 594-WGA angefärbt. Die Zellen wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Vor der Messung wurden die Zellen 10 min bei 37°C mit PBS, BAY 41-2272 (1 μ M), DEA/NO (1 μ M) oder ODQ (10 μ M) inkubiert.

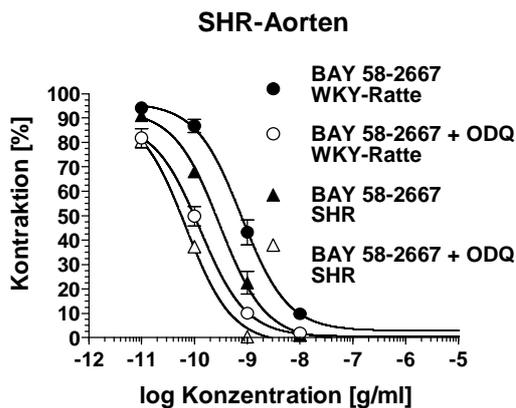
3.4 Vasorelaxierende Wirkung des sGC-Aktivators BAY 58-2667 *in vitro*

Die vasorelaxierende Wirkung des NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivators, BAY 58-2667 wurde an Aortenringen von vier verschiedenen Krankheitsmodellen, die mit oxidativen Stress einhergehen, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgefäßen, *in vitro* untersucht:

- alten spontan hypertensiven Ratten
- Watanabe Kaninchen mit vererbter Hyperlipidämie
- ApolipoproteinE Knockout Mäusen, die mit Hochfettfutter gefüttert wurden
- Arterien von Patienten mit Diabetes-Typ-II

3.4.1 Aorten von spontan hypertensiven Ratten

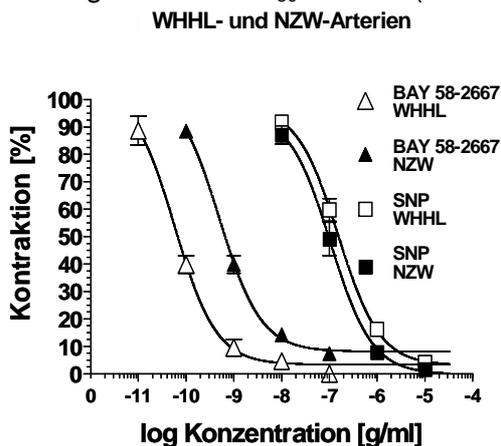
Die Phenylephrin-induzierte Kontraktion von SHR-Aorten und als Kontrolle verwendeter Aorten von entsprechend alten Wistar Kyoto Ratten (WKY) wurde konzentrationsabhängig durch den sGC-Aktivator BAY 58-2667 inhibiert. Die relaxierende Wirkung von BAY 58-2667 war an Aortenringen von SHR mit einem IC_{50} -Wert von 0,35 nM im Vergleich zu den Gefäßen von WKY-Ratten mit einem IC_{50} -Wert von 1,23 nM verstärkt. Zugabe von ODQ (10 μ M) verringerte die IC_{50} -Werte für die BAY 58-2667-induzierte Relaxation auf 0,09 nM an Aorten von SHR und 0,15 nM an Aorten von normotensiven WKY-Ratten (Abb. 3.26).

**Abbildung 3.26:**

Konzentrationsabhängige Relaxation Phenylephrin kontrahierter Aortenringe von WKY-Ratten (Kreise) und SHR (Dreiecke) durch den sGC Aktivator BAY 58-2667 (schwarze Symbole) alleine und in Gegenwart von ODQ (10 μ M) (weiße Symbole).

3.4.2 Arterien von Watanabe Kaninchen

Arterien von Watanabe Kaninchen mit vererbter Hyperlipidämie (WHHL) zeigen eine Veränderung der Endothel-induzierten Vasodilatation. Diese sogenannte endotheliale Dysfunktion ist für eine Atherosklerose im Anfangsstadium charakteristisch. Mit Phenylephrin vorkontrahierte Arteria-Saphena Ringe von atherosklerotischen WHHL wurden durch den Häm-abhängigen sGC-Aktivator BAY 58-2667 konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} von 0,1 nM relaxiert. Als Kontrolle verwendete Arteria-Saphena Ringe von weißen Neuseeländer Kaninchen (NZW) relaxierte BAY 58-2667 konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} -Wert von 1,2 nM. Demgegenüber relaxierte der NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) vorkontrahierte Arteria-Saphena Ringe von WHHL (IC_{50} =153 nM) und NZW (IC_{50} =105 nM) mit vergleichbaren IC_{50} -Werten (Abb. 3.27).

**Abbildung 3.27:**

Konzentrationsabhängige Relaxation Phenylephrin kontrahierter Saphena-Arterien von WHHL (weiße Symbole) und NZW (schwarze Symbole) durch den sGC Aktivator BAY 58-2667 (Dreiecke) im Vergleich zum NO-Donor SNP (Quadrate).

3.4.3 Aorten von ApolipoproteinE Knockout Mäusen

Aortenringe von ApolipoproteinE Knockout Mäusen (ApoE^{-/-}-Maus), einem Tiermodell für atherosklerotische Gefäßerkrankungen, wurden mit dem Thromboxanalogon U46619 kontrahiert. BAY 58-2667 relaxierte die vorkontrahierten Aorten mit einem IC_{50} -Wert von 4,0

nM für ApoE^{-/-}-Mäuse, die eine Standarddiät bekamen, und mit einem IC₅₀-Wert von 0,7 nM für ApoE^{-/-}-Mäuse, denen eine Hochfett-diät verabreicht wurde. Demgegenüber relaxierte Nitroglycerin (GTN) Aortenringe von ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit einem Hochfettfütterer wurden, mit einem IC₅₀-Wert von 119 nM und Aortenringe mit Standardfütterer ApoE^{-/-}-Mäuse mit einem IC₅₀-Wert von 68,5 nM (Abb. 3.28).

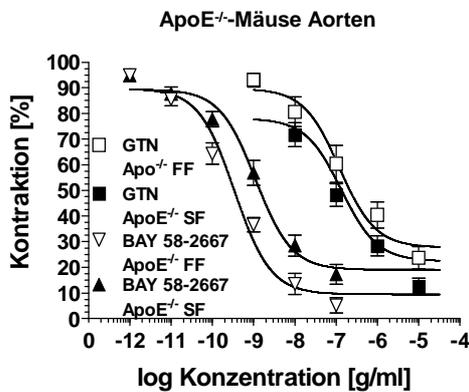


Abbildung 3.28: Konzentrationsabhängige Relaxation mit U46619 kontrahierter Thoraxaorten von ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit Standardfütterer (SF; schwarze Symbole) und ApoE^{-/-}, die mit Fettfütterer (FF) gefütterer wurden (weiße Symbole), durch den Häm- und NO-unabhängigen sGC Stimulator BAY 58-2667 (Dreiecke) im Vergleich zu GTN (Quadrate).

3.4.4 Humane Arterien

Mit Phenylephrin vorkontrahierte humane Mesenterialarterien von Typ-II-Diabetikern, die während Hüftgelenksoperationen entnommen wurden, relaxierte BAY 58-2667 mit einem IC₅₀-Wert von 0,03 nM. Arterien von Patienten, bei denen keine Vorerkrankung bekannt war, relaxierte BAY 58-2667 mit einem IC₅₀-Wert von 0,39 nM (Abb. 3.29).

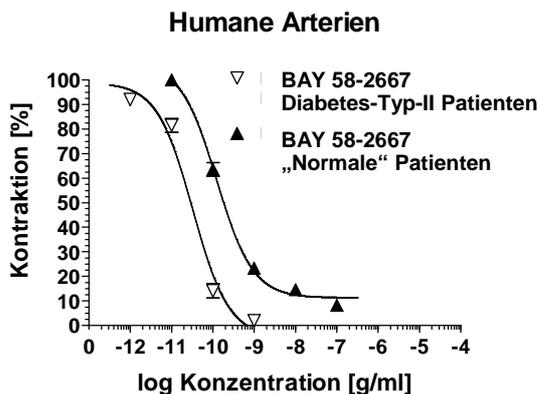


Abbildung 3.29: Konzentrationsabhängige Relaxation Phenylephrin kontrahierter Mesenterialarterien, die während Hüftgelenksoperationen entnommen wurden. Schwarze Dreiecke kennzeichnen Gefäße von Patienten ohne Vorerkrankung, weiße Dreiecke Gefäße von Patienten mit Diabetes-Typ-II als Vorerkrankung.

4. Diskussion

4.1 An der sGC-Aktivierung beteiligte Aminosäuren

In den letzten Jahren konnten die strukturellen Grundlagen der Hämbindung der sGC durch die Identifizierung von $\beta_1\text{His}_{105}$ als axialem Liganden des zentralen Häm-Eisenatoms sowie $\beta_1\text{Tyr}_{135}$ und $\beta_1\text{Arg}_{139}$ als Ankeraminosäuren der Hämpropionate weitgehend aufgeklärt werden (Wedel et al., 1994; Schmidt et al., 2004). Im Gegensatz dazu sind die strukturellen Grundlagen der intramolekularen Signaltransduktion von der NO-Bindungsstelle an der N-terminalen Hämgruppe zur C-terminalen katalytischen Domäne der sGC noch weitgehend unbekannt. Eine Kristallisation der nativen sGC ist bislang noch nicht geglückt. Es sind lediglich die Kristallstrukturen von Hämdomänen der Bakterien *Thermoanaerobacter tencongensis* und *Nostoc* bekannt, die eine 19%ige bzw. 33%ige Sequenzhomologie zur Hämbindungsdomäne der sGC aufweisen (Nioche et al., 2004; Pellicena et al., 2004; Ma et al., 2007). Ausgehend von diesen Kristallstrukturen besteht die Möglichkeit, Aminosäuren innerhalb der Hämbindungstasche der sGC zu identifizieren, die an der Signaltransduktion der sGC beteiligt sein könnten oder möglicherweise die Hämbindung beeinflussen. Durch anschließende Charakterisierung dieser Aminosäuren in Mutagenesestudien können weitere Erkenntnisse über die strukturellen Grundlagen der sGC-Aktivierung gewonnen werden.

Eine kürzlich generierte cGMP-Reporterzelle machte zum ersten Mal möglich, direkt in einer intrazellulären Umgebung das Aktivierungsprofil der sGC und das von sGC-Mutanten zu untersuchen (Schmidt et al., 2004; Wunder et al. 2005). Mit Hilfe der cGMP-Reporterzelle wird in lebenden Zellen die cGMP-Produktion als Lumineszenz, angegeben in relativen Lichteinheiten (RLUs), gemessen. Diese RLUs korrelieren direkt mit dem intrazellulären cGMP-Spiegel (Wunder et al., 2005). Mit Hilfe des identifizierten NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulators BAY 41-2272 sowie des NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivators BAY 58-2667 kann direkt in der cGMP-Reporterzelle zwischen hämfreier und hämhaltiger sGC unterschieden werden (Stasch et al., 2002a; Stasch et al., 2002c; Schmidt et al., 2004; Stasch et al., 2006). Ein Vorteil der intrazellulären Untersuchung der sGC liegt darin, dass eine Abspaltung der nicht kovalent gebundenen Hämgruppe durch eine Zellyse und die Aufreinigung umgangen werden (Hönicka et al., 1999). Durch die nicht kovalente Bindung der Hämgruppe der sGC ist es nahezu unmöglich, auch unter optimierten Bedingungen, in aufgereinigten Enzympräparationen 100%ig hämhaltiges Enzym zu erhalten. Dies erschwerte in der Vergangenheit den exakten Hämgehalt der sGC zu bestimmen und führte zeitweise zu einer Kontroverse, ob die sGC eine oder zwei Hämgruppen enthält (Humbert et al., 1990; Stone und Marletta, 1995; Hönicka et al., 1999). Mit Hilfe der cGMP-Reporterzelllinie und der sGC-Modulatoren BAY 41-2272 und BAY 58-

2667 konnten bereits die Ankeraminosäuren der Hämpropionate der sGC, $\beta_1\text{Tyr}_{135}$ und $\beta_1\text{Arg}_{139}$, identifiziert werden (Schmidt et al., 2004). Spektroskopische Untersuchungen und Kristallisationsstudien der zur sGC-Sequenz homologen Häm-domäne des Bakteriums *Thermoanaerobacter tencongensis* sowie Kristallisationsstudien der homologen sGC des Bakteriums *Nostoc* bestätigten dieses Ergebnis und damit auch die Validität dieser Methode (Karow et al., 2004; Nioche et al., 2004; Pellicena et al., 2004; Ma et al., 2007). Bis eine Kristallisation der nativen sGC erfolgt, ist die Charakterisierung von sGC-Mutanten mit Hilfe der cGMP-Reporterzelle in Kombination mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 und dem sGC-Aktivator BAY 58-2667 eine wertvolle Methode, um die strukturellen Grundlagen der sGC-Aktivierung weitergehend zu charakterisieren.

In einem Multisequenzalignment der Häm-bindungsdomäne der sGC verschiedener Spezies wurde sichtbar, dass zwischen den identifizierten Ankeraminosäuren der Hämpropionate, $\beta_1\text{Arg}_{135}$ und $\beta_1\text{Tyr}_{139}$, ein hoch konserviertes Serin lokalisiert ist. Aufgrund der Position und des hohen Konservierungsgrades wurde ein Einfluss von $\beta_1\text{Ser}_{137}$ auf die Häm-bindung vermutet. Um die Bedeutung von $\beta_1\text{Ser}_{137}$ auf die Häm-bindung näher zu untersuchen, wurde $\beta_1\text{Ser}_{137}$ gegen Alanin ausgetauscht und das Aktivierungsprofil der $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC sowohl durch transiente Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie als auch in sGC-Aktivitätsmessungen untersucht. Nach transienter Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie zeigte die $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC ein dem nativen, hämhaltigen Enzym ähnliches Aktivierungsprofil. Die maximale Aktivierbarkeit der $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -Mutante durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und NO war jedoch sowohl alleine als auch in Kombination im Vergleich zum nativen Enzym vermindert. Die konzentrationsabhängige Aktivierung durch BAY 58-2667 war bei $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC und WT-sGC gleichermaßen. Durch Zugabe von ODQ wurde allerdings lediglich die durch BAY-58-2667 induzierte Aktivierung des WT-Enzyms verstärkt. Die Aktivierbarkeit der $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -Mutante durch den NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 belegt, dass die $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC als hämhaltiges Enzym exprimiert wurde. Die im Vergleich zum nativen Enzym verminderte Aktivierbarkeit der $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC durch BAY 41-2272 und DEA/NO ist ein Hinweis auf eine verminderte Häm-bindung. Demgegenüber wies ein 100.000 x g Überstand mit $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC transient transfizierter und lysierter Zellen das typische Aktivierungsprofil hämfreier sGC auf. Weder NO noch der NO-unabhängige, aber Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 waren alleine oder in Kombination in der Lage, die $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC zu stimulieren. ODQ, dessen Wirkung ebenfalls über die Hämgruppe vermittelt wird, konnte die BAY 58-2667-induzierte Enzymaktivierung nicht verstärken. Die Ergebnisse dokumentieren, dass die $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC im 100.000 x g Überstand transient

transfizierter und lysierter Zellen in hämfreier Form vorliegt, im Gegensatz zur in den cGMP-Reporterzellen transient exprimierten $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC. Dies legt nahe, dass durch den Austausch von Serin gegen Alanin die Bindung der prosthetischen Hämgruppe an die sGC geschwächt ist. Demnach erfolgt bei der Lyse der transient transfizierten Zellen ein Verlust der nur schwach gebundenen Hämgruppe. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die durch BAY-58-2667 induzierte Aktivierung innerhalb der cGMP-Reporterzelle ebenfalls durch ODQ nahezu nicht verstärkt wurde. Das sGC-Oxidans ODQ verstärkt die BAY 58-2677-induzierte Enzymaktivierung der WT-sGC, indem ODQ durch Oxidation des zentralen Eisenatoms der prosthetischen Hämgruppe die Verdrängung dieser durch BAY 58-2667 erleichtert. Dadurch wird die Bindungsstelle für BAY 58-2667 leichter zugänglich und somit die Bindung von BAY 58-2667 an die sGC erhöht (Hobbs, 2000; Schmidt et al., 2004; Stasch et al., 2006). BAY 58-2667 verdrängt die oxidierte Hämgruppe der sGC bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich, wohingegen die reduzierte Hämgruppe erst durch millimolare BAY 58-2667 Konzentrationen verdrängt werden kann (Schmidt et al., 2004; Stasch et al., 2006). Da die $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -Mutation die Bindung der Hämgruppe destabilisiert, lässt sich also auch die reduzierte Hämgruppe bereits durch nanomolare Konzentrationen von BAY 58-2667 verdrängen. In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem die Auswirkungen der $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -Mutation auf die Bindungseigenschaften von Protoporphyrin in Rekonstitutionsversuchen mit PPIX, der eisenfreien Vorstufe des Häms, untersucht. Die Untersuchungen lassen erkennen, dass zur Rekonstitution der hämfreien $\beta_1\text{Ser}_{137}\text{Ala}$ -sGC mit PPIX höhere Konzentrationen an PPIX als für die Rekonstitution der hämfreien WT-sGC erforderlich sind. Dies ist somit ein weiterer Hinweis auf eine verminderte Hämbindung der sGC.

Insgesamt legen die Daten nahe, dass ein Austausch von $\beta_1\text{Ser}_{137}$ gegen Alanin die Bindung der Hämgruppe destabilisiert. Demnach formt $\beta_1\text{Ser}_{137}$ gemeinsam mit den Ankeraminosäuren der Hämpropionate das charakteristische sGC-Hämbindungsmotiv Tyr-x-Ser-x-Arg (Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Genau dieses, in der vorliegenden Arbeit identifizierte Hämbindungsmotiv wurde durch die Kristallstrukturen der Hämdomänen der Bakterien *Thermoanaerobacter tencongensis* und *Nostoc* bestätigt, die zur Hämbindungsdomäne der sGC homolog sind (Pellicena et al., 2004; Nioche et al., 2004; Ma et al., 2007)

Um weitere Aminosäuren innerhalb der Hämbindungstasche zu identifizieren, die für die intramolekulare Signaltransduktion oder die Hämbindung der sGC bedeutend sein könnten, wurde, basierend auf der publizierten Kristallstruktur von *Thermoanaerobacter tencongensis* (1 U55.pdb), ein Homologiemodell der Hämbindungsdomäne der sGC angefertigt (Pellicena et al., 2004; Nioche et al., 2004). Anhand des Modells und einem

anschließenden Multisequenzalignment wurden Aminosäuren identifiziert, die aufgrund der Orientierung zur Hämgruppe und ihres hohen Konservierungsgrades für die Koordination der prosthetischen Hämgruppe oder die intramolekulare Signaltransduktion der sGC bedeutend sein könnten. Die ausgewählten Aminosäuren wurden ausgetauscht und das Aktivierungsprofil der Mutanten nach transienter Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie bestimmt.

Anhand der Kristallstruktur von *Thermoanaerobacter tengcongensis* wurde ersichtlich, dass ein Aspartat an Position 45 der β_1 -Untereinheit mit $\beta_1\text{Arg}_{139}$, einer Ankeraminosäure der Hämpropionate, eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann und hierdurch die Positionierung der Hämpropionate beeinflusst (Pellicena et al., 2004; Schmidt et al., 2004). Demnach wird durch Ausbildung dieser Wasserstoffbrückenbindung zwischen $\beta_1\text{Asp}_{45}$ und $\beta_1\text{Arg}_{139}$ wird eine starke Deformierung der Hämgruppe erzeugt (Pellicena et al., 2004). Es wurde postuliert, dass der Deformierungsgrad der Hämgruppe abhängig vom Aktivierungszustand der sGC ist (Pellicena et al., 2004). Daher wäre es möglich, dass die Wasserstoffbrückenbindung zwischen $\beta_1\text{Asp}_{45}$ und $\beta_1\text{Arg}_{139}$ als Schalter zwischen verschiedenen Hämkonformationen und somit Aktivierungszuständen der sGC fungieren kann. Auch das angefertigte Homologiemodell der Hämbindungsdomäne der sGC zeigte, dass $\beta_1\text{Arg}_{139}$ mit $\beta_1\text{Asp}_{45}$ eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen kann. Zusätzlich wurde im anschließenden Multisequenzalignment sichtbar, dass $\beta_1\text{Asp}_{45}$ hoch konserviert ist. Um die Bedeutung von $\beta_1\text{Asp}_{45}$ auf die sGC-Aktivierung zu untersuchen, wurde $\beta_1\text{Asp}_{45}$ gegen Alanin ausgetauscht. Die $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC konnte durch BAY 58-2667 konzentrationsabhängig aktiviert werden, allerdings ohne weitere Verstärkung durch Zugabe von ODQ. Sowohl DEA/NO als auch der Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 waren nicht in der Lage, die $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC zu stimulieren. Interessanterweise konnte jedoch eine Kombination von DEA/NO und BAY 41-2272 die $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC stimulieren. Dies spricht dafür, dass $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC als hämhaltiges Enzym exprimiert wurde. Es ist bekannt, dass sGC-Stimulatoren, wie BAY 41-2272, einerseits die sGC direkt stimulieren und andererseits die Bindung von NO an die sGC verstärken (Stasch et al., 2002a; Schmidt et al., 2003). Die Wiederherstellung der sGC-Aktivierung durch die Kombination des sGC-Stimulators BAY 41-2272 und NO könnte ein Hinweis darauf sein, dass sGC-Stimulatoren über einen ähnlichen Mechanismus wie $\beta_1\text{Asp}_{45}$ wirken und hierdurch die NO-induzierte Aktivierung modulieren. Insgesamt belegen die Ergebnisse, dass $\beta_1\text{Asp}_{45}$ die Häm-vermittelte sGC-Aktivierung beeinflusst. Die Hypothese wird auch durch die erst kürzlich publizierten Kristallstrukturen der freien und NO-gebundenen Häm-domäne des Bakteriums *Nostoc*, welches zur sGC-Sequenz homolog ist, unterstützt. Anhand dieser Strukturen wird

ebenfalls postuliert, dass $\beta_1\text{Asp}_{45}$ für die Häm-vermittelte sGC-Aktivierung bedeutend sein könnte (Ma et al., 2007). Es sind allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig, um die Bedeutung von $\beta_1\text{Asp}_{45}$ auf die sGC-Aktivierung vollständig zu charakterisieren.

Das angefertigte Multisequenzalignment ließ zusätzlich erkennen, dass direkt neben $\beta_1\text{Asp}_{45}$ an Position 44 der β_1 -Untereinheit ebenfalls ein weiteres hoch konserviertes Aspartat lokalisiert ist. Um die Bedeutung des direkt neben $\beta_1\text{Asp}_{45}$ positionierten, konservierten $\beta_1\text{Asp}_{44}$ auf die sGC-Aktivierung zu untersuchen, wurde $\beta_1\text{Asp}_{44}$ gegen Alanin ausgetauscht und das Aktivierungsprofil der $\beta_1\text{Asp}_{44}\text{Ala}$ -sGC nach transienter Transfektion in die cGMP-Reporterzelle charakterisiert. Der Austausch von $\beta_1\text{Asp}_{44}$ gegen Alanin erzeugte ein Enzym, welches das typische Aktivierungsprofil hämfreier sGC aufwies. Das Enzym war sowohl durch BAY 41-2272 als auch durch NO, alleine oder in Kombination, nicht stimulierbar. Die BAY 58-2667-induzierte Enzymaktivierung konnte durch Zugabe von ODQ nicht verstärkt werden. Um auszuschließen, dass die eingeführte Mutation die Proteinexpression beeinflusst, wurden Expressionsstudien durchgeführt. Diese belegten, dass die Expression der $\beta_1\text{Asp}_{44}\text{Ala}$ -sGC im Vergleich zum nativen Enzym unverändert ist. Demnach ist das beobachtete Aktivierungsprofil ein Hinweis dafür, dass $\beta_1\text{Asp}_{44}\text{-Ala}$ -sGC in hämfreier Form exprimiert wurde. Allerdings ist zu bedenken, dass $\beta_1\text{Asp}_{44}$ in direkter Nachbarschaft zu $\beta_1\text{Asp}_{45}$, welches bedeutend für den sGC-Aktivierungsmechanismus ist, lokalisiert ist. Es könnte daher auch vermutet werden, dass $\beta_1\text{Asp}_{44}$ den Häm-medierten Aktivierungsprozess der sGC beeinflusst.

In der Literatur wird postuliert, dass die bevorzugte Bindung von NO und ein Ausschluss einer O_2 -Bindung der prosthetischen Hämgruppe der sGC durch die hydrophobe Aminosäurestruktur der Hämbindungstasche bedingt ist (Boon et al., 2005a; Boon und Marletta, 2005b, 2005c). Für verschiedene Hämproteine, unter anderem das O_2 -bindende Myoglobin, wurde bereits eine Regulation und eine Selektion der Ligandenbindung durch die Struktur der Hämbindungstasche beschrieben (Olson und Phillips, 1996; Phillips et al., 1999; Spiro und Jarzecki, 2001; Gong et al., 2000; Jain und Chan, 2003). Ebenfalls wurde für das O_2 -bindende Hämoglobin eine Stabilisierung der O_2 -Bindung durch ein polares Tyrosin in der Hämbindungstasche gezeigt (Weber und Vinogradov, 2001). Anhand der Kristallstruktur der O_2 -gebundenen Häm-domäne des zur sGC-Sequenz homologen Bakteriums *Thermoanaerobacter tencongensis* wurde deutlich, dass dessen O_2 -Bindung durch ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk, bestehend aus Asn_{74} und Gln_9 sowie einem polaren Tyr_{140} , stabilisiert wird (Pellicena et al., 2004). Spektroskopische Studien der isolierten Häm-bindungsdomäne (β_1 1-385) der sGC zeigten, dass die Einführung eines polaren

Tyrosins in die hydrophobe, distale Hämbindungstasche eine Bindung von O₂ an die Hämgruppe der sGC ermöglicht (Boon et al., 2005a; Boon und Marletta, 2005b, 2005c). Daher wurde vermutet, dass die Aminosäuren Asn₇₄, Gln₉ und insbesondere das polare Tyr₁₄₀ für die Diskriminierung zwischen einer O₂- und NO-Bindung verantwortlich sind (Boon et al., 2005a; Boon und Marletta, 2005b, 2005c). In der NO-bindenden sGC sind diese Aminosäuren durch Ile₁₄₅, Phe₇₄ und Leu₉ ersetzt. Um den Einfluss dieser Aminosäuren auf die NO-Bindung des vollständigen, intrazellulären Enzyms zu untersuchen, wurden β₁Ile₁₄₅ und β₁Phe₇₄ ausgetauscht und das Aktivierungsprofil der Mutanten nach transienter Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie charakterisiert. Austausch von Leu₉ führte zu einem Verlust der Proteinexpression. Daher wurde diese Mutante nicht weitergehend untersucht.

Austausch von β₁Phe₇₄ gegen Alanin resultierte in einem Enzym, das das typische Aktivierungsprofil hämfreier sGC aufwies. Weder der Häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 noch DEA/NO waren alleine oder in Kombination in der Lage, die β₁Phe₇₄Ala-sGC zu stimulieren. Im Gegensatz dazu zeigte eine β₁Phe₇₄Tyr-sGC-Mutante, die generiert wurde, um den Einfluss des Aromaten auf die sGC-Aktivierung zu untersuchen, ein Aktivierungsprofil, welches dem nativen Enzym vergleichbar war. Allerdings war ebenfalls die BAY 41-2272 und NO-induzierte Stimulation der β₁Phe₇₄Tyr-sGC im Vergleich zum nativen Enzym vermindert. Die Ergebnisse zeigen, dass β₁Phe₇₄ bedeutend für die Häm-vermittelte sGC-Aktivierung ist. Anhand der dreidimensionalen Struktur des Homologiemodells der sGC-Hämbindungsdomäne ist ersichtlich, dass β₁Phe₇₄ auf der distalen Seite der Hämbindungstasche, direkt gegenüber von β₁His₁₀₅, lokalisiert ist. Durch NO-Bindungsmodelle wird nahe gelegt, dass die NO-Bindung an der distalen Seite der Hämgruppe erfolgt (Zhao et al., 1999; Ballou et al., 2002; Cary et al., 2005). Vor diesem Hintergrund kann eine Bedeutung von β₁Phe₇₄ für die NO-vermittelte sGC-Aktivierung postuliert werden. Die erst kürzlich veröffentlichte Kristallisationsstudie der Häm-domäne des NO-bindenden Cyanobakteriums *Nostoc*, welches 33% Sequenzhomologie zur sGC aufweist, unterstützt diese Hypothese. So wurde anhand der NO-gebundenen Kristallstruktur von *Nostoc* gezeigt, dass ein Aromat in Position 74 als molekularer Schalter für die Ausbildung eines fünffach koordinierten NO-Häm-Komplexes fungieren könnte (Ma et al., 2007). Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass β₁Phe₇₄ bedeutend für die Häm-vermittelte sGC-Aktivierung ist, indem es die Umwandlung des sechsfach koordinierten inaktiven Histidin-Häm-NO-Intermediats in den fünffach koordinierten aktivierten Nitrosyl-Häm-Komplex unterstützt (Ma et al., 2007).

Der Austausch des hydrophoben β₁Ile₁₄₅, welches zum polaren Tyr₁₄₀ in *Thermoanaerobacter tencongensis* homolog ist, gegen ein Tyrosin resultierte in keiner

deutlichen Veränderung des Aktivierungsprofils der $\beta_1\text{Ile}_{145}\text{Tyr-sGC}$ im Vergleich zum nativen, hämhaltigen Enzym. Die Aktivierung der $\beta_1\text{Ile}_{145}\text{Tyr-sGC}$ war sowohl durch die sGC-Modulatoren BAY 41-2272 und BAY 58-2667 als auch durch NO im Vergleich zur WT-sGC unverändert. In den durchgeführten Untersuchungen wurden im Verhältnis zum Sauerstoffgehalt der Raumluft nur sehr geringe NO-Konzentrationen (10 nM) verwendet. Daher wurde erwartet, dass die Einführung des in der Literatur postulierten „NO/O₂-Schalters“ ein verändertes Aktivierungsprofil der $\beta_1\text{Ile}_{145}\text{Tyr-sGC}$ durch NO zur Folge hat. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Einführung eines polaren Tyrosins in die Hämbindungsstasche der sGC keine deutliche Auswirkung auf deren Aktivierungsprofil hat. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu veröffentlichten Untersuchungen an der isolierten Hämbindungsdomäne ($\beta_1\text{1-385}$) der sGC. In diesen wird anhand spektroskopischer Daten dokumentiert, dass ein Austausch von Ile_{145} gegen Tyrosin in einer O₂-Bindung an der Hämgruppe resultiert (Boon et al., 2005a; Boon und Marletta, 2005b, c). Es muss jedoch beachtet werden, dass in diesen Publikationen lediglich die Bindungseigenschaften der isolierten Hämbindungsdomäne ($\beta_1\text{1-385}$) der sGC untersucht wurden und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, das Aktivierungsprofil des vollständigen Enzyms. Auch zeigt der publizierte K_D-Wert von 70 mM für die O₂-Bindung der isolierten $\beta_1\text{Ile}_{145}\text{Tyr-sGC}$ Hämdomäne, dass die O₂-Bindung an diese sGC-Mutante relativ schwach ist (Boon et al., 2005a). Es ist daher unklar, ob eine O₂-Bindung an das native, vollständige Enzym überhaupt erfolgt. Im physiologischen Milieu ist im Durchschnitt viermal mehr O₂ als NO vorhanden. Um in einer solchen Umgebung bevorzugt NO zu binden, wurde die Hämbindungsstasche der sGC durch die Evolution so optimiert, dass keine O₂-Bindung erfolgen kann und die NO-Bindung erleichtert wird. Daher reicht wahrscheinlich allein die Einführung eines polaren Tyrosins in die distale Hämbindungsstasche der sGC allein nicht aus, die sGC in ein O₂-bindendes Enzym umzuwandeln. Die Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die zur sGC-Sequenz homologe, NO-bindende Hämdomäne von *Clostridium botulinum* nicht in der Lage ist, O₂ zu binden, obwohl ein polares Tyrosin in der distalen Hämbindungsstasche vorhanden ist (Nioche et al., 2004). Eine parallel zu dieser Arbeit von Martin und Mitarbeitern durchgeführte Untersuchung der vollständigen $\alpha_1/\beta_1\text{Ile}_{145}\text{Tyr-sGC}$ bestätigte die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse (Martin et al., 2006; Rothkegel et al., 2006). Auch in dieser Studie konnte sowohl spektroskopisch als auch in sGC-Aktivitätsmessungen keine O₂-Bindung der vollständigen $\alpha_1/\beta_1\text{Ile}_{145}\text{Tyr-sGC}$ nachgewiesen werden (Martin et al., 2006).

Rekonstitutionsuntersuchungen der hämfreien sGC mit Hämderivaten, deren Vinylgruppen gegen weniger hydrophobe oder geladene Gruppen ausgetauscht wurden, zeigen, dass diese Hämderivate nicht in der Lage sind, an die sGC zu binden (Ignarro et al., 1984). Um

zu untersuchen, ob die Vinylgruppen des Häms die Aktivierung der sGC durch hydrophobe Interaktionen mit Aminosäuren der Hämbindungstasche beeinflussen, wurden anhand des angefertigten Homologiemodells Aminosäuren ausgewählt, die durch ihre Lage mit den Vinylgruppen interagieren könnten. Die Aminosäuren wurden gegen Alanin ausgetauscht und das Aktivierungsprofil der sGC-Mutanten nach transienter Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie bestimmt. Ein Austausch der konservierten Phenylalanine in Position 70, 75 und 77 sowie der konservierten Isoleucine in Position 149 und 150 hatte keine Veränderung des Aktivierungsprofils der untersuchten Mutanten im Vergleich zum WT-Enzym zur Folge. Das Ergebnis lässt vermuten, dass die Vinylgruppen nicht am intramolekularen Aktivierungsprozess der sGC beteiligt sind, obwohl diese die Bindung der prosthetischen Hämgruppe an die sGC beeinflussen. Ähnliche Eigenschaften der Hämvinyle wurden bereits für andere hämhaltige Proteine beschrieben. So belegten strukturelle Untersuchungen der Proteinkinase FixL, dass die Vinylgruppen des Häms zwar die Bindung der Hämgruppe an die Proteinkinase FixL unterstützen, aber deren Regulation nicht beeinflussen (Gong et al., 2000).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass $\beta_1\text{Asp}_{44}$, $\beta_1\text{Asp}_{45}$ und $\beta_1\text{Phe}_{74}$ an der Regulation der Häm-vermittelten Aktivierung der sGC beteiligt sind. Das beobachtete Aktivierungsprofil der $\beta_1\text{Asp}_{45}\text{Ala}$ -sGC untermauert die Hypothese, dass $\beta_1\text{Asp}_{45}$ als Schalteraminosäure der Häm-vermittelten sGC-Aktivierung fungieren kann. Ebenfalls konnten wir am vollständigen Enzym demonstrieren, dass die Einführung einer polaren Aminosäure in die Hämbindungstasche der sGC nicht ausreicht, die sGC in ein O_2 -bindendes Enzym umzuwandeln. Die Untersuchungen lassen auch erkennen, dass die Vinylgruppen der prosthetischen Hämgruppe für die Aktivierung der sGC wahrscheinlich keine Rolle spielen. Es wäre wünschenswert, wenn diese Ergebnisse in naher Zukunft durch Kristallisationsstudien mit der nativen sGC bestätigt würden. Bis eine Kristallisation der sGC erfolgt, ist die Charakterisierung von sGC-Mutanten mit Hilfe der cGMP-Reporterzelle in Kombination mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 und dem sGC-Aktivator BAY 58-2667 eine wertvolle Methode, um die strukturellen Grundlagen der sGC-Regulation näher zu charakterisieren.

4.2 BiFC-Untersuchungen zur Dimerisierung der sGC

Die Dimerisation von Proteinen führt meistens zu einer Veränderung der Affinität zum Liganden, einer Änderung der Lokalisation und/oder einer Änderung der enzymatischen Aktivität (Luttrell, 2006). Es ist bekannt, dass die Dimerisation coexprimierter α_1 -sGC und β_1 -sGC zur Bildung katalytisch aktiver sGC zwingend erforderlich ist (Harteneck et al., 1990; Zabel et al., 1998). Alle Versuche durch Kombination individuell exprimierter α_1 -sGC und β_1 -

sGC ein funktionell aktives α_1/β_1 -sGC Heterodimer herzustellen, blieben bislang erfolglos (Harteneck et al., 1990; Zabel et al., 1998). In vielen Publikationen wurden die molekularen Mechanismen der sGC-Aktivierung untersucht (Wedel et al., 1994; Schmidt et al., 2004; Boon et al., 2005a; Schmidt et al., 2005; Rothkegel et al., 2006). Demgegenüber hat man sich mit den strukturellen Grundlagen der Heterodimerisation von α_1 -sGC und β_1 -sGC sowie den Konsequenzen für die Bildung eines funktionell aktiven Enzyms wenig beschäftigt. Vor mehr als einem Jahrzehnt wurde postuliert, dass die vor der katalytischen Domäne lokalisierte Aminosäuresequenz β_1 340-385 für die Heterodimerisation der sGC-Untereinheiten verantwortlich sein könnte. Diese Hypothese basierte auf der Ähnlichkeit dieser Sequenz zur Dimerisierungsdomäne der GC-A. Ferner wurde diese Annahme durch Untersuchungen unterstützt, die zeigten, dass eine sGC-Mutante, welche die Aminosäuren 1-385 der β_1 -Untereinheit codierte, in der Lage ist, Homodimere zu bilden (Wilson und Chinkers, 1995; Zhao und Marletta, 1997). Nachfolgende Kopräzipitationsuntersuchungen der sGC-Untereinheiten identifizierten eine Beteiligung der Aminosäuresequenzen α_1 61-128, α_1 367-462, α_1 421-454, β_1 204-244 und β_1 379-408 an der Heterodimerisation der α_1/β_1 -sGC (Zhou et al., 2004; Shiga und Suzuki, 2005; Wagner et al., 2005).

Um die in der Literatur beschriebenen Interaktionspunkte der α_1 - und β_1 -sGC weitergehend zu charakterisieren, und neue Dimerisierungsregionen zu identifizieren, wurde die α_1/β_1 -sGC Heterodimerisation erstmalig direkt in lebenden Zellen mit Hilfe der kürzlich entwickelten Methode der BiFC untersucht. Die Methode basiert darauf, dass zwei nichtfluoreszierende Fragmente des YFP eine Fluoreszenz aussenden, wenn diese durch ihre Fusionspartner, in der vorliegenden Arbeit α_1 -sGC und β_1 -sGC, in räumliche Nähe kommen (Hu et al., 2002; Kerppola 2006 a, 2006b). Hierdurch ist es möglich, die Heterodimerisation der sGC direkt in einer intrazellulären Umgebung zu untersuchen. Die YFP-Fragmente gehen selbst keine Komplexbildung ein, jedoch stabilisieren sie den gebildeten Komplex (Hu et al., 2002). Die Stabilisierung ermöglicht auf der einen Seite, durch BiFC auch transiente Komplexe oder schwache Interaktionen zu detektieren, auf der anderen Seite birgt dies allerdings die Gefahr unspezifischer Proteininteraktionen (Hu et al., 2002; Ozalp et al., 2005). Um eine unspezifische Komplexbildung der sGC-Untereinheiten und damit falsche positive Ergebnisse möglichst auszuschließen, wurden die Expressionslevel dahingehend optimiert, dass keine unspezifische Fluoreszenz der unfusionierten YN- und YC-Fragmente auftrat. Die Kombination der BiFC-Methode mit der cGMP-Reporterzelllinie ermöglicht, neben der Untersuchung des Dimerisationsstatus, zusätzlich das Aktivierungsprofil von sGC-Mutanten direkt in einer cytosolischen Umgebung ohne weitergehende Aufreinigungsprozesse zu untersuchen (Hu et al., 2002; Schmidt et al., 2004; Wunder et al., 2005).

Es wird vermutet, dass α_1 -sGC und β_1 -sGC einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen (Iyer et al., 2003). Außerdem wurde publiziert, dass beide sGC-Untereinheiten

sowohl Homo- als auch Heterdimere ausbilden können (Zabel et al., 1999). Dies deutet an, dass in beiden sGC-Untereinheiten Segmente vorhanden sind, die für die Dimerisierung verantwortlich sind. Sequenzen, die regulatorische Bereiche eines Proteins codieren, sind meist hoch konserviert. Aus diesem Grund wurde ein Multisequenzalignment der vermeintlichen Dimerisierungsdomänen der α_1 - und der β_1 -sGC erstellt, um konservierten Aminosäureregionen zu identifizieren. Diese wurden systematisch deletiert und die generierten Deletionsmutanten mittels transienter Transfektion in die cGMP-Reporterzelllinie charakterisiert. Die Untersuchung des Dimerisationszustandes und des Aktivierungsprofils verschiedener Deletionsmutanten innerhalb der konservierten Bereiche ergab, dass Coexpression der Deletionsmutanten $\alpha_1(\Delta 283-293)$, $\alpha_1(\Delta 373-382)$, $\alpha_1(\Delta 383-392)$, $\alpha_1(\Delta 393-402)$, $\alpha_1(\Delta 460-469)$, $\alpha_1(\Delta 470-479)$ mit β_1 -sGC und $\beta_1(\Delta 334-343)$, $\beta_1(\Delta 401-410)$ sowie $\beta_1(\Delta 411-420)$ mit α_1 -sGC in einer Fluoreszenz resultierte, die der undeletierten nativen α_1/β_1 -sGC vergleichbar war. Die beobachtete Fluoreszenz belegt, dass die Deletionsmutanten in der Lage sind zu dimerisieren und daher die deletierten Aminosäuren nicht an der Interaktion von α_1/β_1 -sGC beteiligt sind. Im Gegensatz zur undeletierten sGC und zu den meisten Deletionsmutanten, die im gesamten Cytosol der Zelle lokalisiert waren, zeigten die Deletionsmutanten $\alpha_1(\Delta 393-402)$, $\beta_1(\Delta 334-343)$ und $\beta_1(\Delta 411-420)$ eine inhomogene Verteilung. Der Unterschied in der subzellulären Lokalisation könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Deletion dieser Aminosäuren eine Fehlfaltung der Proteine verursacht. Die wiederum zu einer Aggregation der Proteine und damit zu unspezifischen BiFC-Signalen führen könnte (Ozalp et al., 2005). In den angefertigten Western Blots war jedoch keine Veränderung der Expression sichtbar. Außerdem hatte die Deletion von $\alpha_1(\Delta 393-402)$ und $\beta_1(\Delta 334-343)$ keinen deutlichen Einfluss auf die funktionelle Aktivität des Enzyms. Dies deutet an, dass die Untersuchungen zur Heterodimerisation mittels BiFC nicht negativ beeinflusst wurden.

Demgegenüber führte die Deletion der Aminosäuresegmente $\alpha_1 363-372$, $\alpha_1 403-412$, $\alpha_1 413-422$, $\alpha_1 440-449$, $\alpha_1 450-459$, $\beta_1 212-221$, $\beta_1 304-313$, $\beta_1 314-323$, $\beta_1 324-333$, $\beta_1 344-353$, $\beta_1 354-363$, $\beta_1 381-390$ und $\beta_1 391-400$ zu einem Verlust der Fluoreszenz. Um auszuschließen, dass der beobachtete Verlust des Fluoreszenzsignals durch eine verminderte Expression der Deletionsmutanten bedingt ist, wurde der Expressionsstatus mittels Western Blots überprüft. Die Untersuchung zeigte, dass die Expression aller Deletionsmutanten auf vergleichbarem Niveau war. Demzufolge wird der beobachtete Verlust der Fluoreszenz der Deletionsmutanten vermutlich durch eine beeinträchtigte Dimerisierung hervorgerufen wird.

Von den Deletionsmutanten, die eine Fluoreszenz zeigten, wiesen $\alpha_1 283-292$, $\alpha_1 373-382$, $\alpha_1 383-392$, $\alpha_1 393-402$ und $\beta_1 334-343$ ein Aktivierungsprofil auf, das der undeletierten sGC

vergleichbar war. Die funktionelle Aktivität der Deletionsmutanten bestätigt das BiFC-Ergebnis, wonach diese Aminosäurebereiche nicht an der Heterodimerisierung von α_1/β_1 -sGC beteiligt sind. Im Gegensatz hierzu zeigten die Deletionsmutanten $\alpha_1(\Delta 460-469)$, $\alpha_1(\Delta 470-479)$, $\beta_1(\Delta 401-410)$ sowie $\beta_1(\Delta 411-420)$ zwar eine Fluoreszenz, konnten aber nicht durch BAY 41-2272, BAY 58-2667 alleine oder in Kombination mit DEA/NO oder ODQ aktiviert werden. Da die deletierten Aminosäuren nicht die Dimerisierung der sGC modulieren, könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass sie die sGC-Aktivierung beeinflussen. Die Deletion der Aminosäuren $\alpha_1 393-403$ und $\beta_1 334-343$ führte zu Enzymen, die durch den Häm-abhängigen sGC-Aktivator BAY 41-2272 nur in Gegenwart von DEA/NO stimuliert werden konnten. Die BAY-58-2667-induzierte Aktivierung der Deletionsmutanten war ebenfalls im Vergleich zum nativen Enzym vermindert und wurde durch Zugabe von ODQ nicht verstärkt. Demgegenüber war die maximale Stimulierung von $\alpha_1(\Delta 283-293)$ und $\alpha_1(\Delta 373-382)$ durch BAY 41-2272 alleine oder in Kombination mit DEA/NO im Vergleich zum nativen Enzym verstärkt. In Western Blots wurde keine beeinträchtigte Expression der untersuchten Deletionsmutanten festgestellt. Die veränderte Aktivität der Deletionsmutanten im Vergleich zum nativen Enzym könnte andeuten, dass die Aminosäureregionen die sGC-Aktivierung beeinflussen. Andererseits könnten die Deletionen auch zu einer gestörten Proteinfaltung geführt haben, zu einer beeinträchtigten Formierung des katalytischen Zentrums der sGC und damit zu Veränderungen in der sGC-Aktivierung. Deletion der Aminosäuresegmente $\alpha_1 363-372$, $\alpha_1 403-422$, $440-459$ sowie $\beta_1 212-222$, $\beta_1 304-333$, $\beta_1 344-363$ und $\beta_1 381-400$ führte neben einem Verlust der Fluoreszenz auch zu einer beeinträchtigten sGC-Aktivierung. Dies legt nahe, dass diese Aminosäuresegmente die Heterodimerisierung von α_1/β_1 -sGC beeinflussen. Eine Übersicht ist dazu in Abbildung 3.21 unter Ergebnisse gegeben.

In Publikationen ist eine Beteiligung der Aminosäuresequenzen $\alpha_1 61-128$, $\alpha_1 367-462$, $\alpha_1 421-454$, $\beta_1 204-244$, $\beta_1 340-385$ und $\beta_1 379-408$ an der Heterodimerisation der sGC-Untereinheiten beschrieben worden (Wilson und Chinkers, 1995; Zhao und Marletta, 1997; Zhou et al., 2004; Shiga und Suzuki, 2005; Wagner et al., 2005).

Hinsichtlich der α_1 -Untereinheit der sGC ließen verschiedene Mutagenese- und Kopräzitationsstudien von Deletionsmutanten erkennen, dass hauptsächlich die mittlere Region ($\alpha_1 367-469$) die Dimerisierung von α_1/β_1 -sGC vermittelt (Shiga und Suzuki, 2005; Wagner et al., 2005). In guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte auch die BiFC-Untersuchung von Deletionsmutanten in lebenden Zellen, bei denen kleine Bereiche der zentralen Region deletiert wurden, dass diese Region für die Heterodimerisation der sGC verantwortlich ist. Die Analyse zeigte, dass hauptsächlich die Aminosäuresequenzen $\alpha_1 363-372$ und $\alpha_1 403-422$ und $\alpha_1 440-459$ die α_1/β_1 -sGC Interaktion vermitteln. Dies legt

einen diskontinuierlichen Aufbau der α_1 -Dimerisierungsregion nahe. Solch eine Struktur der α_1 -Dimerisierungsdomäne wurde bereits in Analogie zu dem identifizierten Dimerisierungsmodul der β_1 -sGC, bestehend aus einer N-terminalen (α_1 271-312) und C-terminalen Bindungsstelle (α_1 438-467), postuliert (Zhou et al., 2004). Eine Analyse der Dimerisierungsregion der α_1 -sGC des Medaka-Fisches belegte, dass die postulierte C-terminale Bindungsstelle die Heterodimerisierung α_1/β_1 -sGC vermittelt (Shiga und Suzuki, 2005). Demgegenüber zeigte dieselbe Studie, dass die vermeintliche N-terminale Bindungsstelle nicht an der Dimerisierung der α_1 -sGC involviert ist, jedoch die Aktivierung der sGC beeinflusst. (Shiga und Suzuki, 2005). Hinsichtlich der N-terminalen Bindungsstelle zeigte die BiFC-Untersuchung kleinerer Deletionsmutanten ebenfalls, dass Deletion des konservierten Aminosäuresegments α_1 283-292 innerhalb der postulierten N-terminalen Dimerisierungsregion keinen Einfluss auf die Interaktion von α_1/β_1 -sGC besitzt. Allerdings wurde im Gegensatz zu der Analyse von Shiga und Suzuki festgestellt, dass eine Deletion von α_1 283-292 die funktionelle Aktivität der α_1/β_1 -sGC nicht beeinträchtigt. Das widersprüchliche Ergebnis könnte dadurch begründet sein, dass Shiga und Suzuki die N-terminale Bindungsstelle der sGC mit Hilfe einer N-terminalen Deletionsmutante untersucht haben, bei der die ersten 322 Aminosäuren (entspricht Aminosäuren 1-312 in der Sequenz der Ratten-sGC) deletiert waren, während in der BiFC-Studie lediglich die Aminosäuren α_1 283-292 deletiert waren. Trunkierung großer Aminosäurebereiche wie in der von Shiga und Suzuki untersuchten Deletionsmutante können zu Fehlfaltungen führen und somit zu einer veränderten Anordnung des katalytischen Zentrums. Andererseits könnten im Rahmen der Deletion von α_1 1-322 auch Aminosäuren β_1 deletiert worden sein, die für eine funktionelle Enzymaktivität wichtig sind. Die letzte Hypothese wird dadurch untermauert, dass Untersuchungen an der humanen sGC einen Einfluss der Aminosäuren α_1 259-364, entsprechend α_1 260-365 in der Ratten-sGC, auf die funktionelle Aktivität der sGC zeigten (Koglin und Behrends, 2003). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass in der α_1 1-322 Deletionsmutante der Medaka-Fisch-sGC Aminosäuren, die für die funktionelle Enzymaktivität bedeutend sind, fehlten.

Hinsichtlich der C-terminalen Bindungsstelle wurde anhand von Protein-Struktur-Vorhersage-Programmen gezeigt, dass diese vermutlich eine amphipathische α -Helix Struktur ausbildet, deren Amphipathie vorwiegend durch konservierte Leucine vermittelt wird. In der Literatur wird häufig eine Beteiligung von amphipathischen α -Helix Strukturen an Protein Interaktionen beschrieben. Daher wurde postuliert, dass die amphipathische α -Helix Struktur bedeutend für die α_1/β_1 -Dimerization ist (Shiga und Suzuki, 2005). Weitergehende Untersuchungen der vermeintlichen α -Helix Struktur durch Punktmutationen legten nahe, dass die hauptsächlich durch Leucine modulierte Amphipathie der α -Helix bedeutend für die

sGC Dimerisierung ist (Shiga und Suzuki, 2005). Außerdem zeigten diese Untersuchungen, dass ein konserviertes Leucin in Position 463 der Medaka-Fisch-sGC essentiell für eine korrekte Dimerbildung ist (Shiga und Suzuki, 2005). In der Ratten-sGC, die in den BiFC-Untersuchungen verwendet wurde, wird vermutlich eine amphipathische α -Helix durch das Aminosäuresegment α_1 420-454 geformt, in welchem auch das zu Leu₄₆₃ homologe Leucin Leu₄₅₃ lokalisiert ist. In guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen von Shiga und Suzuki zeigten die Resultate der BiFC-Untersuchung in lebenden Zellen ebenfalls, dass eine Veränderung der Amphipathie der vermeintlichen α -Helix durch Deletion der Aminosäuren α_1 440-449 und α_1 450-459 zu einem Verlust der α_1/β_1 -Dimerisierung führt.

Auf Grund einer Kopräzipitationsanalyse der α_1 -sGC-Untereinheit der Rinder-sGC wurde eine Beteiligung der Aminosäuren 61-128 des N-Terminus der α_1 -sGC an der Dimerisierung und damit Bildung funktionell aktiver sGC postuliert (Wagner et al., 2005). Jedoch belegte dieselbe Studie in guter Übereinstimmung mit einer weiteren Studie, dass in weitergehenden Deletionsmutanten des N-Terminus der α_1 -sGC die Basalaktivität der sGC erhalten bleibt (Wedel et al., 1995; Wagner et al., 2005). Auch ist der Sequenzabschnitt nicht konserviert. Interessanterweise wurde an der humanen sGC gezeigt, dass die Deletion der Aminosäuren 1-289 des N-Terminus der α_1 -Untereinheit keine Auswirkung auf das Aktivierungsprofil der sGC hat (Koglin und Behrends, 2003). Ebenfalls dokumentierte die Untersuchung der Dimerisierungsdomäne der α_1 -sGC des Medaka-Fisches, dass dieser Aminosäurebereich nicht an der Dimerisation der sGC beteiligt ist (Shiga und Suzuki, 2005). Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse der vorliegenden Analyse, dass das Dimerisierungsmodul der α_1 -sGC eine diskontinuierliche Anordnung aufweist und die α_1/β_1 -sGC Dimerisierung zum Teil durch eine amphipathische α -Helix Struktur vermittelt wird (Zhou et al., 2004; Shiga und Suzuki, 2005).

Hinsichtlich der β_1 -sGC zeigte eine Kopräzipitationsstudie, dass die Sequenzen β_1 204-408 die sGC Heterodimerisation beeinflussen (Zhou et al., 2004). Weitergehende Untersuchungen dieser Region identifizierten zwei separate Bindungsmodule der β_1 -sGC mit der α_1 -sGC: eine N-terminale Bindungsstelle (β_1 204-244) und eine C-terminale Bindungsstelle (β_1 379-408) (Zhou et al., 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten BiFC-Untersuchungen in lebenden Zellen ließen erkennen, dass die Aminosäuren β_1 212-222, β_1 304-333, β_1 344-363 und β_1 381-400 die Dimerisation von α_1/β_1 -sGC beeinflussen. Demnach unterstützen diese BiFC-Ergebnisse die auf der Basis der publizierten Untersuchung generierte Vermutung, dass die sGC-Interaktion über ein diskontinuierliches Bindungsmodul innerhalb der Aminosäureregion β_1 204-408 erfolgt (Zhou et al. 2004). Des Weiteren bestätigen die BiFC-Untersuchungen, dass die identifizierte N-terminale und C-terminale Bindungsstelle die Heterodimerisation der sGC unterstützen. Allerdings legt auch

die BiFC-Analyse nahe, dass zusätzlich zu diesen Bindungsstellen die Aminosäuren β_1 304-333 und β_1 344-363 eine Rolle in der sGC-Heterodimerisierung spielen.

Basierend auf der Dimerisationsstudie der α_1 -sGC des Medaka-Fisches, wurde auch für die β_1 -Untereinheit vermutet, dass die Dimerisation hauptsächlich durch eine amphipathische α -Helix Struktur vermittelt wird (Shiga und Suzuki, 2005). In der Ratten-sGC wird diese Tertiärstruktur wahrscheinlich durch die Aminosäuren β_1 367-395 gebildet (Shiga und Suzuki, 2005). Eine Beeinträchtigung der α -Helix Struktur durch Deletion von β_1 381-400 führte in den BiFC-Untersuchungen - in guter Übereinstimmung zu diesem Postulat - zu einem Verlust der Dimerisation. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der BiFC-Untersuchung der β_1 -Dimerisationsregion die Beobachtung, dass diese eine diskontinuierliche Struktur besitzt. Außerdem bestätigen die BiFC-Resultate die Hypothese, dass diese eine amphipathische α -Helix Struktur enthält.

BiFC ermöglicht es, neben der Charakterisierung des Dimerisationszustandes, auch die subzelluläre Verteilung dimerisierter, funktionell aktiver sGC aufzuzeigen. Publierte Untersuchungen dokumentieren, dass die sGC in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes teilweise an der Membran lokalisiert ist (Zabel et al., 2002; Veltman et al., 2005; Yetik-Anacak und Catravas, 2006). Demgegenüber erfolgte in den vorliegenden Untersuchungen die Expression dimerisierter und somit funktionell aktiver sGC hauptsächlich im Cytosol. Da mittels BiFC nicht der Aktivierungszustand, sondern der Dimerisationszustand untersucht wird, ist im Rahmen dieser Arbeit eine eigenständige Untersuchungsreihe durchgeführt worden, um die subzelluläre Lokalisation der sGC in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes näher zu untersuchen (siehe 4.3).

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der BiFC-Untersuchungen, dass die Aminosäuren α_1 363-372, α_1 403-422, α_1 440-459, β_1 212-222, β_1 304-333, β_1 344-363 sowie β_1 381-400 die Heterodimerisation der α_1/β_1 -sGC beeinflussen und somit die Dimerisation der α_1/β_1 -sGC über ein diskontinuierliches Bindungsmodul vermittelt wird. Außerdem unterstützen die Ergebnisse die Voraussage, dass eine amphipathische α -Helix Struktur die sGC-Heterodimerisation und die Bildung eines funktionell aktiven Dimers beeinflusst.

4.3 Subzelluläre Lokalisation der sGC

Eine Veränderung der subzellulären Lokalisation von Enzymen erfolgt meist in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand oder durch spezifische Cofaktoren. In publizierten Untersuchungen wurde gezeigt, dass die ubiquitär exprimierte α_1/β_1 -sGC nicht rein im Cytosol der Zelle lokalisiert ist, sondern sich in Gegenwart von Ca^{2+} sowie in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes an die Membran translokalisiert (Zabel et al., 2002; Veltman et al., 2005; Yetik-Anacak und Catravas, 2006). Außerdem ist bekannt, dass die vorwiegend im

Gehirn exprimierte α_2/β_1 -sGC über PSD-95, welches auch die eNOS bindet, an der Membran assoziiert ist (Russwurm et al., 2001). Eine Translokation der sGC an die Membran könnte auch erklären, weshalb das reaktive Molekül NO, das durch die eNOS in der Membran gebildet wird, fast vollständig an die sGC bindet und nicht mit anderen Bestandteilen des Cytosols interagiert (Pollock et al., 1991, Lancaster, 1997). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten BiFC-Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass funktionell aktive Dimere der α_1/β_1 -sGC unter den angewendeten experimentellen Bedingungen nur im Cytosol der Zellen nachzuweisen waren (siehe 4.2).

Um die subzelluläre Lokalisation der sGC in Abhängigkeit der Aktivierung durch DEA/NO, BAY 41-2272 sowie BAY 58-2667 näher zu untersuchen, wurden Fusionsproteine der sGC α_1 -Untereinheit mit GFP und der β_1 -Untereinheit mit DsRed generiert, wodurch eine Visualisierung der sGC direkt in lebenden Zellen möglich wurde. Die Fusionsproteine wiesen nach transienter Transfektion in cGMP-Reporterzellen und Inkubation mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272, dem sGC-Aktivator BAY 58-2667, dem NO-Donor DEA/NO und dem sGC-Inhibitor ODQ ein dem unfusionierten Enzym vergleichbares Aktivierungsprofil auf. Nach transienter Transfektion in cGMP-Reporterzellen und anschließender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde nur eine hauptsächlich cytosolische Verteilung des Enzyms beobachtet. Inkubation der transient transfizierten Zellen mit den oben genannten sGC-Modulatoren führte zu keiner Veränderung der subzellulären Lokalisation der sGC.

Es wird vermutet, dass die subzelluläre Lokalisation der sGC möglicherweise abhängig vom exprimierenden Zelltypus ist (Yetik-Anacak und Catravas, 2006). Daher wurde das generierte GFP- α_1 -sGC-Fusionsprotein ebenfalls in HUVEC und HASMC transient transfiziert. Auch in diesen Zellen wurde unter den verwendeten Bedingungen eine vorwiegend cytosolische Verteilung der sGC beobachtet. Ferner wurde in der Literatur beschrieben, dass die sGC im Endothel in multimerischen Komplexen vorliegt (Yetik-Anacak und Catravas, 2006). In Übereinstimmung mit dieser Arbeit war auch in den hier vorliegenden Untersuchungen erkennbar, dass die in HUVEC exprimierte sGC - im Gegensatz zu der in HASMC und in cGMP-Reporterzellen exprimierten sGC - nicht im gesamten Cytosol, sondern vorwiegend in konzentrierten Arealen lokalisiert ist.

Um auszuschließen, dass die Fusion der sGC an die verwendeten Fluoreszenzproteine die subzelluläre Lokalisation der sGC beeinflusst, wurde zusätzlich die mit der sGC stabil transfizierte cGMP-Reporterzelllinie, Gcolf8.9.7, immunhistochemisch untersucht. In Übereinstimmung mit bereits publizierten immunhistochemischen Untersuchungen der sGC im Gewebe ließ sich jedoch auch auf diesem Wege keine Translokation der sGC an die Membran weder im unaktivierten noch im aktivierten Zustand nachweisen (Mundel et al., 1995).

Somit war eine Translokalisierung der sGC an die Membran, vermittelt durch eine Aktivierung der sGC mit DEA/NO, BAY 41-2272 und BAY 58-2667, in den durchgeführten Untersuchungen an nativen Zellen nicht nachweisbar. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* eine Translokalisierung der sGC in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand an die Membran erfolgt. Möglicherweise unterliegt die Translokalisierung, wie postuliert, einem transienten, labilen Mechanismus, so dass diese mit den verwendeten Methoden nicht erfassbar war. Auch wäre es denkbar, dass für eine Translokalisierung neben Ca^{2+} noch weitere unbekannte Cofaktoren notwendig sind, die in den eingesetzten Zellsystemen nicht vorhanden waren (Zabel et al., 2002; Yetik-Anacak und Catravas, 2006).

4.4 Vasorelaxierende Wirkung von BAY 58-2667 am isolierten Gefäß

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems gehen einher mit der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, deren molekulare Ursachen bislang noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Die endotheliale Dysfunktion steht im Zusammenhang mit einer vermehrten Bildung von Superoxidradikalen, vorwiegend durch entkoppelte NADPH-Oxidasen, Xanthinoxidasen und eNOS. Die Superoxidradikale beeinflussen den NO-Signalweg, indem sie mit NO das starke Oxidans Peroxynitrit bilden (Pryor und Squadrito, 1995; Bian et al., 2006). Peroxynitrit führt, wie die Superoxidradikale selbst, zu einem Anstieg oxidiertes sGC und, durch gesteigerten Hämverlust der oxidierten Form, letztendlich zu hämfreier sGC (Stasch et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass Peroxynitrit und ROS durch Oxidation die funktionelle Aktivität NO-sensitiver sGC beeinträchtigen (Weber et al., 2001; Wedgwood et al., 2005). Sowohl die oxidierte als auch die hämfreie Form der sGC können durch NO nicht aktiviert werden (Stasch et al., 2006). Bei zahlreichen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie beispielsweise dem Bluthochdruck, wird eine vermehrte Bildung von ROS beobachtet (Guzik und Harrison, 2006). Es ist daher möglich, dass in Analogie zur bekannten Insulin-Resistenz ein „NO-Resistenz-Syndrom“ der endothelialen Dysfunktion zu Grunde liegt (Gladwin, 2006). Dies bedeutet, dass zwar ausreichend sGC exprimiert wird, diese aber aufgrund ihres Redoxstatus durch endogenes NO nicht aktivierbar ist. Um das auf zellulärer Ebene nachzuweisen, wäre es wünschenswert, das intrazelluläre Verhältnis von oxidiertes bzw. hämfreier zu reduzierter sGC zu bestimmen. Bisher besteht noch keine experimentelle Möglichkeit, direkt im Gewebe die oxidierte/hämfreie sGC nachzuweisen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren, wie BAY 58-2667 und HMR-1766, vorwiegend die oxidierte/hämfreie Form der sGC aktivieren (Stasch et al., 2002; Schindler et al., 2006; Evgenov et al., 2006). Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu den NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren, wie BAY 41-2272 und NO, welche selektiv die reduzierte, hämhaltige Form der sGC stimulieren (Schrammel et al., 1996; Stasch et al., 2001). Die Aktivierung der artifiziellen sGC-Form war

unerwartet und bis dahin als pharmakologisches Wirkprinzip unbekannt. Darüber hinaus ermöglicht dieses einzigartige Wirkprofil der sGC-Aktivatoren, wie BAY 58-2667, erstmals den Redoxstatus der sGC intrazellulär zu untersuchen (Stasch et al., 2002a; Stasch et al., 2006).

Um das Wirkprofil von BAY 58-2667 weitergehend zu charakterisieren, wurde die relaxierende Wirkung von BAY 58-2667 auch an isolierten Gefäßen untersucht. In publizierten Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Relaxation isolierter Aorten von Ratten durch BAY 58-2667 bei Vorbehandlung der Aorten mit Oxidantien - wie Peroxynitrit oder ODQ - verstärkt ist (Stasch et al., 2006). Demgegenüber wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung der isolierten Aorten mit dem Reduktionsmittel N-Acetyl-Cystein die Wirkung von BAY 58-2667 vermindert (Stasch et al., 2006). Untersuchungen des NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivators HMR-1766 an isolierten Aorten von Ratten belegten ebenfalls, dass die konzentrationsabhängige Relaxation isolierter Gefäße durch HMR-1766 bei Vorbehandlung der Gefäße mit ODQ verstärkt ist (Schindler et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit relaxierte der NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 vorkontrahierte, isolierte Aorten von Ratten konzentrationsabhängig. In Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen führte eine Vorbehandlung der Aorten mit ODQ zu einer Verstärkung der durch BAY 58-2667 induzierten Relaxation. Die Ergebnisse dokumentieren, dass NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren - wie BAY 58-2667 - auch am isolierten Gefäß ihre Wirkung vorwiegend über eine Aktivierung der oxidierten/hämfreien Form der sGC entfalten.

Es wird vermutet, dass in erkrankten Gefäßen die sGC vermehrt durch ROS oxidiert wird und der Anteil der oxidierten/hämfreien Form der sGC an der sGC-Gesamtmenge ansteigt. Demzufolge sollte die Wirkung von BAY 58-2667 an erkrankten Gefäßen stärker sein als an gesunden Gefäßen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von BAY 58-2667 an isolierten Gefäßen aus verschiedenen Krankheitsmodellen und Zuständen, die mit erhöhtem oxidativem Stress assoziiert werden, jeweils im Vergleich zu gesunden Kontrollgefäßen untersucht: alten spontan hypertensiven Ratten (SHR), Watanabe Kaninchen mit vererbter Hyperlipidämie (WHHL), mit Hochfettfutter gefütterten ApolipoproteinE Knockout Mäusen (Apo^{-/-}-Mäuse) und Arterien von Typ-II-Diabetikern (Miller et al., 1998; Shea et al., 2002; Nabha et al., 2005; Sotnikova et al., 2006).

BAY 58-2667 relaxierte konzentrationsabhängig vorkontrahierte Aortenringe alter SHR stärker als Aortenringe von normotensiven, gleichaltrigen Kontrolltieren. Der IC₅₀-Wert der Relaxation der Gefäße von SHR war um Faktor vier niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vorbehandlung der Gefäße mit ODQ führte zu einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven sowohl an Aorten von SHR als auch an Aorten von normotensiven Kontrolltieren und damit zu niedrigeren EC₅₀-Werten. Der Verstärkungseffekt

der BAY 58-2667-induzierten Relaxation durch Zugabe von ODQ zeigt, dass eine Vergrößerung des „Pools“ an oxidiertes/hämfreier sGC zu einer stärkeren Wirkung von BAY 58-2667 an diesen Gefäßen führt. Die Befunde, dass BAY 58-2667 die Gefäße hypertensiver Ratten stärker relaxiert als die Gefäße normotensiver Ratten, legen nahe, dass der Anteil oxidiertes/hämfreier sGC unter pathophysiologischen Zuständen erhöht ist.

Arterien von alten WHHL weisen eine verminderte Vasodilatation durch NO auf, wie es für das Anfangsstadium einer Atherosklerose charakteristisch ist (Warnholtz et al., 2002b). BAY 58-2667 relaxierte vorkontrahierte Saphena-Arterien von alten atherosklerotischen WHHL stärker als Saphena-Arterien von gleichaltrigen Kontrolltieren. Demgegenüber war die Relaxation vorkontrahierter Saphena-Arterien von WHHL durch den NO-Donor SNP im Vergleich zu Saphena-Arterien von gleichaltrigen Kontrolltieren tendenziell erniedrigt.

Als weiteres Tiermodell für atherosklerotische Gefäßerkrankungen wurden Aortenringe von ApoE^{-/-}-Mäusen verwendet, denen eine Hochfettdiät über einen Zeitraum von vier Monaten verabreicht wurde. BAY 58-2667 relaxierte vorkontrahierte Aortenringe von ApoE^{-/-}-Mäusen, denen ein Hochfettdiät verabreicht wurde, stärker als Aortenringe von ApoE^{-/-}-Mäusen, denen ein Standardfutter verabreicht wurde. Demgegenüber war die relaxierende Wirkung von GTN an Aortenringen von Hochfett-ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Standardfutter-ApoE^{-/-}-Mäusen nicht deutlich reduziert.

Um zu überprüfen, ob BAY 58-2667 auch relaxierende Wirkungen an Humangefäßen aufweist, haben wir das Relaxationsprofil von BAY 58-2667 an humanen Mesenterialarterien untersucht. Es wurden isolierte Gefäße von Typ-II-Diabetikern im Vergleich zu Arterien von Patienten ohne Diabetes verwendet, um den Einfluss dieses pathophysiologischen Zustandes auf die relaxierende Wirkung von BAY 58-2667 zu untersuchen. Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen zeigten, dass bei Typ-II-Diabetes erhöhte Spiegel an ROS vorliegen (Sotnikova et al., 2006). Ebenfalls wurde in Tiermodellen für Typ-II-Diabetes auch ein Anstieg der NO-insensitiven Form der sGC beobachtet (Witte et al., 2002). Erwartungsgemäß relaxierte BAY 58-2667 Arterien von Typ-II-Diabetikern stärker als Arterien von Patienten ohne Diabetes. Dies belegt, dass BAY 58-2667 auch die humane sGC aktiviert und dass hier ebenfalls die Wirkung von BAY 58-2667 an pathophysiologischen Gefäßen verstärkt ist.

Zusammenfassend stehen die Ergebnisse im Einklang mit der Hypothese, dass unter physiologischen Bedingungen die sGC in einem Redoxgleichgewicht zwischen NO-sensitiver reduzierter Form und NO-insensitiver, oxidiertes Form vorliegt. Pathophysiologische Prozesse gehen mit einer erhöhten Produktion an ROS einher. Es wird vermutet, dass unter pathophysiologischen Prozessen der Anteil der oxidiertes/hämfreien Form der sGC, also der BAY 58-2667 sensitiven Form, an der Gesamtmenge der sGC ansteigt. Der Zusammenhang zwischen ROS-Bildung, oxidiertes/hämfreier sGC und vaskulärer Dysfunktion legt nahe, dass

BAY 58-2667 selektiv die in erkrankten Gefäßen vermehrt vorkommende oxidierte/hämfreie Form der sGC aktiviert und daher die erkrankten Gefäße stärker dilatiert als die gesunden Gefäße. Somit wird durch BAY 58-2667 ermöglicht, dass cGMP *in vivo* vorwiegend dort gebildet wird, wo es am meisten benötigt wird, das heißt im geschädigten Gefäß. Das bisher einzigartige Wirkprofil eröffnet die Perspektive, dass BAY 58-2667 als innovatives Therapeutikum zur Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen entwickelt wird.

5. Zusammenfassung

Fehlfunktionen des NO-sGC-cGMP-Signalwegs gelten als eine mögliche Ursache bei Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. So werden bei Patienten mit Bluthochdruck und Herzinsuffizienz eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO und eine schwächer ausgeprägte NO-vermittelte Vasodilatation beobachtet. In den letzten Jahren wurden Substanzen identifiziert, die die sGC unabhängig von NO aktivieren. Diese Substanzen lassen sich in zwei Klassen einteilen: in die NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren, wie BAY 41-2272, und in die NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren, wie BAY 58-2667. Die Etablierung einer cGMP-Reporterzelllinie ermöglichte es, die cGMP-Produktion in lebenden Zellen auf Lumineszenzbasis zu messen. Mit Hilfe der cGMP-Reporterzelllinie in Kombination mit sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren konnte zum ersten Mal intrazellulär zwischen hämfreier und hämhaltiger sGC unterschieden werden. Auch lassen sich durch diese cGMP-Reporterzelllinie die Auswirkungen von sGC-Mutationen auf die katalytische Aktivität erstmals direkt in einer intrazellulären Umgebung untersuchen. Durch diese Methode konnten bereits im Vorfeld dieser Arbeit zwei Ankeraminosäuren der prosthetischen Hämgruppe der sGC identifiziert werden. Dieses Ergebnis und somit auch die Validität der hier beschriebenen Methode wurden durch Kristallisationsstudien an Hämbindungsdomänen der Bakterien *Thermoanaerobacter tencongensis* und *Nostoc*, die Homologien zur sGC-Sequenz aufweisen, kürzlich bestätigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die strukturellen Grundlagen der Aktivierung und Regulation der sGC weitergehend untersucht.

Das hoch konservierte $\beta_1\text{Ser}_{137}$ konnte als weiterer Interaktionspartner für die Koordination der prosthetischen Hämgruppe der sGC mit Hilfe eines Multisequenzalignment identifiziert werden. Ein Austausch von $\beta_1\text{Ser}_{137}$ gegen Alanin führte zu einer verminderten Stimulierung der sGC durch BAY 41-2272 und NO sowie zu einer verminderten Rekonstitution mit PPIX. Demnach formt $\beta_1\text{Ser}_{137}$ gemeinsam mit den beiden Ankeraminosäuren des Häms, $\beta_1\text{Tyr}_{135}$ und $\beta_1\text{Arg}_{139}$, das charakteristische sGC-Hämbindungsmotiv Tyr-x-Ser-x-Arg. Genau dieses in der vorliegenden Arbeit identifizierte Hämbindungsmotiv wurde durch die Kristallstrukturen der Hämbindungsdomänen der Bakterien *Thermoanaerobacter tencongensis* und *Nostoc* bestätigt.

Erstmalig konnte durch Mutagenesestudien eine Beteiligung der konservierten Aminosäuren $\beta_1\text{Asp}_{44}$, $\beta_1\text{Asp}_{45}$ und $\beta_1\text{Phe}_{74}$ der Hämbindungsdomäne an der Häm-vermittelten sGC-Aktivierung gezeigt werden. Ein Austausch der Aminosäuren gegen Alanin führte zu einem

Verlust der sGC-Stimulation durch den Häm-abhängigen sGC-Stimulator BAY 41-2272 und NO. Eine erst kürzlich veröffentlichte Kristallisationsstudie der zur sGC-Sequenz homologen Hämbindungsdomäne des Cyanobakteriums *Nostoc* bestätigt die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse.

Ausgehend von der Kristallstruktur des Bakteriums *Thermoanaerobacter tengcongensis*, welches O₂ im Gegensatz zu NO bindet, wurde ein polares Tyrosin in der distalen Hämbindungstasche für die Diskriminierung zwischen O₂- und NO-Bindung verantwortlich gemacht. Es wurde vermutet, dass die bevorzugte NO-Bindung der sGC durch das Fehlen eines polaren Tyrosins in der Hämbindungstasche erklärbar sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig am vollständigen intrazellulären Enzym demonstriert werden, dass die Einführung eines polaren Tyrosins in die hydrophobe distale Hämbindungstasche der sGC keine Auswirkung auf die Ligandenselektivität der sGC hat.

Die Etablierung eines BiFC-Tests ermöglichte erstmals, die strukturellen Grundlagen der Heterodimerisation von α_1/β_1 -sGC direkt in einer zellulären Umgebung zu untersuchen. Durch die BiFC-Untersuchungen konnte eine Beteiligung der konservierten Aminosäuresequenzen 363-373, 403-422, 440-459 der α_1 -Untereinheit und 212-222, 304-333, 344-363 und 381-400 der β_1 -Untereinheit an der Heterodimerisation der sGC und somit Bildung einer funktionell aktiven sGC identifiziert werden. Die Anordnung der Aminosäuren deutet darauf hin, dass die Dimerisierungsregion der α_1/β_1 -sGC eine diskontinuierliche Struktur aufweist und zum Teil eine amphipathische α -Helix Struktur ausbildet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die subzelluläre Verteilung der sGC direkt in lebenden Zellen durch die Generation von Fusionsproteinen der sGC-Untereinheiten α_1 und β_1 mit den Fluoreszenzproteinen GFP und DsRed untersucht. Unter den verwendeten Testbedingungen war die sGC unabhängig vom Aktivierungszustand und exprimierenden Zelltypus hauptsächlich im Cytosol lokalisiert. Auch in anschließend durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an einer mit sGC stabil transfizierten Zelllinie wurde ein hauptsächlich cytosolisches Verteilungsmuster der sGC - unabhängig vom Aktivierungszustand - verzeichnet. Somit war eine Translokation der sGC an die Membran, in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes, unter den verwendeten Bedingungen nicht nachweisbar.

Die endotheliale Dysfunktion geht einher mit einer vermehrten Bildung von ROS und Peroxynitrit. Als Konsequenz dieser Prozesse entsteht oxidierte/hämfreie sGC. Der NO- und Häm-abhängige sGC-Aktivator BAY 58-2667 aktiviert vorwiegend die oxidierte bzw.

hämfreie Form der sGC. Es wurde gezeigt, dass die BAY 58-2667-induzierte Relaxation isolierter Aorten von Ratten in Gegenwart des sGC-Oxidans ODQ verstärkt ist, das heißt, dass BAY 58-2667 auch am isolierten Gefäß seine Wirkung vorwiegend über eine Aktivierung der oxidierten/hämfreien Variante der sGC entfaltet. In weitergehenden Untersuchungen konnte im Rahmen dieser Arbeit an isolierten Gefäßen von verschiedenen Tiermodellen, die mit endothelialer Dysfunktion assoziiert sind, sowie an isolierten Gefäßen von Typ-II-Diabetikern eine verstärkte Wirkung von BAY 58-2667 an erkrankten Gefäßen demonstriert werden. Die Untersuchungen sind ein weiterer Hinweis dafür, dass die sGC unter physiologischen Bedingungen in einem Redoxgleichgewicht zwischen NO-sensitiver, reduzierter Form und NO-insensitiver oxidierte Form vorliegt. Unter pathophysiologischen Bedingungen, die mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen, wird demzufolge das Gleichgewicht zur NO-insensitiven oxidierten/hämfreien sGC hin verschoben.

Die hier erhobenen Befunde sind ein Beitrag zur Aufklärung der strukturellen Grundlagen von Regulation und Aktivierbarkeit der sGC. Die Ergebnisse sprechen dafür, die Substanz BAY 58-2667 aufgrund ihres spezifischen Wirkprofils als innovatives Therapeutikum für Gefäßerkrankungen weiterzuentwickeln, denn mit dieser Verbindung ist es erstmals möglich, erkrankte Blutgefäße selektiv unter Bedingungen von oxidativem Stress zu dilatieren.

6. Literatur

- Agullo L.**, Garcia-Dorado D., Escalona N., Ruiz-Meana M., Mirabet M., Inserte J., Soler-Soler S. (2005) Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 68:65-74.
- Alonso-Alija C.**, Heil M., Flubacher D., Stasch J.P., Wunder F., Dembowski K., Perzborn E., Stahl E. (2001) Novel derivatives of dicarboxylic acid having pharmaceutical properties. WO-119780-A 2001.03.22.
- Arnold W.P.**, Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:3203-3207.
- Ashman D.F.**, Lipton R., Melicow M.M., Price T.D. (1963) Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosin 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11:330-334.
- Ballou D.P.**, Zhao Y., Brandish P.E., Marletta M.A. (2002) Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:12097-12101.
- Bauersachs J.**, Bouloumie A., Mülsch A., Wiemer G., Fleming I., Busse R. (1998) Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc. Res.* 37:772-779.
- Bellamy T.C.**, Wood J., Garthwaite J. (2002) On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:507-510.
- Bender A.T.**, Beavo J.A. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.* 58:488-520.
- Bian K.**, Ke Y., Kamisaki Y., Murad F. (2006) Proteomic modification by nitric oxide. *J. Pharmacol. Sci.* 101:271-279.
- Bischoff E.**, Stasch J.P. (2004) Effects of the sGC stimulator BAY 41-2272 are not mediated by phosphodiesterase 5 inhibition. *Circulation.* 110:320-321.
- Boerrigter G.**, Costello-Boerrigter L.C., Cataliotti A., Lapp H., Stasch J.P., Burnett J.C.Jr. (2007) Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension.* doi 106.083832.
- Boon E.M.**, Huang S.H., Marletta M.A. (2005a) A molecular basis for NO selectivity in soluble guanylate cyclase. *Nat. Chem. Biol.* 1:53-59.
- Boon E.M.**, Marletta M.A. (2005b) Ligand discrimination in soluble guanylate cyclase and the H-NOX family of heme-sensor proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9:441-446.
- Boon E.M.**, Marletta M.A. (2005c) Ligand specificity of H-NOX domains: from sGC to bacterial NO sensors. *J. Inorg. Biochem.* 99:892-902.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bradley J.**, Frings S., Yau K.W., Reed R. (2001) Nomenclature for ion channel subunits. *Science* 294:2095-2096.
- Brunton T.L.** (1867) Use of amyl nitrite in angina pectoris. *Lancet.* 1857:561-564.
- Cary S.P.**, Winger J.A., Marletta M.A. (2005) Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:13064-13069.
- Cary S.P.**, Winger J.A., Derbyshire E.R., Marletta M.A. (2006) Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends. Biochem. Sci.* 31:231-239.
- Craven K.B.**, Zagotta W.N. (2006) CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol.* 68:375-401.

- Denninger J.W.**, Marletta M.W. (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411:334-350.
- Denninger J.W.**, Schelvis J.P., Brandish P.E., Zhao Y., Babcock G.T., Marletta M.A. (2000) Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry.* 39:4191-4198.
- Elfering S.L.**, Sarkela T.M., Giulivi C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 277:38079-38086.
- Evgenov O.V.**, Pacher P., Schmidt P.M., Haskó G., Schmidt H.H.H.W., Stasch J.P. (2006) NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5:755-768.
- Feelisch M.**, Kotsonis P., Siebe J., Clement B., Schmidt H.H. (1999) The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide bioactivation. *Mol. Pharmacol.* 56:243-253.
- Feil R.**, Kemp-Harper B. (2006) cGMP signalling: from bench to bedside. *EMBO Rep.* 7:149-153.
- Fitzpatrick D.A.**, O'Halloran D.M., Burnell A.M. (2006) Multiple lineage specific expansions within the guanylyl cyclase gene family. *BMC Evol. Biol.* 6:26-44.
- Foerster J.**, Harteneck C., Malkewitz J., Schultz G., Koesling D. (1996) A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur. J. Biochem.* 240:380-386.
- Friebe A.**, Schultz G., Kösling D. (1996) Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.* 15:6863-6868.
- Friebe A.**, Wedel B., Harteneck C., Foerster J., Schultz G., Kösling D. (1997) Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase. *Biochemistry.* 36:1194-1198.
- Friebe A.**, Kösling D. (1998) Mechanism of YC-1 induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 53:123-127.
- Friebe A.**, Kösling D. (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ. Res.* 93:96-105.
- Furchgott R.F.**, Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-376.
- Furchgott R.F.** (1999) Der relaxierende Faktor aus Endothelzellen: Entdeckung, frühe Untersuchungen und Identifizierung als Stickstoffmonoxid (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 111:1990-2000.
- Galle J.**, Zabel U., Hübner U., Hatzelmann A., Wagner B., Wanner C., Schmidt H.H. (1999) Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic cGMP levels and phosphodiesterase activity. *Br. J. Pharmacol.* 127:195-203.
- Garthwaite J.**, Southam E., Boulton C.L., Nielsen E.B., Schmidt K., Mayer B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* 48:184-188.
- Ghafourifar P.**, Richter C. (1997) Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418:291-296.
- Gladwin M.T.** (2006) Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J. Clin. Invest.* 116:2330-2332.
- Goldberg N.D.**, Dietz S.B., O'Toole A.G. (1969) Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J. Biol. Chem.* 244:4458-4466.
- Gong W.**, Hao B., Chan M.K. (2000) New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL. *Biochemistry.* 39:3955-3962.
- Gray J.M.**, Karow D.S., Lu H., Chang A.J., Chang S.S., Ellis R.E., Marletta M.A., Bargman C.I. (2004) Oxygen sensation and social feeding behaviour by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. *Nature.* 430:317-322.
- Green L.C.**, Ruiz de Luzuriaga K., Wagner D.A., Rand W., Istfan N., Young V.R., Tannenbaum S.R. (1981) Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:7764-7768.

-
- Guzik T.J.**, Harrison D.G. (2006) Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov. Today*. 11:524-533.
- Hardman J.G.**, Sutherland E.W. (1969) Guanylyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosin 3',5'-monophosphate from guanosin triphosphate. *J. Biol. Chem.* 244:6363-6370.
- Hare J.M.** (2004) Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 351:2112-2114.
- Harlow E.**, Lane D. (1988) Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Harteneck C.**, Kösling D., Soling A., Schultz G., Bohme E. (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 272:221-223.
- Hastings J.W.**, Mitchell G., Mattingly P.H., Blinks J.R., Van Leeuwen M. (1969) Response of aequorin bioluminescence to rapid changes in calcium concentration. *Nature*. 222:1047-1050.
- Hering K.W.**, Artz J.D., Pearson W.H., Marletta M.A. (2006) The design and synthesis of YC-1 analogues as probes for soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:618-621.
- Hevel J.M.**, White K.A., Marletta M.A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 266:22789-22791.
- Hobbs A.J.** (2002) Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br. J. Pharmacol.* 136:637-640.
- Hönicka M.**, Becker E.M., Apeler H., Sirichoke T., Schröder H., Gerzer R., Stasch J.P. (1999) Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J. Mol. Med.* 77:14-23.
- Hofmann F.**, Biel M., Kaupp U.B. (2005) International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels. *Pharmacol. Rev.* 57:455-462.
- Hofmann F.**, Feil R., Kleppisch T., Schlossmann J. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol. Rev.* 86:1-23.
- Hu C.D.**, Chinenov Y., Kerppola T.K. (2002) Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell.* 9:789-798.
- Humbert P.**, Niroomand F., Fischer G., Mayer B., Kösling D., Hinsch K.D., Gausepohl H., Frank R., Schultz G., Böhme E. (1990) Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur. J. Biochem.* 190:273-278.
- Ignarro L.J.**, Wood K.S., Wolin M.S. (1982a) Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:2870-2873.
- Ignarro L.J.**, Degnan J.N., Baricos W.H., Kadowitz P.J., Wolin M.S. (1982b) Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim. Biophys. Acta.* 718:49-59.
- Ignarro L.J.**, Ballot B., Wood K.S. (1984) Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. *J. Biol. Chem.* 259:6201-6207.
- Ignarro L.J.**, Adams J.B., Horwitz P.M., Wood K.S. (1986) Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J. Biol. Chem.* 261:4997-5002.
- Ignarro L.J.**, Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:9265-9269.
- Ignarro L.J.** (1999) Stickstoffmonoxid: Ein einzigartiges endogenes Signalmolekül in der Gefäßbiologie (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 111:2002-2013.
- Ignarro L.J.** (2002) After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:7816-7817.
- Ishikawa E.**, Ishikawa S., Davis J.W., Sutherland E.W. (1969) Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanylyl cyclase in rat intestine. *J. Biol. Chem.* 244:6371-6376.
-

- Iyer L.M., Anantharaman V., Aravind L. (2003) Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics*. 4:5-12.
- Jackson E.B., Mukhopadhyay S., Tulis D.A. (2007) Pharmacologic modulators of soluble guanylate cyclase/cyclic guanosine monophosphate in the vascular system - from bench top to bedside. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 5:1-14.
- Jain R., Chan M.K. (2003) Mechanisms of ligand discrimination by heme proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8:1-11.
- Jeon Y.H., Heo Y.S., Kim C.M., Hyun Y.L., Lee T.G., Ro S., Cho J.M. (2005) Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1198-1220.
- Kane L.B., Klings E.S. (2006) Present and future treatment strategies for pulmonary arterial hypertension: focus on phosphodiesterase-5 inhibitors. *Treat. Respir. Med.* 5:271-282.
- Karow D.S., Pan D., Tran R., Pellicena P., Presley A., Mathies R.A., Marletta M.A. (2004) Spectroscopic characterization of the soluble guanylate cyclase-like heme domains from *Vibrio cholerae* and *Thermoanaerobacter tencongensis*. *Biochemistry*. 43:10203-10211.
- Karow D.S., Pan D., Davis J.H., Behrends S., Mathies R.A., Marletta M.A. (2005) Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*. 44:16266-16274.
- Katsuki S., Arnold W., Mittal C., Murad F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3:23-25.
- Kerppola T.K. (2006a) Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nat. Methods*. 3:969-971.
- Kerppola T.K. (2006b) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:449-456.
- Kim H.P., Ryter S.W., Choi A.M.K. (2006) CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:411-449.
- Kloss S., Bouloumie A., Mülsch A. (2000) Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*. 35:43-47.
- Ko F.N., Wu C.C., Kuo S.C., Lee F.Y., Teng C.M. (1994) YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*. 84:4226-4233.
- Koeppen M., Feil R., Siegl D., Feil S., Hofmann F., Pohl U., de Wit C. (2004) cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension*. 44:952-955.
- Koglin M., Vehse K., Budaus L., Scholz H., Behrends S. (2001) Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J. Biol. Chem.* 276:30737-30743.
- Koglin M., Stasch J.P., Behrends S. (2002) BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:1057-1062.
- Koglin M., Behrends S. (2003) A functional domain of the alpha1 subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding. *J. Biol. Chem.* 278:12590-12597.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lancaster J.R. Jr. (1997) A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1:18-30.
- Langlais K.K., Stewart J.A., Morton D.B. (2004) Preliminary characterization of two atypical soluble guanylyl cyclases in the central and peripheral nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 207:2323-2338.
- Luttrell L.M. (2006) Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol. Biol.* 332:3-49.
- Ma X., Sayed N., Beuve A., van den Akker F. (2007) NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *EMBO J.* 26:578-588.

- Marletta M.A.** (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.* 1:249-257.
- Martin E.**, Lee Y.C., Murad F. (2001) YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:12938-12942.
- Martin E.**, Berka V., Bogatenkova E., Murad F., Tsai A.L. (2006) 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.* 281:27836-27845.
- Mayer B.**, Andrew P. (1998) Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Nuayn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358:127-133.
- Mayer B.**, Kösling D. (2001) cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:546-548.
- Mehats C.**, Andersen C.B., Filipanti M., Jin S.L.C., Conti M. (2002) Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* 13:29-35.
- Melichar V.O.**, Behr-Roussel D., Zabel U., Uttenthal L.O., Rodrigo J., Rupin A., Verbeuren T.J., Kumar H.S.A., Schmidt H.H. (2004) Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:16671-16676.
- Mergia E.**, Russwurm M., Zoidl G., Kösling D. (2003) Major occurrence of the new $\alpha_2\beta_1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell. Signal.* 15:189-195.
- Miller Jr F.J.**, Gatterman D.D., Rios C.D., Heistad D.D., Davidson B.L. (1998) Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ. Res.* 82:1298-1305.
- Mingone C.J.**, Gupte S.A., Chow J.L., Ahmad M., Abraham N.G., Wolin M.S. (2006) Protoporphyrin IX generation from δ -aminolevulinic acid elicits pulmonary artery relaxation and soluble guanylate cyclase activation. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 291:337-344.
- Minsky M.** (1988) Memoir of inventing the confocal scanning microscope. *Scanning.* 10:128-138.
- Moncada S.** (2006) Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361:735-759.
- Morley D.**, Keefer L.K. (1993) Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22:3-9.
- Morley D.**, Maragos C.M., Zhang X.Y., Boignon M., Wink D.A., Keefer L.K. (1993) Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21:670-676.
- Morton D.B.** (2004) Atypical soluble guanylate cyclases in *Drosophila* can function as molecular oxygen sensors. *J. Biol. Chem.* 279:50651-50653.
- Morton D.B.**, Langlais K.K., Stewart J.A., Vermehren A. (2005) Comparison of the properties of the five soluble guanylyl cyclase subunits in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Sci.* 5:12-22.
- Mülsch A.**, Bauersachs J., Schäfer A., Stasch J.P., Kast R. (1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br. J. Pharmacol.* 120:681-689.
- Münzel T.**, Genth-Zotz S., Hink U. (2007) Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase. Solution for all cardiorenal problems in heart failure? *Hypertension.* doi 106.085456.
- Mundel P.**, Gambaryan S., Bachmann S., Koesling D., Kriz W. (1995) Immunolocalization of soluble guanylyl cyclase subunits in rat kidney. *Histochem. Cell. Biol.* 103:75-79.
- Murad F.** (1999) Die Entdeckung einiger biologischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid und seiner Rolle für die Zellkommunikation (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 111:1976-1989.
- Murad F.** (2006) Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.* 355:2003-2011.

- Nabha L.**, Gabern J.C., Buller C.L., Charpie J.R. (2005) Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 27:17-31.
- Nighorn A.**, Byrnes K.A., Morton D.B. (1999) Identification and characterization of a novel beta subunit of soluble guanylyl cyclase that is active in the absence of a second subunit and is relatively insensitive to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 274:2525-2531.
- Nioche P.**, Berka V., Vipond J., Minton N., Tsai A., Raman C.S. (2004) Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*. *Science.* 306:1550-1553.
- Nisoli E.**, Clementi E., Paolucci C., Cozzi V., Tonello C., Sciorati C., Bracale R., Valerio A., Francolini M., Moncada S., Carruba M.O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science.* 299:896-899.
- Olesen S.P.**, Drejer J., Axelsson O., Moldt P., Bang L., Nielsen-Kudsk J.E., Busse R., Mülsch A. (1998) Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 123:299-309.
- Olson J.S.**, Phillips G.N. (1996) Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin. *J. Biol. Chem.* 271:17593-17596.
- Ozalp C.**, Szczensna-Skoruppa E., Kemper B. (2005) Bimolecular fluorescence complementation analysis of cytochrome P450 2C2, 2E1, and NAPDH-cytochrome P450 reductase molecular interactions in living cells. *Drug. Metab. Dispos.* 33:1382-1390.
- Palmer R.M.**, Ferrige A.G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327:524-526.
- Pellicena P.**, Karow D.S., Boon E.M., Marletta M.A., Kuriyan J. (2004) Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:12854-12859.
- Perkins W.J.** (2006) Regulation of soluble guanylyl cyclase: looking beyond NO. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 291:334-336.
- Pfeifer A.**, Aszodi A., Seidler U., Ruth P., Hofmann F., Fassler R. (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science.* 274:2082-2086.
- Pfeifer A.**, Klatt P., Massberg S., Ny L., Sausbier M., Hirneiss C., Wang G.X., Korth M., Aszodi A., Andersson K.E., Krombach F., Mayerhofer A., Ruth P., Fassler R., Hofmann F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17:3045-3051.
- Phillips G.N.**, Teodoro M.L., Li T.S., Smith B., Olson J.S. (1999) Bound CO is a molecular probe of electrostatic potential in the distal pocket of myoglobin. *J. Phys. Chem.* 103:8817-8829.
- Pitari G.M.**, Zingman L.V., Hodgson D.M., Alekseev A.E., Kazerounian S., Bienengraber M., Hajnoczky G., Terzic A., Waldman S.A. (2003) Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:2695-2699.
- Pollock J.S.**, Forstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H., Nakane M., Murad F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10480-10484.
- Potter L.R.**, Abbey-Hosch S., Dickey D.M. (2006) Natriuretic peptides, their receptors and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr. Rev.* 27:47-72.
- Poulos T.L.** (2006) Soluble guanylate cyclase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:736-743.
- Pryor W.A.**, Squadrito G.L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268:699-722.
- Robinson R.B.**, Siegelbaum S.A. (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu. Rev. Physiol.* 65:453-480.
- Rothkegel C.**, Schmidt P.M., Stoll F., Schröder H., Schmidt H.H.H.W., Stasch J.P. (2006) Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. *FEBS Lett.* 580:4205-4213.
- Ruetten H.**, Zabel U., Linz W., Schmidt H.H. (1999) Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 85:534-541.

- Russwurm M.**, Behrends S., Harteneck C., Kösling D. (1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. J.* 335:125-130.
- Russwurm M.**, Wittau N., Kösling D. (2001) Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha_2\beta_1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 276:44647-44652.
- Russwurm M.**, Mergia E., Müllershausen F., Kösling D. (2002) Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for sensitizing effect of YC-1. *J. Biol. Chem.* 277:24883-24888.
- Russwurm M.**, Kösling D. (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 23:4443-4450.
- Ryter S.W.**, Otterbein L.E., Morse D., Choi A.M. (2002) Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235:249-263.
- Sausbier M.**, Zhao A., Abdullah U., Schubert R., Sausbier U., Huber A., Feil S., Feil R., Hofmann F., Neuhuber W., Allescher H., Ruth P. (2005) Enhanced cGMP/cGMP kinase-signaling and hypotonia in cysteine-rich-protein 2-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 371:39.
- Schindler U.**, Strobel H., Schonafinger K., Linz W., Lohn M., Martorana P.A., Rutten H., Schindler P.W., Busch A.E., Sohn M., Topfer A., Pistorius A., Jannek C., Mülsch A. (2006) Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 69:1260-1268.
- Schmidt P.**, Schramm M., Schröder H., Stasch J.P. (2003) Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 468:167-174.
- Schmidt P.M.**, Schramm M., Schröder H., Wunder F., Stasch J.P. (2004) Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 279:3025-3032.
- Schmidt P.M.**, Rothkegel C., Wunder F., Schröder H., Stasch J.P. (2005) Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 513:67-74.
- Schrammel A.**, Behrends S., Schmidt K., Kösling D., Mayer B. (1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 50:1-5.
- Schultz G.**, Böhme E., Munske K. (1969) Guanylyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 8:1323-1332.
- Shea T.B.**, Rogers E., Ashline D., Ortiz D., Sheu M.S. (2002) Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. *Free Radic. Biol. Med.* 33:1115-1120.
- Shiga T.**, Suzuki N. (2005) Amphipathic α -Helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase. *Zoolog. Sci.* 22:735-742.
- Shimomura O.**, Johnson F.H. (1970) Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in aequorin bioluminescence. *Nature.* 227:1356-1357.
- Sotnikova R.**, Skalska S., Okrhulicova L., Navarova J., Kyselova Z., Zurova J., Stefek M., Hozova R., Nosalova V. (2006) Changes in the function and ultrastructure of vessels in the rat model of multiple-low dose streptozotocin-induced diabetes. *Gen. Physiol. Biophys.* 25:289-302.
- Spiro T.G.**, Jarzecki A.A. (2001) Heme-based sensors: theoretical modeling of heme-ligand-protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:715-723.
- Stasch J.P.**, Becker E.M., Alonso-Alija C., Apeler H., Debowsky K., Feurer A., Gerzer R., Minuth T., Perzborn E., Pleiss U., Schröder H., Schröder W., Stahl E., Steinke W., Straub A., Schramm M. (2001) NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 410:212-215.
- Stasch J.P.**, Alonso-Alija C., Apeler H., Debowsky K., Feurer A., Minuth T., Perzborn E., Schramm M., Straub A. (2002a) Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* 135:333-343.
- Stasch J.P.**, Dembowsky K., Perzborn E., Stahl E., Schramm M. (2002b) Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* 135:344-355.
- Stasch J.P.**, Schmidt P., Alonso-Alija C., Apeler H., Dembowsky K., Härter M., Heil M., Minuth T., Perzborn E., Pleiß U., Schramm M., Schröder W., Schröder H., Stahl E., Steinke W., Wunder F. (2002c) NO- and haem-

independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br. J. Pharmacol.* 136:773-783.

- Stasch J.P.**, Schmidt P.M., Nedvetsky P.I., Nedvetskaya T.Y., Kumar H.S.A., 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 H.H.H.W. (2006) Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* 116:2552-2561.
- Stone J.R.**, Marletta M.A. (1995) Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry.* 34:14668-14674.
- Stone J.R.**, Marletta M.A. (1996) Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry.* 35:1093-1099.
- Stone J.R.**, Marletta M.A. (1998) Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem. Biol.* 5:255-261.
- Straub A.**, Stasch J.P., Alonso-Alija C., Benet-Buchholz J., Ducke B., Feurer A., Fürstner C. (2001) NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:781-784.
- Straub A.**, Benet-Buchholz J., Fröde R., Kern A., Kohlsdorfer C., Schmitt P., Schwarz T., Siefert H.M., Stasch J.P. (2002) Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem.* 10:1711-1717.
- Sunahara R.K.**, Beuve A., Tesmer J.J., Sprang S.R., Garbers D.L., Gilman A.G. (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 273:16332-16338.
- Sutherland E.W.**, Rall T.W. (1960) Formation of adenosine-3,5-phosphate (cyclic adenylyl) and its relation to the action of several neurohormones or hormones. *Acta. Endocrinol.* 34:171-174.
- Tesmer J.J.**, Sunahara R.K., Gilman A.G., Sprang S.R. (1997) Crystal structure of the catalytic domain of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science.* 278:1907-1916.
- Tesmer J.J.**, Sprang S.R. (1998) The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:713-719.
- Thadani U.**, Rodgers T. (2006) Side effects of using nitrates to treat angina. *Expert. Opin. Drug Saf.* 5:667-674.
- Towbin H.**, Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
- Veltman D.M.**, Roelofs J., Engel R., Visser A.J.W.G., van Haastert P.J.M. (2005) Activation of soluble guanylyl cyclase at the leading edge during *Dictyostelium* Chemotaxis. *Mol. Biol. Cell.* 16:976-983.
- Wagner C.**, Pfeifer A., Ruth P., Hofmann F., Kurtz A. (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J. Clin. Invest.* 102:1576-1582.
- Wagner C.**, Russwurm M., Jäger R., Friebe A., Kösling D. (2005) Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. *J. Biol. Chem.* 280:17687-17693.
- Wagner D.A.**, Young V.R., Tannenbaum S.R. (1983) Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:4518-4521.
- Warnholtz A.**, Nickenig G., Schulz E., Macharzina R., Brasen J.H., Skatchkov M., Heitzer T., Stasch J.P., Griendling K.K., Harrison D.G., Böhm M., Meinertz T., Münzel T. (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 99:2027-2033.
- Warnholtz A.**, Tsilimingas N., Wendt M., Münzel T. (2002a) Mechanisms underlying nitrate-induced endothelial dysfunction: insight from experimental and clinical studies. *Heart Fail. Rev.* 7:335-345.
- Warnholtz A.**, Mollnau H., Heitzer T., Kontush A., Moller-Bertram T., Lavall D., Giaid A., Beisiegel U., Marklund S.L., Walter U., Meinertz T., Münzel T. (2002b) Adverse effects of nitroglycerin treatment on endothelial function, vascular nitrotyrosine levels and cGMP-dependent protein kinase activity in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40:1356-1363.

- Weber M.**, Lauer N., Mülsch A., Kojda G. (2001). The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1360-1367.
- Weber R.E.**, Vinogradov S.N. (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.* 81:569-628.
- Wedel B.**, Humbert P., Harteneck C., Förster J., Malkewitz J., Bohme E., Schultz G., Kösling D. (1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2592-2596.
- Wedel B.**, Harteneck C., Förster J., Friebe A., Schultz G., Kösling D. (1995) Functional domains of sGC. *J. Biol. Chem.* 270:24871-24875.
- Wedgwood S.**, Steinhorn R.H., Bunderson M., Wilham J., Lakshminrusimha S., Brennan L.A., Black S.M. (2005) 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.* 289:660-666.
- White A.A.**, Aurbach G.D. (1969) Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 191:686-697.
- Wilson E.M.**, Chinkers M. (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry.* 34:4696-4701.
- Witte K.**, Jacke K., Stahrenberg R., Arlt G., Reitenbach I., Schilling L., Lemmer B. (2002) Dysfunction of soluble guanylyl cyclase in aorta and kidney of Goto-Kakizaki rats: influence of age and diabetic state. *Nitric Oxide.* 6:85-95.
- Wu C.C.**, Ko F.N., Kuo S.C., Lee F.Y., Teng C.M. (1995) YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 116:1973-1978.
- Wunder F.**, Stasch J.P., Hütter J., Alonso-Alija C., Hüser J., Lohrmann E. (2005). A cell-based cGMP assay useful for ultra-high-throughput screening and identification of modulators of the nitric oxide/cGMP pathway. *Analyt. Biochem.* 339:104-112.
- Yetik-Anacak G.**, Catravas J.D. (2006) Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vasc. Pharmacol.* 45:268-276.
- Yoshina S.**, Kuo S.C. (1978) Studies on heterocyclic compounds XXXV. Synthesis of furo[3,2-c]pyrazole cyclase reveals displacement of distal and proximal heme ligands by NO. *J. Am. Chem. Soc.* 116:4117-4118.
- Zabel U.**, Weeger M., La M., Schmidt H.H. (1998) Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem. J.* 335:51-57.
- Zabel U.**, Häusler, C., Weeger, M., Schmidt, H.H.H.W. (1999) Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. *J. Biol. Chem.* 274:18149-18152.
- Zabel U.**, Kleinschnitz C., Oh P., Nedvetsky P., Smolenski A., Müller H., Kronich P., Kugler P., Walter U., Schnitzer J.E., Schmidt H.H.H.W. (2002) Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat. Cell. Biol.* 4:307-311.
- Zhao Y.**, Marletta M.A. (1997) Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase. *Biochemistry.* 36:15959-15964.
- Zhao Y.**, Brandish P.E., Ballou D.P., Marletta M.A. (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:14753-14758.
- Zhao Y.**, Brandish P.E., DiValentin M., Schelvis J.P., Babcock G.T., Marletta M.A. (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry.* 39:10848-10854.
- Zhou Z.**, Gross S., Roussos C., Meurer S., Müller-Esterl W., Papapetropoulos A. (2004) Structural and functional characterization of the dimerization region of soluble guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 279:24935-23943.

7. Eigene Publikationen

Originalarbeiten:

Rothkegel C., Schmidt P.M., Stoll F., Schroeder H., Schmidt H.H., Stasch J.P. (2006) Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. *FEBS Lett.* 580:4205-4213.

Stasch J.P., Schmidt P.M., Nedvetsky P.I., Nedvetskaya T.Y., Kumar HS A., Meurer S., Deile M., Taye A., Knorr A., Lapp H., Mueller H., Turgay Y., Rothkegel C., Tersteegen A., Kemp-Harper B., Mueller-Esterl W., Schmidt H.H. (2006) Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* 116:2552-2561.

Kalk P., Godes M., Relle K., Rothkegel C., Hucke A., Stasch J.P., Hocher B. (2006) NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br. J. Pharmacol.* 148:853-859.

Schmidt P.M., Rothkegel C., Wunder F., Schroeder H., Stasch J.P. (2005) Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 513:67-74.

Poster und Vorträge:

Rothkegel C., Schmidt P.M., Kumar HS A., Stoll F., Lapp H., Wunder F., Schroeder H., Rinke M., Schmidt H.H.W., Stasch J.P. (2005) Beyond NO and heme: biochemical and pharmacological opportunities. BMC Meeting Abstracts: 2nd International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications. *BMC Pharmacol.* 5:S18.

Schmidt P.M., Rothkegel C., Wunder F., Stoll F., Schroeder H., Stasch J.P. (2005) Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. BMC Meeting Abstracts: 2nd International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications. *BMC Pharmacol.* 5:P49.

Schmidt P.M., Rothkegel C., Wunder F., Schroeder H., Stasch J.P. (2005) Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 371:R141.

Anhang

A

Plasmid	Primer
YCV pHA/CMV (Clontech) BsiWI Clal	5'-GCCATGGAGGCCGTACGTCCGGTCTGTG-3' 5'-GTCGGGGTCTGTATCGATCCATCGGTCTGTC-3'
YCH pHA/CMV (Clontech) BsiWI Clal	5'-GCTGTACAAGTACGTACGCGCGGGGATCC-3' 5'-GACATGATAAGATCGATTGATGAGTTTGGAC-3'
YNV pFlag/CMV-2 (Sigma) BsiWI Clal	5'-CTTGTCCCCATCGTACGGGAGTCTCAGGAG-3' 5'-GCATGAGAAATCGATTGCTGCCTC-3'
YNH pFlag/CMV-2 (Sigma) BsiWI Clal	5'-CTATATCATGGCCGTACGATCCCGGGTGGC-3' 5'-GTGACCCCTCCCCAATCGATCTCCTGGC-3'
α_1-sGC pcDNA1/Amp (Invitrogen) BsiWI Clal	5'-CCACTGCAAAGCGTACGGAACACCATG-3' 5'-CATCAGGGGTAGATCGATGAGCCGCATG-3'
β_1-sGC pRNA1 (Invitrogen) BsiWI Clal	5'-CAGGCTCCGGGCGTACGGTACACCATG-3' 5'-CAGGATGAAAATCGATTGGCAGCC-3'

B

Mutation	Primer
α_1 (Δ 283 – 292) -YNV	5'-CTAGTGATCCCTACTTCGCTCCTGGACCGTGACCTGGCCATTC-3'
α_1 (Δ 363 – 372) -YNV	5'-GTGAAGAAATCTTCAAGGGTTGTTGAATCCAGTGCCATCTTGTTCC-3'
α_1 (Δ 372 – 383) -YNV	5'-TCAAAGGTCAAATGATCTACATCTCGCCGTGTGTGGACAGATTGG-3'
α_1 (Δ 383 – 392) -YNV	5'-GTGCCATCTTGTCTTAGGGACAGGACGGGTCTCTATCTG-3'
α_1 (Δ 393 – 402) -YNV	5'-GTGGACAGATTGGAAGATTTCCCGATTATAATGCCCTGAGG-3'
α_1 (Δ 403 – 412) -YNV	5'-CGGGGTCTCTATCTGTCTGACATCTTGATAGGGGAACAGGCACGG-3'
α_1 (Δ 413 – 422) -YNV	5'-CATAATGCCCTGAGGGATGTTGTGCGCCCTCAAGAAGAGGTTGGG-3'
α_1 (Δ 440 – 449) -YNV	5'-CCTTGGAGCATGCCACCAAGTAGATCTCCTGTGTTCTATC-3'
α_1 (Δ 450 – 459) -YNV	5'-GAGGAGGAGAAGAAGAAGACGGAGGTTGCTCAGCAGCTCTGGC-3'
α_1 (Δ 460 – 469) -YNV	5'-CTGTGTTCTATCTTCCCTCTATTGTGCAAGCCAAGAAGTTC-3'
α_1 (Δ 470 – 479) -YNV	5'-CAGCAGCTCTGGCAAGGACAAACCATGCTCTTCTCAGATATC-3'
β_1 (Δ 212 – 222) -YCV	5'-GACTCCCGTATCAGCCCGTACATATTTGACCGGGACCTAGTAG-3'
β_1 (Δ 212 – 222) -YCV	5'-GACTCCCGTATCAGCCCGTACATATTTGACCGGGACCTAGTAG-3'
β_1 (Δ 304 – 313) -YCV	5'-CTGGGGCAGAGATTAGCTGCCCGGAAGCAGATAGCATCCTC-3'
β_1 (Δ 314 – 323) -YCV	5'-CAAAGGCCAAATGATCTATTTATCACCAAGTGTGATGAACCTG-3'
β_1 (Δ 324 – 333) -YCV	5'-GATAGCATCCTCTTCTCTGTACAAGAAGAGGCCTGTACCTG-3'
β_1 (Δ 334 – 343) -YCV	5'-GTGATGAACCTGGATGACCTACCTCTCCATGATGCTACACGAG-3'
β_1 (Δ 344 – 353) -YCV	5'-GAGGCCTGTACCTGAGTGACATCCTTTTGGGAGAACAGTTCCGG-3'
β_1 (Δ 354 – 363) -YCV	5'-GATGCTACACGAGACCTGGTCAACTGACACAAGAGCTGGAAATC-3'
β_1 (Δ 381 – 390) -YCV	5'-CAGGCTGCAGCTCACACTGGACACATTGCTATATTCTGTTC-3'
β_1 (Δ 391 – 400) -YCV	5'-GAGGATGAGAAGAAAAAGACATCTGTTGCCAATGAGCTGAGAC-3'
β_1 (Δ 401 – 410) -YCV	5'-CTATATTCTGTTCTCCCTCCACCAGTGCCGGCCAAAAGATAC-3'
β_1 (Δ 411 – 420) -YCV	5'-CAATGAGCTGAGACACAAGCGTACCATCCTCTTCAGTGGCATTGTG-3'

Tabelle A: Primersequenzen, die zur Einführung einer BsiWI und Clal Schnittstelle in die jeweiligen Vektoren verwendet wurden (s. 2.6.5).

Tabelle B: Primersequenzen für die unter 3.2.2 beschriebenen Deletionsmutanten.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, allen die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, zu danken. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. Johannes-Peter Stasch bei Bayer HealthCare, Wuppertal, für die Überlassung des spannenden Themas der löslichen Guanylatcyclase danken. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die außerordentlich produktive und vertrauensvolle Zusammenarbeit, für unzählige motivierende Diskussionen und für seine stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Henning Schröder, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, bin ich für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit und für seine wertvollen Hinweise zu Dank verpflichtet. Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schröder, die mir immer mit Rat und Hilfe zur Seite standen.

Herrn Dr. Martin Bechem, Leiter des Instituts für Herz-Kreislauf-Forschung von Bayer HealthCare, Wuppertal, danke ich für die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit dort anfertigen durfte.

Folgenden Laborleitern spreche ich einen ganz besonderen Dank aus für die erfolgreichen Kooperationen, die mich im Gelingen meiner Arbeit unterstützt haben: Dr. Frank Wunder für die Generierung der cGMP-Reporterzelle und für die Einführung in die Methodik der stabilen Transfektion, Frau Dr. Friederike Stoll für die Konstruktion des Homologiemodells und Dr. Derek Atkins für die Einführung in die konfokale Lasermikroskopie.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Vorgänger Dr. Peter Schmidt, Monash-University Melbourne, der sich selbst aus „down-under“ die Zeit genommen hat, meine Fragen geduldig und ausführlich zu beantworten.

Meinen Laborkollegen Yvonne Keim, Ralf Hartkopf, Andreas Hucke und Karl-Heinz Augstein möchte ich für das sehr gute Arbeitsklima und für die dauerhafte Unterstützung meiner Arbeit danken. Ein ganz besonderer Dank geht hierbei an Yvonne Keim, die mir die gemeinsame Zeit im Ecklabor des C-Bereiches sehr angenehm gestaltete. Darüber hinaus danke ich auch meinen Pharmazie-Praktikanten Klara Dielmann, Ahmed Nour, Thao-Vi Dao, Stefanie Berhausen, Markus Milde, Anna Kebig und Uta Mletzko für die technische Unterstützung.

Ganz persönlich will ich mich bei meiner lieben Ma bedanken, die sich, trotz völliger Unkenntnis der Thematik, die Zeit genommen hat, meine Komma- und Rechtschreibfehler zu verbessern. Auch danke ich Mark für seine stetigen Aufmunterungen.

Last but not least sage ich allen Mitarbeitern des Gebäudes 500 des Pharmaforschungszentrums von Bayer HealthCare in Wuppertal Dank, dass sie mich sehr freundlich aufgenommen und immer im Fortkommen meiner Arbeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Christiane Romana Rothkegel
Geburtsdatum: 30.03.1979
Adresse: Holzstr. 3, 64283 Darmstadt
Geburtsort: Bonn

Eltern: Ingrid Rothkegel, geb. Scharr
Dr. Christoph Rothkegel

Schulischer Werdegang:

1985 - 1989 Schlossbachgrundschule, Bonn
1989 - 1995 Liebfrauenschule, Bonn
1995 - 1996 Beechwood Sacred Heart, Royal Tunbridge Wells, U.K.
1996 - 1998 Liebfrauenschule, Bonn
Abitur: Juni 1998
Preis für das beste Abitur der Schule im Fach Chemie

Beruflicher Werdegang:

Oktober 1998 - Oktober 2002 Pharmaziestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
April 1999 Famulatur Krankenhausapotheke St. Elisabeth Krankenhaus, Neuwied
September 1999 Famulatur Apotheke am Romanplatz, München
Januar 1999 - November 2002 Werkstudent Boston Consulting Group, München
November 2002 - April 2003 Pharmaziepraktikum Nibelungen-Apotheke, München
Mai 2003 - Oktober 2003 Pharmaziepraktikum Bayer HealthCare, Wuppertal
Dezember 2003 Approbation zur Apothekerin
Seit Dezember 2003 Doktorand Bayer HealthCare, Wuppertal, Herz-Kreislauf-Forschung, Thema: „*Molekularbiologische und pharmakologische Untersuchungen zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase*“ unter Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Johannes-Peter Stasch und Prof. Dr. Henning Schröder an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Dezember 2003 - März 2007 Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation unter Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Johannes-Peter Stasch, Bayer HealthCare
Dezember 2006 Forschungspreis von Bayer HealthCare
März 2007 Fachapothekerin für Arzneimittelinformation