

# **Die Rolle der löslichen Guanylatzyklase in der Signaltransduktion durch Superoxidanionradikale**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich für Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Oliver Wingerter  
aus Speyer

Frankfurt 2005  
(DF1)

vom Fachbereich für Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dr. E. Mutschler  
Prof. Dr. A. Mülsch

Datum der Disputation: 08.06.2005

# Inhalt

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>STICKSTOFFMONOXID (<math>\text{NO}</math>)</b> .....	<b>6</b>
1.1	<i>Chemische Eigenschaften und Reaktionen von <math>\text{NO}</math></i> .....	7
1.2	<i>NO-Synthesen</i> .....	9
<b>2</b>	<b>GUANYLATZYKLASE</b> .....	<b>10</b>
2.1	<i>Die partikuläre Guanylatzyklase</i> .....	10
2.2	<i>Die lösliche Guanylatzyklase</i> .....	11
<b>3</b>	<b>ZYKLISCHES GUANOSINMONOPHOSPHAT</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>SUPEROXIDANIONRADIKAL (<math>\text{O}_2^-</math>)</b> .....	<b>22</b>
4.1	<i>Chemische Eigenschaften und Reaktionen von <math>\text{O}_2^-</math></i> .....	22
4.2	<i>Biologische Bedeutung von <math>\text{O}_2^-</math></i> .....	24
4.3	<i>Enzymatische Entstehung von Superoxid</i> .....	26
4.4	<i>Vaskuläre Effekte gesteigerter Superoxidproduktion</i> .....	28
<b>5</b>	<b>HYPOTHESE UND AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>30</b>
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>32</b>
1.1	<i>Substanzen</i> .....	32
1.2	<i>Antikörper (AK)</i> .....	35
1.3	<i>Zellen</i> .....	35
1.4	<i>Plasmide</i> .....	36
1.5	<i>Escherichia-coli (E.-coli)</i> .....	36
1.6	<i>Stammlösungen</i> .....	37
1.7	<i>Diverse Verbrauchsmaterialien</i> .....	38
1.8	<i>Geräte</i> .....	39
1.9	<i>Lösungen und Puffer</i> .....	40
<b>2</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>43</b>
2.1	<i>Tierspezies und Haltungsbedingungen</i> .....	43
2.2	<i>Zellkultur</i> .....	43
2.3	<i>Isolierung und Inkubation von Gefäßsegmenten</i> .....	45
2.4	<i>Proteinextraktion</i> .....	46
2.5	<i>Bestimmung der Guanylatzyklase-Aktivität</i> .....	48
2.6	<i>Gel-Elektrophorese und Immunoblotting (Westernblot)</i> .....	51
2.7	<i>Amplifikation der Plasmide</i> .....	53
2.8	<i>Transiente Transfektion von COSI-Zellen</i> .....	55
2.9	<i>Bestimmung von Sauerstoffradikalen</i> .....	56
2.10	<i>Nachweis von Sulfinylradikalen</i> .....	61
2.11	<i>cGMP-Enzym-Immuno-Assay (cGMP-EIA)</i> .....	61
2.12	<i>Computerprogramme</i> .....	63
2.13	<i>Statistische Bewertung der Versuchsergebnisse</i> .....	64

<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>65</b>
<b>1</b>	<b>SGC-AKTIVITÄTSMESSUNGEN</b>	<b>65</b>
1.1	Hemmung der sGC-Aktivität durch Superoxid	65
1.2	Hemmung der sGC-Aktivität ist mit SOD reversibel	67
1.3	Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die sGC-Aktivität	68
1.4	Hemmung der sGC in Gewebe- und Zell-Homogenaten	69
<b>2</b>	<b>SUPEROXIDMESSUNGEN</b>	<b>70</b>
2.1	In-vitro-Superoxidmessung mit der Cytochrom-c-Methode	70
2.2	Nachweis von Superoxid in-vivo mit ESR	71
2.3	<sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Nachweis in glatten Gefäßmuskeln mit Lucigenin	75
<b>3</b>	<b>HEMMUNG DER SGC-AKTIVITÄT DURCH <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> IN-VIVO</b>	<b>76</b>
3.1	Nachweis der sGC-Hemmung durch <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> in VSMC (cGMP-EIA)	76
3.2	Nachweis der sGC-Hemmung durch <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> in Rattenaortenringen (VASP)	78
<b>4</b>	<b>EINFLUSS DES „UMWELT-<sup>•</sup>NO“ AUF DIE SGC-HEMMUNG DURCH <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>MECHANISMUS DER SGC-INHIBITION DURCH SUPEROXID</b>	<b>83</b>
5.1	Einfluss des Häm der sGC auf die Hemmung durch Superoxid	83
<b>6</b>	<b>BEDEUTUNG DER MODIFIKATION VON SGC-CYSTEINEN FÜR DIE HEMMUNG DER SGC DURCH <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>85</b>
6.1	Messungen von Sulfinyl-Radikalen mit ESR	85
6.2	Einfluss eines Austausches von Cystein α238 und β1541 gegen Serin auf die Hemmung der sGC durch <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	87
6.3	Rolle von Kupfer bei der Superoxid-induzierten Hemmung der sGC	89
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>92</b>
<b>1</b>	<b>HEMMUNG DER SGC-AKTIVITÄT DURCH <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> IN VITRO</b>	<b>92</b>
1.1	Aufhebung der Hemmung durch SOD	93
1.2	Reversible Modifikation der sGC	94
1.3	Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	94
1.4	Hemmung der löslichen Guanylatzyklase in Homogenaten	95
<b>2</b>	<b>BESTIMMUNG DER SUPEROXIDPRODUKTION IN-VITRO UND IN-VIVO</b>	<b>96</b>
2.1	In-vitro-Nachweis von <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Cytochrom-c)	96
2.2	In-vivo-Nachweis von <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	97
<b>3</b>	<b>IN-VIVO-HEMMUNG DER SGC DURCH <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>100</b>
3.1	Bestimmung von cGMP in VSMC und Nachweis der sGC-Hemmung durch <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	100
3.2	Auswirkung der sGC-Hemmung durch <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> auf die <sup>•</sup> NO/cGMP-Signaltransduktion	101
3.3	Biologische Bedeutung der <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -induzierten Hemmung der sGC	101
3.4	Bedeutung von Umwelt- <sup>•</sup> NO für die SOD-induzierte Aktivierung der sGC	103
<b>4</b>	<b>MOLEKULARER MECHANISMUS DER SGC-HEMMUNG DURCH <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>104</b>
4.1	Modifikation von sGC-Thiolen durch <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	104
4.2	Rolle des Häm-Eisens der sGC bei der <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Hemmung	108
4.3	Hemmung der sGC-Aktivität durch Kupfer	109
4.4	Schlussfolgerung	111
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER DISKUSSION</b>	<b>112</b>
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>114</b>

<b>VI LITERATURQUELLEN .....</b>	<b>116</b>
----------------------------------	------------

<b>VII ANHANG.....</b>	<b>130</b>
------------------------	------------

<b>1 VERZEICHNISSE .....</b>	<b>130</b>
1.1 <i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>130</i>
1.2 <i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>132</i>
1.3 <i>Formelverzeichnis.....</i>	<i>132</i>
<b>2 ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>133</b>
<b>3 PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>136</b>
3.1 <i>Posterpräsentationen .....</i>	<i>136</i>
3.2 <i>Vorträge .....</i>	<i>136</i>
<b>4 LEBENSLAUF .....</b>	<b>137</b>
<b>5 DANKSAGUNG .....</b>	<b>138</b>

### I Einleitung

Im kardiovaskulären System ist die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) ein Schlüsselenzym der  $\text{NO/cGMP}$ -Signaltransduktion. In den letzten Jahrzehnten war dieser Signaltransduktionsweg Ziel intensiver Forschung, vor allem in Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die nach wie vor in den westlichen Industriestaaten die häufigste Todesursache darstellen. Eines der ältesten Herz-Kreislauf-Medikamente, das seit fast 130 Jahren angewandte Nitroglycerin, setzt nach enzymatischer Metabolisierung Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) frei, aktiviert die lösliche Guanylatzyklase zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) aus Guanosintriphosphat (guanosine triphosphate, GTP) und führt über die cGMP vermittelte Abnahme der intrazellulären Calciumionen-Konzentration zur Gefäßrelaxation und zur Reduzierung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Die Bedeutung der endogenen Produktion von  $\text{NO}$  wurde erst in den letzten Jahrzehnten entdeckt – für ihre Arbeiten zur Aufklärung der  $\text{NO/cGMP}$ -Signaltransduktion bekamen Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis Ignarro 1998 den Nobelpreis für Medizin.

Ein weiteres Radikal, das Superoxidanionradikal ( $\text{O}_2^-$ ), steht zunehmend im Fokus aktueller Forschung bei der Aufklärung der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. So sind  $\text{O}_2^-$  und auch andere reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) beteiligt an der Entstehung und Progression von Herz-Kreislauf- und neurodegenerativen Erkrankungen. Nachfolgend werden die Komponenten der  $\text{NO/cGMP}$ -Signaltransduktion und die Eigenschaften und Funktionen von  $\text{O}_2^-$  im vaskulären Gewebe vorgestellt.

#### **I Stickstoffmonoxid (NO)**

Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) ist ein wichtiges inter- und intrazelluläres Signalmolekül in biologischen Systemen. Das physiologische Wirkprinzip von  $\text{NO}$  wurde erst in den letzten 20 Jahren entdeckt.

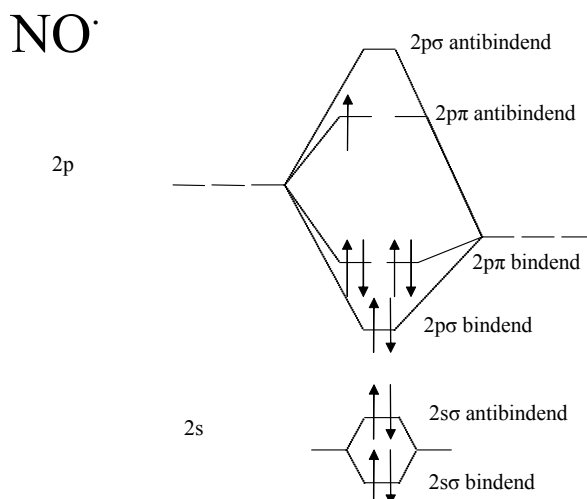
1977 wurde gezeigt, dass  $\text{NO}$  als Gas, oder freigesetzt von Vasodilatoren wie Nitroglycerin und Natrium-Nitroprussid (sodium nitroprusside, SNP), die sGC aktiviert (Schultz *et al.*, 1977; Miki *et al.*, 1977; Arnold *et al.*, 1977). Zu diesem Zeitpunkt gab es jedoch keine Hinweise auf eine endogene Produktion von  $\text{NO}$  in tierischen und menschlichen Geweben.

## Einleitung

1980 beobachtete Furchgott, dass das Endothel einen so genannten endothelium-derived relaxing factor (EDRF) freisetzt, der zur Relaxation von Blutgefäßen führt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Sechs Jahre später präsentierten Furchgott und Ignarro gleichzeitig und unabhängig voneinander experimentelle Befunde, dass es sich bei EDRF um  $\text{NO}$  handele. Diese Hypothese konnte ein Jahr später durch direkten Nachweis der  $\text{NO}$ -Bildung aus Endothelzellen bestätigt werden (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987a). Vorher schon waren die Stoffwechselprodukte von  $\text{NO}$  in Form von Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) im menschlichen und tierischen Organismus nachgewiesen worden (Green *et al.*, 1981; Wagner *et al.*, 1983).

### 1.1 Chemische Eigenschaften und Reaktionen von $\text{NO}$

$\text{NO}$  ist ein relativ stabiles freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron in einem anti-bindenden Molekülorbital (Abbildung 1). Dies hat zwei wichtige Konsequenzen. Einerseits kann  $\text{NO}$  nicht dimerisieren (antibindendes Orbital), andererseits haben  $\text{NO}$  und seine Produkte, die aus Reaktionen mit Partnern mit gesättigter Elektronenzahl hervorgehen, paramagnetische Eigenschaften.



**Abbildung 1: Molekülorbitalschema des  $\text{NO}$**

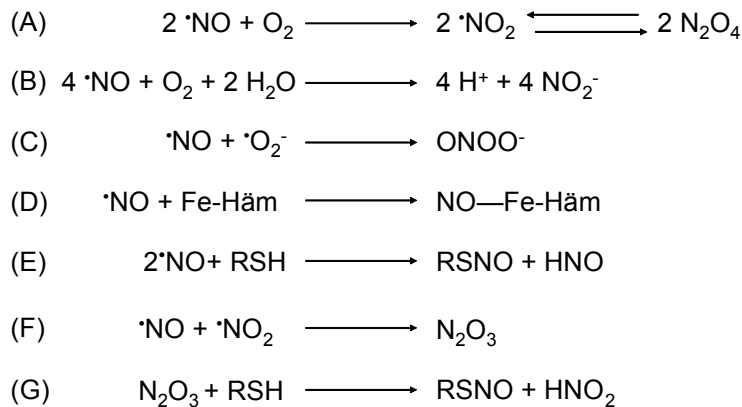
In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff reagiert  $\text{NO}$  zu braunem, gasförmigem  $\text{NO}_2$  (Abbildung 2 A). Das Hauptabbauprodukt von  $\text{NO}$  in biologisch-wässrigen Systemen ist

## Einleitung

---

Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) (Lewis und Deen, 1994), das häufig als in-vivo Nachweis für  $\cdot\text{NO}$  (Griess-Reaktion) detektiert wird (Abbildung 2 B). Die biologische Halbwertszeit von  $\cdot\text{NO}$  beträgt nur wenige Sekunden (Gibson und Roughton, 1957; Wennmalm *et al.*, 1993).  $\cdot\text{NO}$  kann aber wegen seiner unpolaren und lipophilen Eigenschaft große Diffusionsstrecken von ca. 100  $\mu\text{m}$  im Gewebe zurücklegen (Beckman und Koppenol, 1996).

Mit organischen Molekülen reagiert  $\cdot\text{NO}$  aufgrund seiner Radikalstabilisierung nur langsam, sehr schnell dagegen mit anderen freien Radikalen, z.B. mit Superoxidanionradikalen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) (Abbildung 2 C). Mit Übergangsmetallen bildet  $\cdot\text{NO}$  stabile Nitrosylkomplexe; ein Beispiel dafür ist die Bildung des Nitrosyl-Hämeisen-Komplex (Abbildung 2 D) bei der Aktivierung der sGC. Daneben wird  $\cdot\text{NO}$  auch die S-Nitrosylierung zugeschrieben, obwohl neuere Arbeiten gezeigt haben, dass die S-Nitrosylierung über höher oxidierte  $\text{NO}_x$ -Spezies ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}^+$  etc.) erfolgt (Hanafy *et al.*, 2001; Beckman und Koppenol, 1996) (Abbildung 2 E, F, G). Über die S-Nitrosylierung von Proteinthiolen kann unabhängig von einer Aktivierung der sGC eine biologische Signaltransduktion ausgelöst werden. So wird zum Beispiel angenommen, dass durch S-Nitrosylierungen das Proto-Onkogen p21ras aktiviert wird (Lander *et al.*, 1997; Lander *et al.*, 1995) und Caspasen inhibiert werden (Li *et al.*, 1997).



**Abbildung 2: Metabolismus von  $\cdot\text{NO}$**



### 1.2 NO-Synthasen

Im menschlichen Organismus dient  $\text{NO}$  zum einen als Signalmolekül und zum anderen auch als Zellgift bei der Phagozytose fremder Organismen durch aktivierte Makrophagen. Die enzymatische Produktion von  $\text{NO}$  erfolgt hierbei über  $\text{NO}$ -Synthasen. Diese katalysieren die Redoxreaktion aus reduziertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), L-Arginin und molekularem Sauerstoff zu  $\text{NO}$  und L-Zitrullin (Hevel *et al.*, 1991; Knowles und Moncada, 1994). Hierbei handelt es sich um Homodimere mit einem charakteristischen Hämeisen-Komplex, deren katalytische Aktivität von den Elektronen-übertragenden Kofaktoren Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mono-Nukleotid (FMN) und dem für die Dimerisierung wichtigen Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) abhängig ist (Marletta, 1994). In Säugetierzellen wurden bisher drei Isoformen der NOS nachgewiesen, die sich nicht nur aufgrund ihrer Verteilung, sondern auch durch ihre unterschiedliche Abhängigkeit von intrazellulärem Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und in ihrem Expressionsprofil unterscheiden (Förstermann *et al.*, 1991). Es handelt sich um die neuronale NOS (nNOS, Typ I), die induzierbare NOS (iNOS, Typ II) und die endotheliale NOS (eNOS, Typ III) (Nathan und Xie, 1994). Sowohl die nNOS als auch die eNOS werden konstitutiv exprimiert, während die Expression der iNOS über transkriptionelle Induktion durch Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxin) erfolgt.

Die eNOS ist hauptsächlich in den Endothelzellen lokalisiert und wird aktiviert durch rezeptorabhängige Agonisten wie Bradykinin und Acetylcholin, oder durch physiologisch-physikalische Stimulation (Schubspannung des strömenden Blutes, pulsatile Dehnung).

Wichtige akute Funktionen des endothelialen  $\text{NO}$  sind unter anderem die lokale Blutgefäßtonus-Regulation, die Organdurchblutung, die Endothelpermeabilität und Endothelwachstum sowie die Blutgerinnung (Moncada und Higgs, 1993). Langfristig schützt es die Gefäßwand als antiatherogenes Molekül vor atherosklerotischen Veränderungen und der so genannten endothelialen Dysfunktion (Cai und Harrison, 2000).

## 2 Guanylatzyklase

Die Guanylatzyklasen (guanylyl cyclase, GC) stellen zusammen mit den Adenylatzyklasen (adenylyl cyclase, AC) die Gruppe der Nukleotidzyklasen dar, welche die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) bzw. Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem 3', 5'-Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) bzw. zu zyklischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) katalysieren.

Nach der Entdeckung des cAMP als Botenmolekül bei der Regulation vieler wichtiger Zellfunktionen (Rall und Sutherland, 1958) folgte die Entdeckung von cGMP (Ashman *et al.*, 1963). Das cGMP und die GC-Aktivität wurden in der Folge in verschiedenen Zellextrakten sowohl in den löslichen als auch in den partikulären Fraktionen entdeckt (Hevel *et al.*, 1991; Ishikawa *et al.*, 1969; Hardman und Sutherland, 1969; Goldberg *et al.*, 1969). Der Nachweis der unterschiedlichen GC-Aktivität in der löslichen und in der partikulären Fraktion deutete auf das Vorhandensein unterschiedlich lokalisierter Enzyme hin (Kimura und Murad, 1974; Garbers und Gray, 1974), was daraufhin zur Einteilung der Guanylatzyklase - abhängig von der subzellulären Verteilung - in zwei Gruppen führte:

- partikuläre GC (2.1)
- lösliche GC (2.2)

### 2.1 Die partikuläre Guanylatzyklase

Die partikuläre GC (pGC) ist ein membranständiges Enzym und besteht aus einer peptidbindenden extrazellulären Domäne am N-Terminus, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne. Von den bisher sieben identifizierten Subtypen der pGC (GC-A bis GC-G) sind nicht alle Peptid-Liganden bekannt (Denninger und Marletta, 1999). Gut charakterisiert sind die an GC-A und GC-B bindenden natriuretischen Peptid-Liganden: das Atriale-Natriuretische-Peptid (ANP), das B-Typ-Natriuretische-Peptid (BNP) und das C-Typ-Natriuretische-Peptid (CNP). Sie sind beteiligt an der Natriuresis und an der Steuerung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Die Liganden Guanylin und Uroguanylin binden an GC-C und sind an der Flüssigkeitsregulation im Darm beteiligt. Weitere Subtypen der pGC sind die GC-D im olfaktorischen Neuroepithelium und die GC-E bzw.

GC-F in der Retina. Die GC-G ist dem natriuretischen Peptid-Rezeptor strukturell ähnlich und wird in Darm, Lunge und Skelettmuskulatur exprimiert. Die Subtypen GC-D bis GC-G werden als „orphan receptors“ bezeichnet, weil bisher noch keine aktivierenden Liganden gefunden wurden (Lucas *et al.*, 2000).

## 2.2 Die lösliche Guanylatzyklase

Die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) ist im Zytoplasma fast aller Säugetierzellen lokalisiert und reguliert wichtige physiologische Prozesse, wie z.B. die Inhibition der Plättchenaggregation (Buechler *et al.*, 1994), die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Warner *et al.*, 1994), die neuronale Signaltransduktion und die Immunmodulation (Collier und Vallance, 1989; Jaffrey und Snyder, 1995).

Die Reinigung der sGC aus der löslichen Fraktion von Zellextrakten ermöglichte die Charakterisierung des Enzyms. So konnte in Rinder- und Rattenlungen gezeigt werden, dass die sGC aus einem Heterodimer mit einer  $\alpha$ -Untereinheit von ca. 73 bis 82 kDa und einer  $\beta$ -Untereinheit von ca. 70 kDa besteht (Kamisaki *et al.*, 1986; Gerzer *et al.*, 1981). Die Aufklärung der Primärsequenz und die Isolierung als gereinigtes Enzym aus zahlreichen tierischen Geweben (Kamisaki *et al.*, 1986; Koesling *et al.*, 1988; Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1990; Humbert *et al.*, 1990) führte zur Entdeckung verschiedener Untereinheiten mit zum Teil gewebespezifischer Verteilung und entwicklungsabhängiger Expression. Die wichtigsten Untereinheiten sind  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$  (Denninger und Marletta, 1999; Koesling und Friebe, 1999). Die Sequenzanalysen zeigten eine katalytische Domäne in jeder Untereinheit, aber in Zellkulturexperimenten konnte nur bei einer Koexpression einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit ein funktionelles Enzym erhalten werden, was für eine essenzielle Heterodimerbildung spricht (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991). Im menschlichen Organismus besteht das häufigste Heterodimer aus einer  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit (Budworth *et al.*, 1999).

### 2.2.1 Aufbau

Ein schematischer Aufbau der Untereinheiten der sGC ist in Abbildung 3 dargestellt. Drei Domänen werden innerhalb der Polypeptidkette unterschieden:

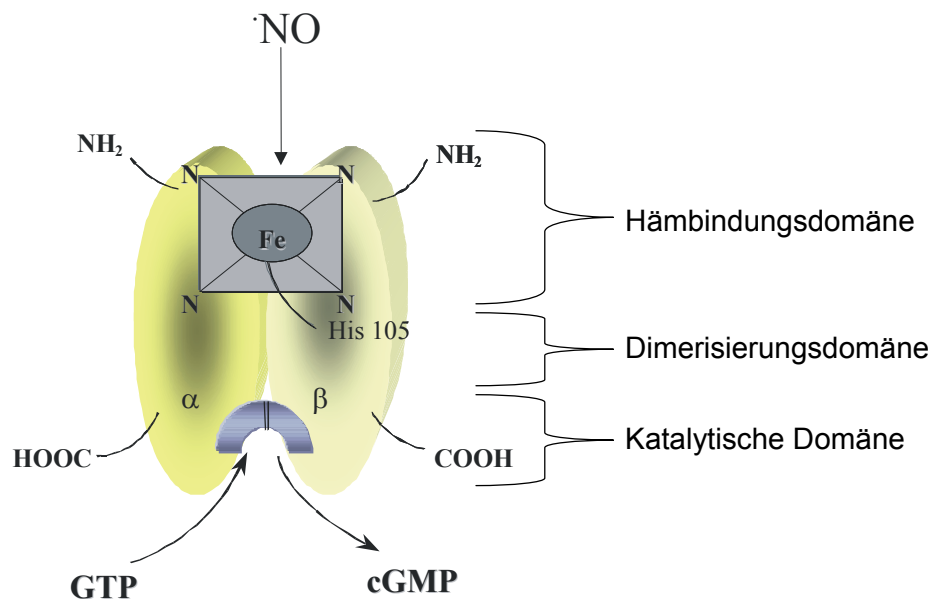
- C-terminale, katalytische Domäne
- Dimerisierungsdomäne
- N-terminale Hämbindungsdomäne

Am Häm-Eisen der sGC bindet  $\text{NO}$  und beschleunigt durch nachfolgende Konformationsänderungen des Enzyms die Umsetzung von GTP zu cGMP durch Erhöhung von  $V_{\max}$  und Verminderung von  $K_M$ . Die Stöchiometrie dieser prosthetischen Häm-Gruppe innerhalb des Enzyms war lange umstritten (Gerzer *et al.*, 1981; Stone und Marletta, 1995). Durch neuere Untersuchungen gilt es aber als erwiesen, dass die sGC nur eine prosthetische Häm-Gruppe pro Gesamtzym besitzt. Mittels spektroskopischer Untersuchungen (Gerzer *et al.*, 1981; Stone und Marletta, 1994; Deinum *et al.*, 1996) und Aktivitätsassays an mutierten sGC-Varianten (Wedel *et al.*, 1994) war es möglich, die Bindungsstelle der prosthetischen Häm-Gruppe an der sGC aufzuklären. So zeigt gereinigte sGC einen Soretpeak bei 431 nm und eine breite  $\alpha/\beta$ -Bande bei 562 nm und damit ein charakteristisches Spektrum analog zum fünffach koordinierten Histidyl-Komplex des Deoxyhämoglobins und des Deoxymyoglobins. Das Histidin in der Position 105 der  $\beta_1$ -Untereinheit konnte als axialer Ligand der prosthetischen Häm-Gruppe identifiziert werden, zum einen durch Austausch dieses Histidins gegen Phenylalanin, was zum Verlust der Häm-Gruppe führte (Wedel *et al.*, 1994), und zum anderen durch spektroskopische Untersuchungen (Zhao *et al.*, 1998a). Die Bindung der prosthetischen Häm-Gruppe an der  $\beta_1$ -Untereinheit scheint aber für die Übertragung des  $\text{NO}$ -Signals zur katalytischen Domäne nicht allein verantwortlich zu sein. Auch die Häm-Bindungsdomäne der  $\alpha_1$ -Untereinheit ist bei der  $\text{NO}$ -Signalübertragung zur katalytischen Domäne involviert, was Aktivitätsmessungen an einer N-terminalen Deletionsmutante der  $\alpha_1$ - Untereinheit mit fehlender Häm-Bindungsdomäne zeigten (Wedel *et al.*, 1995).

An der katalytischen Domäne der sGC findet die Umsetzung von GTP zu cGMP statt. Bei der sGC ist die katalytische Domäne im C-terminalen Bereich lokalisiert, wie eine Ko-Expression von  $\text{NH}_2$ -terminalen Deletionsmutanten der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ - Untereinheit zeigen konnte (Wedel *et al.*, 1995). In ihrer Struktur ähneln sich die katalytischen Zentren der sGC, AC und pGC. Auch der Sequenzvergleich der Zyklopen weist auf einen gemeinsamen evolutionären Vorgänger hin (Denninger und Marletta, 1999). Die Ähnlichkeit der katalytischen Zentren der Zyklopen zeigt sich auch darin, dass basierend auf der Kristallstruktur der AC, spezifisch eingeführte Mutationen zu einer Veränderung der Nukleotid-Spezifität und damit zu einer  $\text{NO}$ -

## Einleitung

sensitiven AC (Hurley, 1998) führten. Ebenso kann die sGC in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen anstelle von  $Mg^{2+}$ -Ionen aus ATP cAMP bilden (Gerzer *et al.*, 1981).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der löslichen Guanylatzyklase**

### 2.2.2 Aktivierung

$\cdot NO$  ist der wichtigste Aktivator der sGC. Es führt bei gereinigtem Enzym zu einer bis zu 400-fachen Aktivitätssteigerung (Denninger und Marletta, 1999; Koesling und Friebe, 1999). Dabei bindet  $\cdot NO$  an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Häm-Gruppe. Nach einem kurzen, sechsfach koordinierten Übergangszustand wird die Bindung der Häm-Gruppe an das Histidin 105 der  $\beta_1$ -Untereinheit gelöst (Stone und Marletta, 1995; Sharma und Magde, 1999) und ein fünffach koordinierter Nitrosyl-Eisen-Komplex ausgebildet (Abbildung 4). Die  $\cdot NO$ -unabhängige Aktivierung der sGC mit Protoporphyrin IX (PIX) unterstützt dieses Aktivierungsmodell. PIX aktiviert die sGC durch Austausch des sGC-Häms in der Häm-Bindungs-tasche ohne Bindung an das Histidin 105 (Ignarro *et al.*, 1982). Damit scheint die Lösung der axialen Histidin-Bindung zum Häm für eine effektive katalytische Aktivierung notwendig zu sein.

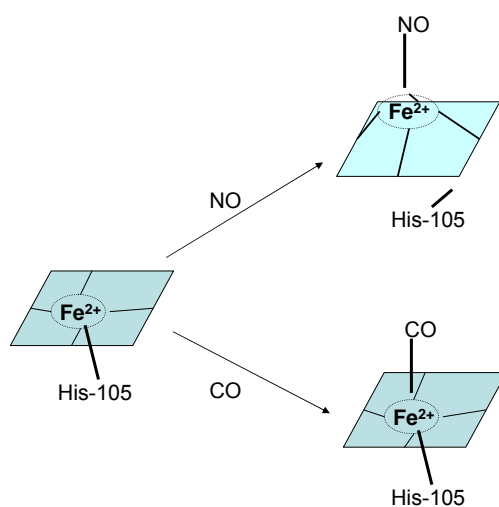
Kohlenstoffmonoxid (CO), ein physiologisches Produkt von Häm-Oxygenasen, aktiviert die sGC unter Beibehaltung des hexakoordinierten Histidin-Eisen-Komplexes (Burstyn *et al.*, 1995) (siehe auch Abbildung 4). Die schwache, maximal fünffache Aktivierung der sGC (Brüne *et al.*, 1990) kann durch Zugabe von 3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl-1-benzylindazol]

## Einleitung

---

(YC-1) potenziert werden und zu einer  $\text{NO}$ -ähnlichen Aktivierung der sGC führen (Friebe *et al.*, 1998a; Friebe *et al.*, 1996). Diese Beobachtung führte zur Annahme, dass die Lösung der Histidin-Häm-Bindung für eine maximale Aktivierung nicht zwingend notwendig ist (Stone und Marletta, 1998).

Neue Daten sprechen für ein modifiziertes Modell der  $\text{NO}$ -Aktivierung. Bei diesem Modell ist der Übergang vom hexa- zum pentakoordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex abhängig von der  $\text{NO}$ -Konzentration. Es wird postuliert, dass neben der Nitrosyl-Häm-Bindung eine regulative  $\text{NO}$ -Bindung in der sGC stattfindet. Dieses Modell ist momentan Gegenstand kontroverser Diskussionen (Ballou *et al.*, 2002; Bellamy *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1999).



**Abbildung 4: Bindung von  $\text{NO}$  an das Häm-Eisen der löslichen Guanylatzyklase (Koesling und Friebe, 1999)**

### 2.2.3 Deaktivierung

Der Nitrosyl-Häm-Komplex der sGC zeigte in spektroskopischen Untersuchungen eine viel kleinere Halbwertszeit (ca. 2 min) als andere Nitrosyl-Häm-Komplexe (z.B. Hämoglobin) (Kharitonov *et al.*, 1997a; Kharitonov *et al.*, 1997b; Sharma und Ranney, 1978). Isometrische Kontraktions- und Relaxationsversuche mit isolierten Aortenringen führten zur Erkenntnis, dass die sGC in-vivo sogar 1 bis 2 Minuten nach dem ersten Stimulus wieder aktiviert werden konnte (Palmer *et al.*, 1987b). Dieser Befund wies auf eine viel schnellere Deaktivierung der sGC hin und führte zu verschiedenen Hypothesen. Einerseits sollen kleine Moleküle, z.B. MgGTP (Kharitonov *et al.*, 1997b; Kharitonov *et al.*, 1997a) oder niedermolekulare Thiole (Brandish *et al.*, 1998) für die schnelle Dissoziation des Nitrosyl-Häm-Komplexes der sGC

in-vivo verantwortlich sein. Andererseits sprechen neueste Beobachtungen für die Hypothese einer Desensitivierung innerhalb der  $\text{NO/cGMP}$ -Signaltransduktion durch posttranslationale Modifikation der sGC oder durch veränderte cGMP-Degradation durch die cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen (Mullershausen *et al.*, 2001). Bellamy und Kollegen konnten eine schnelle  $\text{NO}$ -induzierte Desensitivierung der sGC-Aktivität innerhalb weniger Sekunden beobachten (Bellamy *et al.*, 2002).

### **2.2.4 Modulation der Enzymaktivität**

Eine notwendige Voraussetzung für die sGC-Aktivität ist, wie bei allen Nukleotidzyklasen, die Komplexbildung der Nukleotidtriphosphate mit zweiwertigen Ionen. Diese ist notwendig für die Bindung der Substrate an die katalytische Region der Zyklasten (Waldman und Murad, 1987). Biologisch am wichtigsten ist das Metall-Ion Magnesium<sup>2+</sup> ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Experimentell wird auch Mangan<sup>2+</sup> ( $\text{Mn}^{2+}$ ) eingesetzt. In Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  ist eine basale Aktivität der sGC messbar, die 400-fach durch Ligandenbindung stimuliert werden kann (Kimura *et al.*, 1976). In Gegenwart von  $\text{Mn}^{2+}$  steigt die basale sGC-Aktivität stark an, gleichzeitig nimmt die Aktivierbarkeit durch Ligandenbindung stark ab (Lucas *et al.*, 2000; Kimura und Murad, 1974). Ein neuer Modulationsmechanismus der sGC wird mit Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) beschrieben. So bewirkte  $\text{Ca}^{2+}$  (Kazerounian *et al.*, 2002) eine direkte Hemmung der basalen und  $\text{NO}$ -stimulierten sGC (Parkinson *et al.*, 1999). Kazerounian und Kollegen stellten fest, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an einer hoch-affinen Stelle (nanomolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) der katalytischen Domäne die sGC allosterisch hemmen. Zusätzlich wurde beobachtet, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an einer niedrig-affinen Stelle der sGC (mikromolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration)  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen antagonistisch verdrängen (Kazerounian *et al.*, 2002).

Eine kürzlich gemachte Beobachtung weist auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Membranassoziation der sGC hin. Eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führte in Thrombozyten zu einer Translokation der sGC zur Zellmembran, gepaart mit einer verstärkten  $\text{NO}$ -Sensitivität (Zabel *et al.*, 2002).

### 2.2.5 Synthetische Aktivatoren der sGC

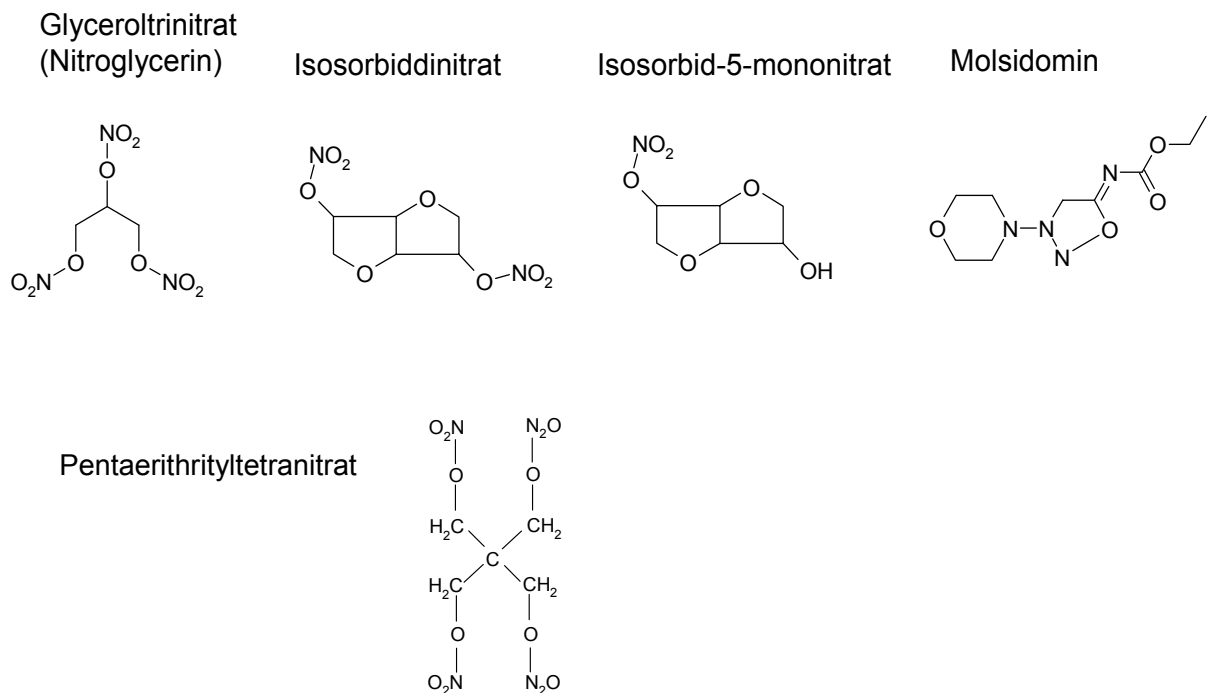
#### 2.2.5.1 $\cdot$ NO-Donoren

$\cdot$ NO-Donoren sind Substanzen, die spontan oder infolge biochemischer Prozesse  $\cdot$ NO freisetzen. Zu den  $\cdot$ NO-Donoren zählen einige seit über 100 Jahren verwendete Arzneistoffe, z.B. das Glyceroltrinitrat (Nitroglycerin, NTG), das Hering 1849 erstmals an Menschen einsetzte, und das Amylnitrit, dessen vasodilatorische Wirkung Brunton 1867 entdeckte (Marsh und Marsh, 2000). Sie bewirken primär eine Vor- und weniger eine Nachlastreduktion und verbessern durch eine Verringerung der Herzarbeit den Sauerstoffbedarf des Herzens. Durch Dilatation der großen Koronararterien führen die  $\cdot$ NO-Donoren auch zur Verbesserung des Sauerstoffangebots am Herzen. Aufgrund des günstigen hämodynamischen Profils gehören die Nitrate zu den wichtigen Arzneistoffen zur Behandlung ischämischer Koronarerkrankungen.

Organische Nitrate mit einem fünfwertigen Stickstoff sind Salpetersäureester. Zu dieser Gruppe gehören z.B. das NTG, das Isosorbiddinitrat (ISDN), das Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) und das Pentaerithryltetranitrat (PETN) (siehe Abbildung 5). Das Sydnomin-Derivat (Molsidomin) setzt als Prodrug nach Biotransformation und Ringöffnung  $\cdot$ NO frei. Die Diazeniumdiolate – auch NONOate genannt – bilden eine neue Gruppe von  $\cdot$ NO-Donoren, die über Halbwertszeiten von wenigen Sekunden bis mehreren Stunden  $\cdot$ NO freisetzen.

Die lokale Biotransformation und Freisetzung von  $\cdot$ NO aus den organischen Nitraten ist noch nicht vollständig geklärt (Fung, 2004). Nach neuesten Erkenntnissen ist eine mitochondriale Aldehyddehydrogenase an der Freisetzung von  $\cdot$ NO aus den Nitraten (Chen *et al.*, 2002) beteiligt. Das Phänomen der Nitrattoleranz, die innerhalb 24 Stunden nach Dauerapplikation organischer Nitrate eintritt, ist Gegenstand intensivster Forschung. Die vermehrte Bildung von  $\cdot$ O<sub>2</sub><sup>-</sup> und das damit verbundene Abfangen von  $\cdot$ NO wird als Grund der Nitrattoleranz zunehmend diskutiert (Münzel *et al.*, 1995; Sydow *et al.*, 2004).





**Abbildung 5: Zusammenstellung häufig verwendeter  $\cdot\text{NO}$ -Donoren**

### 2.2.5.2 $\cdot\text{NO}$ -unabhängige Aktivatoren der sGC

Neben der  $\cdot\text{NO}$ /Häm-Aktivierung über die Bildung eines Nitrosyl-Eisen-Komplexes wurden zwei neue Mechanismen der sGC-Aktivierung entdeckt, die auch Angriffspunkte neuer Pharmaka darstellen.

Das Indazolderivat 3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl-1-benzylindazol] (YC-1) aktiviert die sGC  $\cdot\text{NO}$ -unabhängig und führt zu einer 10-fachen Stimulation ohne Veränderung des Häm-Spektrums (Mülsch *et al.*, 1997; Friebe und Koesling, 1998). Die gleichzeitige Aktivierung der sGC mit  $\cdot\text{NO}$  und YC-1 bzw. mit CO und YC-1 zeigte einen starken synergistischen Effekt (Friebe *et al.*, 1996). Dem YC-1 wird die Eigenschaft als „ $\cdot\text{NO}$ -sensitizer“ zugeschrieben, der die sGC allosterisch moduliert (Friebe und Koesling, 1998). YC-1 soll eine Verlangsamung der Dissoziation des  $\cdot\text{NO}$  vom Häm der sGC bewirken (Friebe und Koesling, 1998). Es wird gegenwärtig versucht, den Mechanismus der sGC-Aktivierung durch YC-1 aufzuklären. Neuere Publikationen vermuten die Bindungsstelle des YC-1 an der katalytischen Domäne (Friebe *et al.*, 1999) oder an der Hämbindungsdomäne der sGC (Becker *et al.*, 2001a). Murad und Kollegen postulieren eine hämabhängige und hämunabhängige Aktivierung der sGC

durch YC-1 (Martin *et al.*, 2001). Die Auswirkungen von YC-1 auf die NO-Aktivierung der sGC untersuchten Lamothe und Kollegen mit punktmutierter sGC. Ihre Bindungsstudien zeigten, dass YC-1 verschiedene Interaktionen mit der sGC eingehen kann (Lamothe *et al.*, 2004).

In-vivo erzeugt YC-1 eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation (Mülsch *et al.*, 1997; Wegener und Nawrath, 1997; Galle *et al.*, 1999) und verzögert die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (Wu *et al.*, 1995; Friebe *et al.*, 1998a).

Bay 41-2272 (Becker *et al.*, 2001a) ist ein indirekter Aktivator der sGC und besitzt eine ähnliche Strukturformel wie das YC-1.

Die neuen Pharmaka HMR3448 und Bay 58-2667 zeigen im Vergleich zum YC-1 andere Aktivierungseigenschaften. Beide Substanzen aktivieren auch die hämoxidierte sGC. In Kombination mit  $\cdot\text{NO}$  kommt es nur zu einem additiven Effekt. HMR3448 und Bay 58-2667 zeigen keine Unterschiede in der Vasorelaxation von normalen und nitrattoleranten Ratten und Kaninchen und haben in-vivo ein dem NTG vergleichbares hämodynamisches Profil (Stasch *et al.*, 2002; Töpfer, 2001).

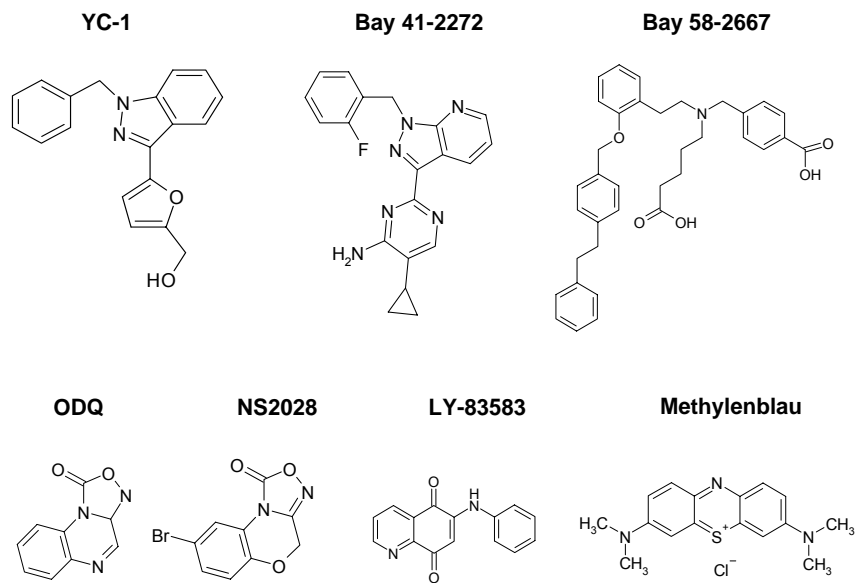
YC-1, Bay 41-2272, Bay 58-2667 und HMR3448 führten in-vivo zu Vasorelaxationen und zu verminderter Thrombozytenaggregation. Damit stellen diese Substanzen Leitstrukturen für eine neue Substanzklasse zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen dar.

### 2.2.5.3 Inhibitoren der sGC

1H-(1, 2, 4)-Oxadiazolo-(4, 3-a)-quinoxalin-1-on (ODQ) wird als selektiver Inhibitor der sGC eingesetzt (Garthwaite *et al.*, 1995; Moro *et al.*, 1996) und reagiert erst in hohen Konzentrationen unspezifisch mit anderen Hämproteinen (Feelisch *et al.*, 1999). ODQ oxidiert das Häm-Eisen der sGC (Schrammel *et al.*, 1996a) und wird hauptsächlich zur Aufklärung cGMP-abhängiger und cGMP-unabhängiger Effekte der NO/cGMP-Signaltransduktion eingesetzt (Zhao *et al.*, 1998b).

4H-8-Bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazin-1-on (NS2028) ist auch ein Inhibitor der sGC und zeigt ähnliche Eigenschaften wie ODQ (Zhao *et al.*, 1998b).

LY-83583 und Methylenblau hemmen die sGC in-vivo und in-vitro (Weissmann *et al.*, 2000; Mülsch *et al.*, 1988; Mülsch *et al.*, 1989; Laber *et al.*, 2002). Sie bewirken durch intrazelluläres Redoxcycling die Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$ , das mit  $\cdot\text{NO}$  reagiert und damit dessen Bioverfügbarkeit verringert (Hasegawa *et al.*, 2004). Diese Substanzen stehen aber auch im Verdacht, die Aktivität von  $\cdot\text{NO}$ -Synthasen zu hemmen (Mayer *et al.*, 1993).



**Abbildung 6: Synthetische Aktivatoren und Inhibitoren der sGC**

### 3 Zyklisches Guanosinmonophosphat

Das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) (Lohmann *et al.*, 1997), cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDE) (Degerman *et al.*, 1997; Houslay und Milligan, 1997) und cGMP-abhängige Ionenkanäle (Zagotta und Siegelbaum, 1996).

Die **cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK)** phosphorylieren Zielproteine als Antwort auf steigende cGMP-Konzentrationen. Die cGK phosphoryliert z.B. das 46/50-kDa Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein), das Inositoltriphosphatrezeptor-assoziierte cGMP-Kinase-Substrat (IRAG), das Phospholamban, rapB1 und die Myosin-bindende Untereinheit der Myosinphosphatase (PP1M) (Hofmann *et al.*, 2000).

VASP ist in vielen tierischen Zellen und Gewebe exprimiert, unter anderem in Thrombozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Waldmann *et al.*, 1987; Halbrugge und Walter, 1989; Reinhard *et al.*, 1992; Draijer *et al.*, 1995; Smolenski *et al.*, 1998; Ibarra-Alvarado *et al.*, 2002). VASP gehört zur Familie der Prolin-reichen Proteine und ist an der

## Einleitung

---

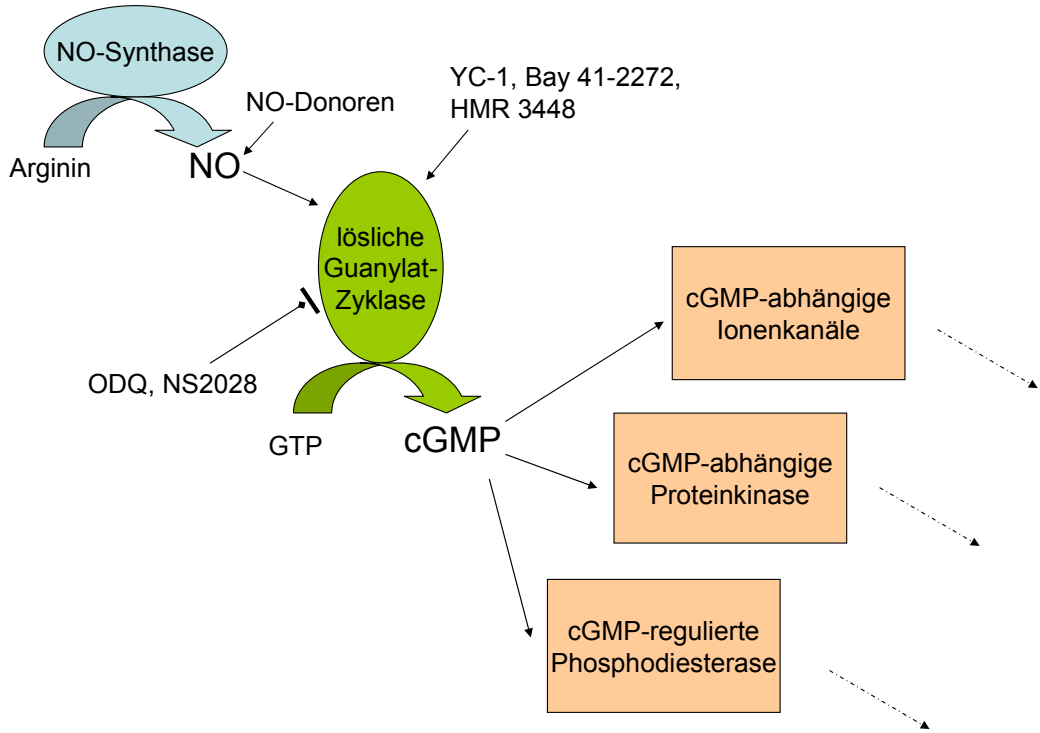
Modulation der Mikrofilamente und der Regulation der Aktin-Polymerisation beteiligt (Niebuhr *et al.*, 1997). In Thrombozyten korreliert die Phosphorylierung von VASP mit der Verhinderung der Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Horstrup *et al.*, 1994), was mit VASP-defizienten Mäusen bestätigt werden konnte (Hauser *et al.*, 1999). Die genaue Funktion von VASP in intakten Blutgefäßen ist noch weitgehend unbekannt.

Die **cGMP-regulierten Phosphodiesterasen (PDE)** katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung von cAMP bzw. cGMP zum 5'-AMP bzw. 5'-GMP und stellen die natürlichen Gegenspieler der cGMP- und cAMP-bildenden GC und AC dar. In den letzten Jahren waren die Phosphodiesterasen (PDE) Gegenstand intensiver Forschung. Die Superfamilie der Phosphodiesterasen ist sehr divers und wird in 11 Familien unterteilt, basierend auf Aminosäuresequenzen, Struktur der Domänen und katalytischen bzw. regulatorischen Eigenschaften (Maurice *et al.*, 2003). Maßgeblich beteiligt an der cGMP-vermittelten Signaltransduktion sind wegen ihrer cGMP-Substratspezifität, oder ihrer allosterischen Aktivierbarkeit durch cGMP, die PDE2, PDE5, PDE6 und PDE9. Die allosterische Inhibierung der cAMP-spezifischen PDE3 durch cGMP und die kompetitive Verdrängung von cAMP durch cGMP von der katalytischen Bindungsdomäne haben einen Einfluss auf die cAMP-Degradation und damit einen Einfluss auf die cAMP-Signaltransduktion. Die Phosphodiesterasen sind interessante Ziele der Wirkstoffentwicklung, so inhibieren Sildenafil (Viagra<sup>®</sup>) und Vardenafil (Levitra<sup>®</sup>) die PDE5 und führen über einen eingeschränkten cGMP-Abbau zur Gefäßrelaxation des Schwellkörpers und damit zur Verbesserung der erektilen Dysfunktion. Neuere Studien zeigen auch Anwendungsmöglichkeiten in der pulmonalen Hypertonie (Ghofrani *et al.*, 2003).

Die **cGMP-abhängigen Ionenkanäle** (cyclic nucleotide-gated channels, CNG) gehören zur Gruppe der zyklischen Nukleotidabhängigen Ionenkanäle und stellen spannungsregulierte Kationen-Kanäle dar. CNG bestehen aus vier Untereinheiten, die eine Pore in der Plasmamembran formen und vor allem den Einstrom von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen regulieren. Es sind fünf Isoformen der CNG bekannt (McCoy *et al.*, 1995; Frings, 1997; Misaka *et al.*, 1997; Biel *et al.*, 1999), die vor allem bei der Signalverarbeitung von Umweltreizen in der Retina und in Riech- und Geschmacksepithelien beteiligt sind.

**Einleitung**

---



**Abbildung 7: NO/cGMP-abhängige Signaltransduktion**

## 4 Superoxidanionradikal ( $\text{O}_2^-$ )

Die beinahe 30 Jahre zurückliegende Erkenntnis, dass bestimmte Stoffwechselfvorgänge der Aerobier mit der Bildung aktivierter Sauerstoffspezies, den so genannten Sauerstoffradikalen einhergehen, hat zu einem teilweise neuen Verständnis der Pathogenese einer stetig wachsenden Zahl von Erkrankungen geführt. Die mögliche Bedeutung der endogen oder exogen induzierten Sauerstoffradikalbildung bei der Entstehung und Progression des Alterungsprozesses, der Atherosklerose, der postischämischen Organschäden, des Diabetes mellitus oder verschiedener neurologischer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, ist weltweit Gegenstand aktueller Forschung.

### 4.1 Chemische Eigenschaften und Reaktionen von $\text{O}_2^-$

Molekularer Sauerstoff spielt im aeroben Stoffwechsel eine herausragende Rolle. Als Biradikal besitzt er zwei ungepaarte Elektronen mit parallelem Spin. Das Superoxidanionradikal ( $\text{O}_2^-$ ) entsteht durch eine 1-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff und stellt aufgrund seines einzelnen ungepaarten Elektrons ein paramagnetisches Molekül dar (Abbildung 8).

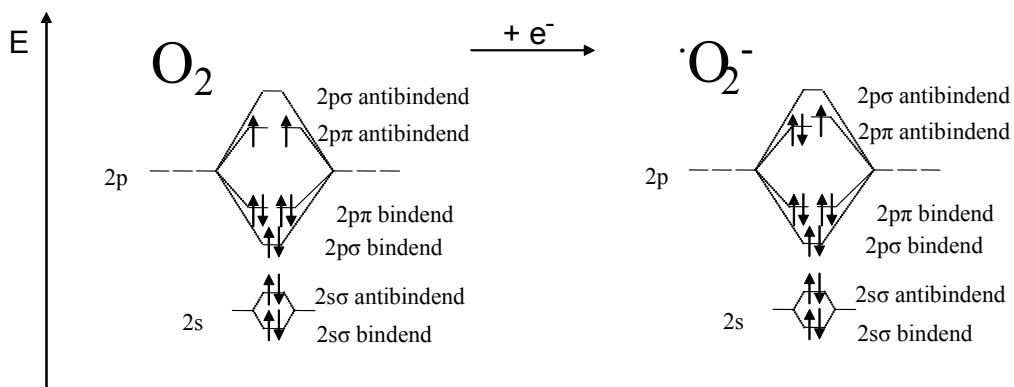
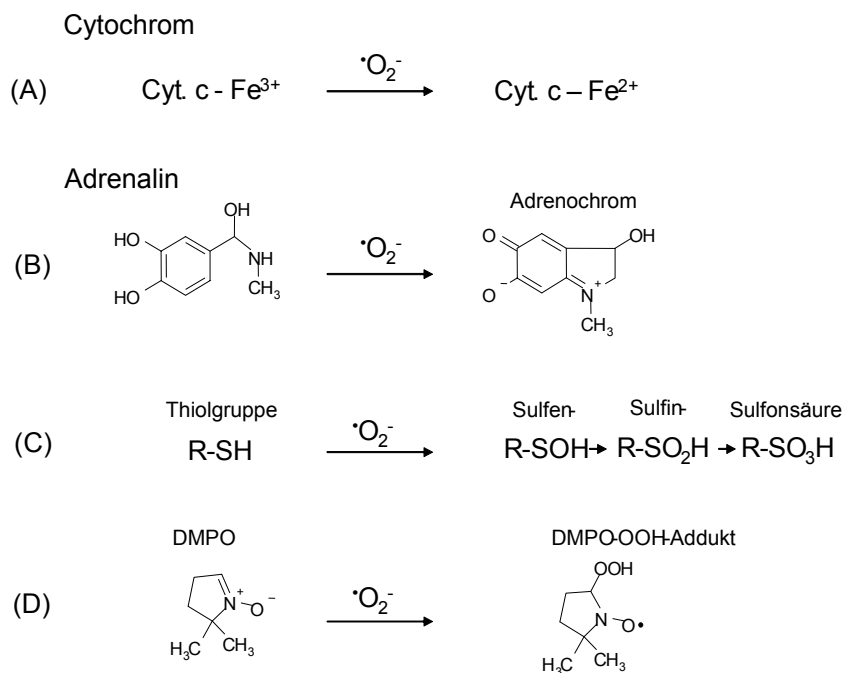


Abbildung 8: MO-Modell von  $\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$

In wässriger Lösung liegt der pKs-Wert von  $\text{O}_2^-$  und der protonierten Form bei 4,8 ( $\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HO}_2$ ). Die Geschwindigkeit der Disproportionierungsreaktion von  $\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist pH-abhängig und führt je nach Protonierungsgrad zu verschiedenen Geschwin-

## Einleitung

digkeitskonstanten (Benon *et al.*, 1985). Die Reaktionskonstante der Disproportionierung von  $\cdot\text{O}_2^-$  bei einem physiologischen pH-Wert liegt bei  $k = 8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Superoxiddismutasen (SOD) katalysieren die Disproportionierung zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit einer Reaktionskonstante von  $k = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Wolin, 2000). Die Reaktionen von  $\cdot\text{O}_2^-$  mit anderen Komponenten sind vielfältig. So ist  $\cdot\text{O}_2^-$  mit seinem Redoxpotential von  $E^\circ = 0,03 \text{ V}$  an Redoxreaktionen beteiligt und reduziert z.B. Cytochrom-c (Abbildung 9 A). Diese Reaktion dient als photometrischer Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  (siehe auch II.2.9.3). Katecholamine (Abbildung 9 B), Ascorbinsäure und Polyphenole werden von  $\cdot\text{O}_2^-$  oxidiert. Auch Thiol-Gruppen (-SH) aus Aminosäuren werden von  $\cdot\text{O}_2^-$  zu Sulfoxiden (Sulfensäure, Sulfinensäure, Sulfonsäure; Abbildung 9 C) und Disulfiden oxidiert.  $\cdot\text{O}_2^-$  kann aber auch als Nukleophil Bindungen eingehen, so zum Beispiel bei der Reaktion mit 5,5-Dimethylpyrrolin-N-oxid (DMPO) zum DMPO-OOH-Addukt (Abbildung 9 D). Diese Reaktion wird bei der Elektronenspinresonanz als Nachweis für  $\cdot\text{O}_2^-$  eingesetzt.  $\cdot\text{O}_2^-$  reagiert auch mit anderen Radikalen, so z.B. mit Stickstoffmonoxid zum Peroxynitrit.



**Abbildung 9: Reaktionen von  $\cdot\text{O}_2^-$**

### 4.2 Biologische Bedeutung von $\cdot\text{O}_2^-$

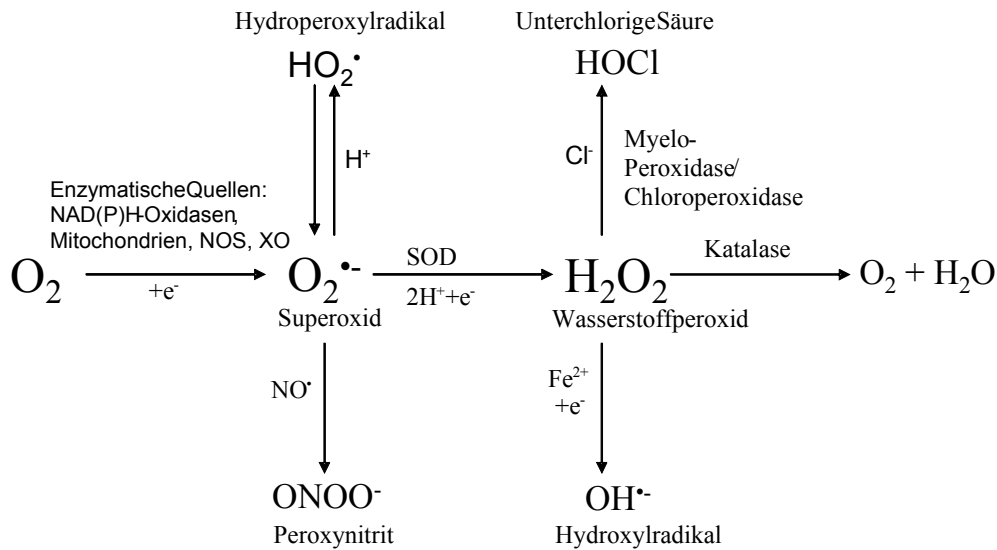
Die biologische Bedeutung von  $\cdot\text{O}_2^-$  wurde 1969 mit der Entdeckung des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase (SOD) erkannt (McCord und Fridovich, 1969a). Auch die Entdeckung der mitochondrialen Mangan-SOD (Keele, Jr. *et al.*, 1970) wies auf endogen produziertes  $\cdot\text{O}_2^-$  hin. Babior konnte 1973 nachweisen, dass aktivierte Neutrophile  $\cdot\text{O}_2^-$  zur Immunabwehr produzieren (Babior *et al.*, 1973).

In biologischen Systemen wird die Disproportionierung des  $\cdot\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  zusätzlich enzymatisch durch Superoxiddismutasen katalysiert. Im vaskulären Gewebe existieren drei Formen der SOD, eine zytosolische Kupfer/Zink-Form (CuZnSOD), eine mitochondriale Mangan-Form (MnSOD) und eine extrazelluläre Cu/ZnSOD (ecSOD). Diese halten im physiologischen Zustand die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Konzentration im subnanomolaren Bereich. In einem pathophysiologischen Zustand ist das Gleichgewicht zwischen Abbau und Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  verschoben. Es kommt dabei zum vermehrten Auftreten von  $\cdot\text{O}_2^-$  und reaktiver Sauerstoffspezies. So zeigten MnSOD-knock-out Mäuse eine geringe Lebenserwartung und verstarben innerhalb weniger Tage an dilatativer Kardiomyopathie und Funktionseinschränkung mitochondrialer Enzyme (Li *et al.*, 1995). Auch Mäuse mit einem Mangel an CuZnSOD zeigten zwar eine normale Entwicklung und Funktion von Motoneuronen, aber waren gegenüber oxidativem Stress anfällig (Reaume *et al.*, 1996). Die Mutation der CuZnSOD soll als kausaler Faktor an der amyotrophischen Lateralsklerose (ALS) beteiligt sein (Stathopoulos *et al.*, 2003).

Neben der SOD-vermittelten Reaktion zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kann  $\cdot\text{O}_2^-$  auch mit  $\cdot\text{NO}$  reagieren (Gryglewski *et al.*, 1986). Diese Reaktion führt zur Bildung von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ,  $k = 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) und verläuft dreimal schneller als die enzymatische Inaktivierung durch SOD. Die Bildung von  $\text{ONOO}^-$  als Konkurrenzreaktion zur SOD-vermittelten Disproportionierung tritt allerdings erst bei einer mikromolaren  $\cdot\text{NO}$ -Konzentration auf (Koppenol, 1998). Das Peroxynitrit selbst ist ebenfalls eine sehr reaktive Verbindung und scheint durch spezifische Interaktionen mit Signaltransduktionssystemen zur vaskulären Dysfunktion direkt beizutragen, so z.B. durch die Tyrosin-Nitrierung der Prostazyklin-Synthase (Wink und Mitchell, 1998; Beckman und Koppenol, 1996; Zou *et al.*, 1997; Wolin *et al.*, 1998).

$\cdot\text{O}_2^-$  gehört zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS). Neben  $\cdot\text{O}_2^-$  gehören zu dieser Gruppe u.a. (Abbildung 10) auch Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ) und Unterchlorige Säure ( $\text{HOCl}$ ) (Wolin, 2000).





**Abbildung 10: ROS-Schema**

Wasserstoffperoxid entsteht physiologisch aus einer Dismutationsreaktion des  $^{\bullet}O_2^-$  und einer 2-Elektronen-Reduktion von molekularem  $O_2$ . Die Eliminierung des Wasserstoffperoxids wird enzymatisch katalysiert durch die Katalase (CAT) oder durch Peroxidasen (Glutathionperoxidase, GPx) unter Verbrauch von Reduktanden (z.B. Glutathion).

$^{\bullet}O_2^-$  kann aus dem Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S) der mitochondrialen Aconitase freies Eisen freisetzen (Muller *et al.*, 2004), das nach Reduktion zu  $Fe^{2+}$  die Bildung von  $OH^{\bullet}$  katalysiert (Fenton-Reaktion).

Im Zytosol von Zellen sind eher reduzierende Bedingungen vorherrschend. Dieses reduzierende Milieu wird durch eine große Kapazität an intrazellulären Thiolen (Glutathion und Thioredoxin) und durch Enzyme (SOD, CAT) aufrechterhalten. Ein intrazelluläres Ungleichgewicht zwischen vermehrt vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies auf der einen Seite und unzureichenden antioxidativen Schutz-Systemen (SOD, CAT, Glutathion) auf der anderen Seite führt zu einem oxidativen „Stress-Zustand“, der in der Entstehung und Progression vieler Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. In den letzten Jahren machte eine Vielzahl von Untersuchungen deutlich, dass ROS nicht nur schädigende Wirkung zeigen, sondern auch vielfältige Funktionen in der Signaltransduktion als Signalmoleküle einnehmen (Thannickal und Fanburg, 2000). So konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von SOD Calcineurin vor Inaktivierung schützt (Wang *et al.*, 1996). Es konnte ferner gezeigt werden, dass  $^{\bullet}O_2^-$  die Aktivität von Calcineurin durch Oxidation des katalytisch aktiven Zentrums moduliert (Oxidation des binukleären Clusters  $Fe^{2+}/Zn^{2+}$  zum  $Fe^{3+}/Zn^{2+}$ ) (Namgaladze *et al.*, 2002). Die

Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B wird durch  $\cdot\text{O}_2^-$  reversibel über Oxidation einer Thiol-Gruppe zur Sulfensäure reguliert (Barrett *et al.*, 1999).  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Signalmolekül ist verantwortlich für die Angiotensin-vermittelte Hypertrophie glatter Muskelzellen (VSMC) über die Aktivierung von Mitose-assoziierten Proteinkinasen (mitogen-activated protein kinase, MAPK) (Zafari *et al.*, 1998; Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Griendling *et al.*, 2000). Eine wichtige Rolle spielen Superoxidanionradikale bei der Entstehung und Progression neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. ALS (siehe oben), Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (Cleveland und Rothstein, 2001; Markesbery, 1997; Zhang *et al.*, 2000).  $\cdot\text{O}_2^-$  ist auch an der Tumor-Entstehung und –Progression (Sun, 1990), am Diabetes mellitus (Ceriello, 2003), am septischen Schock und an Entzündungen beteiligt (Salvemini und Cuzzocrea, 2002; Fattman *et al.*, 2003; Andreadis *et al.*, 2003).

### 4.3 Enzymatische Entstehung von Superoxid

Der zelluläre Elektronentransfer kann unter Beteiligung von molekularem  $\text{O}_2$  in einer Ein-Elektronen-Reduktion zur Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  führen. So entsteht z.B. in einer „Nebenreaktion“  $\cdot\text{O}_2^-$  bei der mitochondrialen Atmung. Andere Enzymsysteme, die im vaskulären Gewebe an der Produktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  beteiligt sind, werden nachfolgend vorgestellt.

#### 4.3.1 NADPH-Oxidasen

NADPH-Oxidasen in Leukozyten sind Multienzymkomplexe und produzieren  $\cdot\text{O}_2^-$  zur Immunabwehr. Neben  $\cdot\text{O}_2^-$  sind auch andere reaktive Sauerstoffspezies an der Immunabwehr beteiligt, so z.B. Hydroxylradikale, Unterchlorige Säure und Peroxynitrit.

Die NADPH-Oxidase besteht aus einem membrangebundenen Flavoprotein, dem Cytochrom-b558, das sich aus den Untereinheiten gp91phox und p22phox zusammensetzt. Bei einer Aktivierung translozieren die zytosolischen Untereinheiten p47phox, p67phox, p40phox und das G-Protein Rac-2 zu den membrangebundenen Einheiten und bilden einen Proteinkomplex, der durch Elektronentransfer mit NADPH als Substrat  $\cdot\text{O}_2^-$  in großen Mengen erzeugt (Wolin, 2000).

NADPH-Oxidasen in vaskulären Zellsystemen existieren unter anderem in Endothelzellen (Mohazzab *et al.*, 1994), glatten Muskelzellen (VSMC) (Griendling *et al.*, 1994) und Fibroblasten (Pagano *et al.*, 1998). Als gp91phox-Homologe wurden dort NOX1, NOX2 und

NOX4 gefunden (Brandes, 2003). Auch Homologe anderer Teileinheiten, die den Teileinheiten der neutrophilen NADPH-Oxidase entsprechen (Brandes, 2003), wurden in vaskulären Zellen gefunden. Die vaskulären NADPH-Oxidasen werden reguliert durch Zytokine, Hormone und physikalisch-mechanische Stimuli. So wird die Aktivität der NADPH-Oxidasen in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) erhöht durch vasoaktive Agonisten wie Angiotensin II (Ang II) (Griendling *et al.*, 1994), Thrombin (Patterson *et al.*, 1999), platelet-derived growth factor (PDGF) (Marumo *et al.*, 1997a; Sundaresan *et al.*, 1995), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (De Keulenaer *et al.*, 1998) und Lactosylceramid (Bhunja *et al.*, 1997). Durch Dehnung der aortalen und koronaren Blutgefäße wird ein Anstieg von  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den Endothelzellen (Hishikawa und Luscher, 1997) induziert und führt zu einer gesteigerten Einwanderung von Myozyten in die Gefäßmedia (Capers *et al.*, 1997). Im Unterschied zu NADPH-Oxidasen in Leukozyten zeigen die NADPH-Oxidasen im vaskulären Gewebe eine stetige Superoxid-Bildung, die nach Stimulation nur mäßig ansteigt und als „ROS-Signaling“ das zelluläre Redoxmilieu moduliert.

### 4.3.2 Xanthinoxidase

Das molybdän- und eisenhaltige Flavoprotein Xanthinoxidoreduktase katalysiert im Purinabbau die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure. Die Xanthinoxidoreduktase existiert einerseits als  $\text{NAD}^+$ -reduzierende Xanthindehydrogenase, andererseits als  $\text{O}_2$ -reduzierende und  $\cdot\text{O}_2^-$ -freisetzende Xanthinoxidase (XO). In Frühstadien der Hypercholesterinämie wurde eine erhöhte Superoxid-Bildung durch endotheliale Xanthinoxidase nachgewiesen (Ohara *et al.*, 1993; White *et al.*, 1996). Die Xanthinoxidase wird häufig eingesetzt, um in-vitro Sauerstoffradikale zu erzeugen.

### 4.3.3 NOS

Ein weiteres Enzymsystem, das zu einer gesteigerten vaskulären Superoxid-Produktion führen kann, ist die endotheliale  $\text{NO}$ -Synthase (eNOS) (Xia et al., 1996). Nach Entkopplung der eNOS kommt es anstelle der  $\text{NO}$ -Produktion zur vermehrten  $\text{O}_2^-$ -Produktion. Diese Entkopplung tritt bei einem Mangel an Kofaktoren auf, z.B. bei einem Mangel an Tetrahydrobiopterin (Xia et al., 1996). Dieses Modell der Radikalentstehung ist in-vivo allerdings noch nicht ausreichend geklärt. So ist nicht klar, ob unter in-vivo-Bedingungen jemals ausreichend niedrige Mengen an Kofaktoren vorliegen (Vasquez-Vivar et al., 1998).

## 4.4 Vaskuläre Effekte gesteigerter Superoxidproduktion

Die Gleichgewichts-Konzentration des Superoxids wird durch SOD im nanomolaren Bereich gehalten. Bei einer vermehrten enzymatischen Bildung von  $\text{O}_2^-$  (durch NOS, XO oder NADPH-Oxidasen), bei einer unzureichenden Expression und Aktivität von SOD oder bei einer Verschiebung des intrazellulären Redoxzustands bei einem Mangel an Glutathion oder Thioredoxin kommt es zu einem „oxidativen Stresszustand“.

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen, z.B. Atherosklerose, Bluthochdruck und Hypercholesterinämie, basieren auf einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit des endothelialen  $\text{NO}$  durch vermehrte Bildung von  $\text{O}_2^-$  (Ohara et al., 1993a; Warnholtz et al., 1999a; Rueckschloss et al., 2003a). Im vaskulären System wird dem  $\text{NO}$  eine antiatherogene, dem  $\text{O}_2^-$  eine proatherogene Aktivität zugeschrieben. Auch das aus  $\text{NO}$  und  $\text{O}_2^-$  entstehende, sehr reaktive Peroxynitrit ist in höheren Konzentrationen an der Funktionsbeeinflussung spezifischer Proteine (Zou et al., 1997) beteiligt.  $\text{O}_2^-$  selbst, aber auch andere reaktive Sauerstoffspezies (z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), tragen zur vaskulären Dysfunktion bei. Dies zeigt sich in der vermehrten Oxidation von low density lipoproteins (LDL) (Morel et al., 1984), in einer zunehmenden Infiltration von Monozyten (Marumo et al., 1997a; Liu et al., 2003), in einem vaskulären Remodeling durch aktivierte Matrix-Metalloproteasen (Siwik et al., 2001) und in einer durch membranständige NADPH-Oxidasen vermittelte Wachstumsantwort der VSMC (Zafari et al., 1998).

Aus klinischen Studien gibt es Hinweise, dass bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion eine zusätzliche glattmuskuläre Dysfunktion auftritt, die sich in einer eingeschränkten Gefäßrelaxation auf  $\text{NO}$ -Donoren manifestiert (Adams et al., 1998; Robinson et al., 1982). Diese glattmuskuläre Dysfunktion ist entweder das Ergebnis einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit des von  $\text{NO}$ -Donoren freigesetzten  $\text{NO}$ , wie dies für die Nitratoleranz gezeigt wurde

## Einleitung

---

(Münzel *et al.*, 1995), oder einer direkten Wirkung des  $\cdot\text{O}_2^-$  an einer anderen Stelle der  $\cdot\text{NO}$ -abhängigen Signaltransduktionskaskade. Eine direkte Beeinflussung der  $\cdot\text{NO}/\text{cGMP}$ -Signaltransduktion zeigt die Stimulation von kultivierten VSMC mit  $\cdot\text{O}_2^-$ , das zu einer Aktivierung der Phospholipase  $\text{C}\gamma$  ( $\text{PLC}\gamma$ ) und einer erhöhten Inositol-1,4,5-Triphosphat-Bildung führt. Einerseits hemmen Antioxidantien und  $\cdot\text{NO}$ -Donoren diesen Effekt, andererseits wird dieser Effekt durch sGC-Inhibitoren (ODQ) und cGK-Inhibitoren (KT5823) verstärkt, was zur Annahme führt, dass  $\cdot\text{O}_2^-$  über Hemmung der sGC einen Einfluss auf die Aktivität von Tyrosinkinasen und  $\text{PLC}\gamma$  ausübt (Wu und de Champlain, 1999a; Wu und de Champlain, 1999b).

### 5 Hypothese und Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob bei vaskulären Störungen des  $\text{NO}$ -Systems die Funktion der sGC als wichtigstes  $\text{NO}$ -Effektorenzym durch  $\text{O}_2^-$  direkt betroffen ist. Dazu sollten einerseits in-vitro-Studien zur Hemmung der sGC-Aktivität und zur Aufklärung eines möglichen Inhibitionsmechanismus durchgeführt, andererseits in intakten Zellen und vaskulären Geweben die biologische Bedeutung überprüft werden.

Hinweise auf eine Hemmung der sGC durch  $\text{O}_2^-$  zeigen frühere Arbeiten. So bewirkte das Chinon-Derivat LY 83583, ein intrazellulärer Redoxcyclus, eine Hemmung der basalen und  $\text{NO}$ -stimulierten sGC-Aktivität, die durch Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) verhindert werden konnte (Mülsch *et al.*, 1988; Mülsch *et al.*, 1989). Außerdem wurde nachgewiesen, dass sowohl die basale, als auch die CO-stimulierte, gereinigte sGC aus Thrombozyten durch Superoxid direkt und reversibel gehemmt werden kann (Brüne *et al.*, 1990). Darüber hinaus erhöhte SOD die basale und  $\text{NO}$ -stimulierte sGC-Aktivität unter aeroben Bedingungen.

Eine andere Hypothese stellt die direkte Hemmung der sGC durch Superoxid in Frage. Grundlage dieser Hypothese ist, dass die „basale“ sGC-Aktivität in vitro durch „Umwelt- $\text{NO}$ “ erhöht ist und Superoxid durch Wegfangen von Umwelt- $\text{NO}$  die „basale“ sGC-Aktivität hemmt. Die basale Aktivitätserhöhung durch Zugabe von SOD wurde als Wegfangen des kontaminierenden Superoxids erklärt (Friebe *et al.*, 1998b).

Dieser Hypothese ist entgegenzuhalten, dass die sGC-Aktivität unter anaeroben Bedingungen ( $\text{NO}$ -freier  $\text{N}_2$ -Atmosphäre) eine höhere Basalaktivität aufwies als unter aeroben Bedingungen (Niroomand *et al.*, 1989). Ferner konnte die  $\text{NO}$ -unabhängige CO- und YC-1-stimulierte sGC-Aktivität durch  $\text{O}_2^-$  gehemmt werden (Brüne *et al.*, 1990)

Für die Bestimmung der sGC-Aktivität wurden basale und YC-1-stimulierte sGC-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Der Nachweis der reversiblen Inhibition der sGC sollte mit Xanthinoxidase/Hypoxanthin (XO/HX) als  $\text{O}_2^-$ -generierendem System und mit SOD als  $\text{O}_2^-$ -Fänger erfolgen.

Um die Frage zu beantworten, ob eine direkte sGC-Hemmung durch  $\text{O}_2^-$  in-vivo relevant ist, sollte hierzu der cGMP-Spiegel in kultivierten VSMC mit einem Enzym-Immuno-Assay (cGMP-EIA) gemessen werden. Die Auswirkungen auf die  $\text{NO}$ /cGMP-Signalkaskade wurden mit der Immunodetektion von phosphoryliertem VASP, einem Indikator für die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), erfasst. Die intrazelluläre Produktion von  $\text{O}_2^-$  sollte mit dem intrazellulären Redoxcyclus 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon (DMNQ) er-

## Einleitung

---

folgen. Zur Übertragung der in-vivo Ergebnisse mit DMNQ auf ein physiologisches Modell wurden platelet-derived growth factor (PDGF) und Angiotensin II (Ang II) als Aktivatoren der membranständigen NADPH-Oxidasen in kultivierten VSMC eingesetzt.

Der Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  in kultivierten VSMC sollte mit Elektronenspinresonanz und mit Lucigenin-abhängiger Chemilumineszenz erfolgen.

Um den Mechanismus der sGC-Hemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  aufzuklären, wurden in Hinblick auf einen hämabhängigen Mechanismus sGC-Aktivitätsmessungen mit Häm-freier und Häm-oxidiertes sGC durchgeführt. Um zu zeigen, dass ein thiolabhängiger Inhibitionsmechanismus vorliegt, wurden mutierte sGC-Untereinheiten in COS1-Zellen exprimiert und die Aktivität bestimmt. Außerdem sollte geklärt werden, ob Kupfer-Ionen die Hemmung der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  katalysieren.

Insgesamt erwarteten wir von diesen Untersuchungen eine klare Antwort auf die Frage, ob die sGC als biologischer Rezeptor und als Effektorenzym für das Signalmolekül  $\cdot\text{O}_2^-$  fungieren kann.

## II Material und Methoden

### I *Material*

#### 1.1 **Substanzen**

##### 1.1.1 **Chemikalien**

2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon (DMNQ), 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (C-PTIO) von Alexis Biochemicals (Grünberg).

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Natriumcitrat, Glycerin wasserfrei, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) von Appli-chem (Darmstadt).

Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) von Calbiochem (Schwalbach am Taunus).

Salzsäure 32 % (HCl), Dimethylsulfoxid (DMSO), Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) von Fluka (Neu-Ulm). Triton X-100 von ICN Biochemicals (Ohio, USA).

Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Perchlorsäure 60 % (HClO<sub>4</sub>), Saccharose, Zinkacetat-Dihydrat (Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O), Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) von Merck (Darmstadt).

Kohlenmonoxid (CO) von Messer Griesheim (Frankfurt).

Cer<sup>(IV)</sup>sulfat-Tetrahydrat (Ce<sup>IV</sup>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O), Natriumhydroxid (NaOH) von Riedel-de Haën (Seelze).

Tween 20 von Serva (Heidelberg).

Dithiothreitol (DTT), Glutathion (GSH), 3-Aminophthalhydrazid (Luminol), Diethyltri-aminpentaacetat (DTPA), Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolinhydrochlorid (Neocuproin), Nitrilotriacetat (NTA), 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), Aluminiumoxid (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) zur Säulen-Chromatographie (Aktivität 1), Benzamidin, Hypoxanthin (HX), Natrium-Orthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), Zitronensäure, Acrylamid/bis-Acrylamid (30 %), Diphenyliodoniumchlorid (DPI) von Sigma (Deisenhofen).

Ethylendiamintetraacetat-Dihydrat (EDTA), D(+)-Glucose-Monohydrat, N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS/HCl) von Roth (Karlsruhe).



## **Material und Methoden**

---

### **1.1.2 Nucleotide und Analoga**

Guanosin-5'-triphosphat (GTP), zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) von Sigma (Deisenhofen).

### **1.1.3 Proteine**

Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA), Bovines  $\gamma$ -Globulin von Sigma.  
Milchpulver von Roth (Karlsruhe).

### **1.1.4 Peptide und Peptidanaloga**

Angiotensin II (Ang II), platelet-derived growth factor (PDGF), Kreatinphosphat, Trypsin-Inhibitor, Leupeptin, Pepstatin A von Sigma (Deisenhofen).

### **1.1.5 Enzyme**

Kreatinkinase von Roche (Basel).  
Superoxiddismutase (SOD), Superoxiddismutase-Polyethylenglykol (PEG-SOD), Katalase aus Rinderleber (CAT), Xanthinoxidase (XO) von Sigma (Deisenhofen).  
Gereinigte rekombinante lösliche Guanylatzyklase (Rinderlunge) von Alexis Biochemicals (Grünberg).  
Gereinigte rekombinante lösliche Guanylatzyklase (Ratte) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Stasch, Bayer AG.

### **1.1.6 Pharmaka**

DEA-NONOate (DEA-NO), 4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazinon (NS2028), 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol (YC-1) von Alexis Biochemicals (Grünberg).  
Natrium-Nitroprussid (sodium nitroprusside, SNP), Protoporphyrin IX (PIX), N<sup>0</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NAG) von Sigma (Deisenhofen).  
HMR3448 von Aventis (Frankfurt).  
Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>) von Parke-Davis  
Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) von Bayer

## **Material und Methoden**

---

### **1.1.7 Radioaktiv markierte Verbindungen**

( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )- Guanosin-5'-triphosphat, spezifische Aktivität: 800Ci/mMe, 500  $\mu\text{Ci}$  ( $^{32}\text{P}$ -GTP) von PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim).

### **1.1.8 Chemikalien zur Bestimmung von Superoxid**

Bis-N-methylacridinumnitrat (Lucigenin), Cytochrom-c von Sigma (Deisenhofen).  
1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidinhydrochlorid (CMH) von Alexis Biochemicals (Grünberg).

### **1.1.9 Reagentien zur Detektion von Proteinen**

Bradford (Roti®-Quant) von Roth (Karlsruhe).

### **1.1.10 Zellkultur**

Dulbecco's minimum essential medium (DMEM), Trypsin-EDTA, fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS), Penicillin-Streptomycin von Gibco (Neu-Isenburg).

Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), Dulbecco's minimum essential medium high glucose (DMEM-HG), fetales Kälberserum (FCS) von PAA (Pasching).

### **1.1.11 Kits**

Midi-Plasmid-Kit	Plasmidisolierung aus Bakterien von Qiagen (Hilden).
cGMP-EIA-Kit	Enzym-Immuno-Assay (EIA) zur Immunodetektion von cGMP von Amersham (Karlsruhe).
DEAE/DEXTRAN-Kit	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontische Zell-Linien von Sigma (Deisenhofen).

### 1.2 Antikörper (AK)

Tabelle 1: Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung
Anti-Phospho-VASP (16C2) Erstantikörper	<ul style="list-style-type: none"><li>• monoklonaler Antikörper (IgG, Maus)</li><li>• gegen Serin 239-phosphoryliertes VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)</li><li>• Nanotools (Teningen)</li></ul>
Anti-VSV Erstantikörper	<ul style="list-style-type: none"><li>• monoklonaler Antikörper (IgG, Maus)</li><li>• gegen das Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV)</li><li>• Sigma (Deisenhofen)</li></ul>
Anti-sGC $\alpha_1\beta_1$ Erstantikörper	<ul style="list-style-type: none"><li>• polyklonaler Antikörper (IgY, Huhn)</li><li>• gegen <math>\alpha_1</math> und <math>\beta_1</math>-Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC)</li><li>• Biogenes (Berlin)</li></ul>
Anti-Maus Zweitantikörper	<ul style="list-style-type: none"><li>• polyklonaler Antikörper (IgG, Ziege)</li><li>• gegen das <math>\gamma</math>-Immunglobulin (IgG) der Maus</li><li>• Peroxidase-konjugiert</li><li>• Sigma (Deisenhofen)</li></ul>
Anti-Huhn Zweitantikörper	<ul style="list-style-type: none"><li>• polyklonaler Antikörper (IgG, Kaninchen)</li><li>• gegen das <math>\gamma</math>-Immunglobulin (IgG) des Huhns</li><li>• Peroxidase-konjugiert</li><li>• Biogenes (Berlin)</li></ul>

### 1.3 Zellen

Tabelle 2: Zellen

Typ	Beschreibung	Nährmedien
VSMC	<ul style="list-style-type: none"><li>• Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte</li><li>• Zelllinie</li></ul>	DMEM + FCS (Gibco) 10 % + Pen/Strep 1 %
COS1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nierenepithelkarzinomzellen der afrikanischen Meerkatze</li><li>• Zelllinie</li><li>• freundlicherweise von Dr. Gross (Frankfurt) zur Verfügung gestellt</li></ul>	DMEM-HG + FCS (PAA) + Pen/Strep 1 %

### 1.4 Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

Typ	Beschreibung	Kodierung
PCMV	<ul style="list-style-type: none"><li>• Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Cytomegalie-Virus)</li><li>• Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Friebe (Bochum) zur Verfügung gestellt</li></ul>	$\beta_1$ C541S
PSG8	<ul style="list-style-type: none"><li>• Expressionsvektor mit SV40-Promotor (Simian Virus 40)</li><li>• Diese Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Gross (Frankfurt) zur Verfügung gestellt</li></ul>	$\alpha_1$ WT $\beta_1$ WT $\alpha_1$ C238S

### 1.5 Escherichia-coli (E.-coli)

Zur Klonierung und Amplifikation von DNA wurde folgender Escherichia-coli-Stamm verwendet, der freundlicherweise von Dr. Behrens (Pharmazentrum, Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurde: DH5 $\alpha$ (*supE44 lacU169 [F80lacZM15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Raleigh *et al.*, 1989).

### 1.6 Stammlösungen

Tabelle 4: Stammlösungen

Bezeichnung	Herstellung der Stammlösung
YC-1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stammlösung (10 mM) in DMSO</li></ul>
NS2028	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stammlösung (10 mM) in DMSO</li></ul>
Protoporphyrin IX	<ul style="list-style-type: none"><li>• 3 mg wurden in 50 µl 32 % HCl bei RT gelöst und mit 950 µl Aqua bidest verdünnt</li><li>• nach 10 min Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration mittels UV-Spektroskopie bestimmt (Extinktionskoeffizient: 262000 L*<math>\text{mol}^{-1}</math>*<math>\text{cm}^{-1}</math>)</li><li>• Überstand wurde mit Tris pH 7,5 auf 10 µMol eingestellt</li></ul>
HMR3448	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stammlösung (10 mM) in DMSO</li></ul>
DMNQ	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stammlösung (20 mM) in DMSO</li></ul>
CMH	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stammlösung (20 mM) in Hepes-Tyrode-Puffer (N<sub>2</sub>-begast)</li></ul>
Ce <sup>IV</sup> /NTA	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lösung 1: Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (250 mM) wird in 0,1 M HCl gelöst</li><li>• Lösung 2: NTA (50 mM) wird in 0,5 M MOPS (N<sub>2</sub>-begast, pH 7,0) gelöst</li><li>• Lösung 1 und Lösung 2 werden 1/10 zusammengefügt zu Ce<sup>IV</sup>/NTA</li></ul>
Lucigenin	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stammlösung (10 mM) in Hepes-Tyrode-Puffer (N<sub>2</sub>-begast) unter Ausschluss von Licht</li></ul>

### 1.7 Diverse Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Bezugsquelle
Einmal-Küvetten (Plastibrand <sup>®</sup> )	Brand (Wertheim am Main)
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen (24 well)	Corning (Schiphol-Rijk/Niederlande)
Zellkulturflaschen (175 cm <sup>2</sup> )	Greiner (Dietzenbach)
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Einmal-Mikro-Kapillare (50 µl)	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Mikrotiterplatten	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellschaber	Corning (Schiphol-Rijk/Niederlande)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnbrecht)
Falcon <sup>®</sup> -Röhrchen (15; 50 ml)	Greiner (Dietzenbach)
Reaktionsgefäße (2; 1,5; 0,5 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Einmalpipetten (Costar <sup>®</sup> )	Corning (Schiphol-Rijk/Niederlande)
Fuji RX-Film	Du Pont (Bad Homburg)
Mini-Vials (6 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht)

### 1.8 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
Chemilumineszenz-Zähler/ modifizierter Szintillations- Zähler	LS 7500	Beckman (Krefeld)
Dismembrator	Mikro-Dismembrator	B.Braun (Melsungen)
Einstabmesskette	L32 BNC	Schott (Wertheim am Main)
Stromversorgung	EPS 300	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Elektrophoresekammer	Mighty Small II SE 250	Hoefer (Freiburg)
ESR-Spektrometer	EMX	Bruker (Rheinstetten)
Inkubator	B 5060-EC-CO2	Heraeus (Hanau)
Labor-Feinwaage	AE 163	Mettler-Toledo (Giessen)
Mikroskop	DM IL	Leica (Solms)
pH-Meter	230Aplus	Orion (Cambridgeshire/England)
Photometer	Uvikon 941	Kontron Instruments (Eching)
Mikrotiterplatten-Photometer	MRX Revelation TC	Dynex (Frankfurt am Main)
Szintillations-Zähler	1600 TR	Packard (Groningen/Niederlande)
Sterilbank	LaminAir HB 2448	Heraeus (Hanau)
Thermomixer	Vortemp 56 EVC	Neolab (Heidelberg)
Transferkammer	PerfectBlue Semi-dry	Peqlab (Erlangen)
Pipetten	Research	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (NY/USA)
Zählkammer	Neubauer	Brand (Wertheim am Main)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Instruments (Hanau)
Zentrifuge	Sigma 2-5	Sigma (Osterode)
Zentrifuge	MicroV	Fisher Scientific (Schwerte)

### 1.9 Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Puffer für Zellen und Gewebe

<i>Zellen und Gewebe</i>	<b>Hepes-Tyrode-Puffer pH 7,4</b>	
	DTPA	0,1 mM
	NaCl	132 mM
	HEPES	9,4 mM
	Glucose · H <sub>2</sub> O	5 mM
	KCl	4 mM
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,49 mM
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 mM

Tabelle 8: Homogenisierungspuffer zur Bestimmung der sGC-Aktivität

<i>sGC- Aktivität</i>	<b>Homo-Puffer pH 7,0</b>	
	TrisHCl	20 mM
	Saccharose	0,25 mM
	EDTA	0,2 mM
	Leupeptin	10 µg/ml
	Benzamidin	2 mM
	DTT	10 mM



Tabelle 9: Puffer für das Immunoblotting

<b>Immuno- blotting</b>	<b>Lyse-Puffer pH 7,4</b>		<b>Probenpuffer pH 6,8 (Lämml)</b>	
	Hepes	50 mM	SDS	2 %
	Triton X-100	1 %	Glycerol	10 %
	NaCl 150 mM	150 mM	Bromphenolblau	0,01 %
	Ortho-Vanadat	1 mM	Tris/HCl	62,5 mM
	Ortho-Vanadat	1 mM	DTT	25 mM
	PMSF	1 mM		
	Leupeptin	2 µg/ml		
	Pepstatin A	2 µg/ml		
	Trypsininhibitor	10 µg/ml		
	<b>Elektrophorese-Puffer</b>		<b>Transfer-Puffer pH 8,5</b>	
	Tris	250 mM	Glycerin	160 mM
	Glycerin	192 mM	Tris	25 mM
	SDS	0,1 %	Methanol 20 %	20 %
	<b>Blocking-Puffer (1) pH 7,5</b>		<b>Blocking-Puffer (2) pH 7,5</b>	
	Milchpulver	5 %	Pferdeserum	10 %
	Tris/HCl	50 mM	BSA	3 %
	NaCl	20 mM	Tris/HCl	50 mM
Tween 20	0,05 %	NaCl	20 mM	
Triton X-100	0,3 %	Tween 20	0,05 %	
<b>Waschpuffer I pH 7,5</b>		<b>Waschpuffer II pH 7,5</b>		
Tween 20	0,3 %	NaCl	20 mM	
NaCl 20 mM	20 mM	Tris/HCl	50 mM	
Tris/HCl	50 mM			
<b>Trenngel pH 8,8</b>		<b>Sammelgel pH 6,8</b>		
Acrylamid	12 %	Acrylamid	6 %	
Tris/HCl	370 mM	Tris/HCl	125 mM	
SDS	0,1 %	SDS	0,1 %	
AMPS	0,08 %	AMPS	0,08 %	
TEMED	0,1 %	TEMED	0,1 %	
<b>ECL I pH 8,5</b>		<b>ECL II pH 8,5</b>		
TRIS	100 mM	TRIS	100 mM	
Luminol	2,5 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5 %	
Coumarsäure	0,4 mM			

## Material und Methoden

---

Tabelle 10: Puffer für die Plasmid-Präparation

<i>Plasmid- Präparation</i>	<b>RF1-Puffer pH 5,8</b>		<b>RF2-Puffer pH 6,8</b>	
	RbCl	100 mM	RbCl	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	MOPS	10 mM
	Kaliumacetat	30 mM	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM	Glyzerin	15 %
	Glyzerin	15 %		
	<b>Luria-Bertani Medium (LB), (LB-Amp*)</b>		<b>Tris/EDTA-Puffer (TE) pH 8,0</b>	
	Bacto-Trypton	10 g/l	Tris	10 mM
	Bacto-Yeast Extrakt	5 g/l	EDTA	1 mM
	NaCl	10 g/l		
	*Ampicillin	20 mg/l		
	<b>TAE-Puffer (40x) pH 7,9</b>		<b>DNA-Gelladepuffer (6x)</b>	
Tris	1,6 M	Glycerin	50 % (v/v)	
Na-Acetat	0,8 M	Bromphenolblau	0,01 % (w/v)	
EDTA	0,08 M	Xylenblau	0,01 % (w/v)	

## 2 Methoden

### 2.1 Tierspezies und Haltungsbedingungen

Es wurden männliche Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borken) verwendet. Die Tiere wurden auf staubfreiem Holzgranulat (Altrominfaser, Altromin, Lage) in 550 x 330 x 200 mm großen Käfigen (Erich Becker, Castrop-Rauxel) gehalten. Die Fütterung erfolgte mit der Altromin-Standard-Diät Nr. 1320 (Altromin, Lage) und Leitungswasser. Die Raumtemperatur des Tierstalls betrug ca. 21 ° - 25 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 - 65 %. Der Raum wurde in einem zirkadianen Lichtrhythmus (7.00 - 17.00 Uhr) mit Neonlampen beleuchtet.

### 2.2 Zellkultur

#### 2.2.1 Präparation primärer glatter Muskelzellen aus Aorten

Männliche Wistar-Ratten wurden durch intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 5 mg/kg KG Xylazin betäubt, der thorakale Abschnitt der Aorta entnommen und in eine Petrischale mit serumfreiem Kulturmedium Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) überführt. Das Medium enthielt zusätzlich 50 U/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin und 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA).

Die Aortensegmente wurden von Fett- und Bindegewebe gesäubert, und das Endothel wurde mechanisch entfernt. Anschließend wurden die endothelfreien Aortensegmente in Kulturmedium mit 3 mg/ml Kollagenase (Typ I) für 30 min bei 37 °C im Brutschrank behandelt. Danach wurde die Adventitia entfernt, das restliche Gefäß longitudinal aufgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt. Hierauf folgte eine 1-2 stündige Inkubation im Kulturmedium mit 3 mg/ml Kollagenase und 1 mg/ml Elastase, so dass die glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta (vascular smooth muscle cells, VSMC) dissoziierten. Nach Zentrifugation (100 xg, 5 min) wurden die Zellen in serumhaltigem DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) aufgenommen und in Petrischalen kultiviert. Die Charakterisierung erfolgte immunzytochemisch mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen  $\alpha$ -Aktin des glatten Gefäßmuskels (Gordon *et al.*, 1986). Im konfluenten Zustand wurden die Zellen dann unter Verwendung von 0,05 % Trypsin und 0,02 % Ethylendiamintetraacetat (EDTA) passagiert. Alle Experimente wurden mit Zellen der 5. - 20. Passage durchgeführt.

### **2.2.2 Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta (VSMC)**

Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank ausgeführt. Alle verwendeten Glaswaren und Gerätschaften wurden vor Gebrauch autoklaviert, Kunststoffmaterialien und Nährmedien wurden steril vom Hersteller bezogen (entkeimt durch  $\gamma$ -Bestrahlung). Sämtliche Zelllinien der VSMC wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit in DMEM kultiviert. DMEM wurde mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin supplementiert.

Um Zellen im Wachstum zu arretieren, wurde DMEM mit 0,1 % BSA („Hungermedium“) eingesetzt, und die Zellen wurden mindestens 24 Stunden und bis zu 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

Um konfluent gewordene Zellen zu verdünnen, wurden sie einmal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA versetzt. Sobald die Zellen begannen sich abzulösen, wurde die 4-fache Menge DMEM (10 % FCS) hinzugegeben, um den tryptischen Verdau zu unterbrechen. Die Zellen wurden dann von der Platte ab gespült und zur Weiterzucht auf neue Platten verteilt. Zur Aufbewahrung der Zellen wurden diese, nach Ablösung, bei 800 xg für 5 min sedimentiert, einmal mit PBS gewaschen dann in Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % DMEM) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt, schrittweise auf -80 °C abgekühlt und für die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt. Gelagerte Zellen wurden aufgetaut, indem sie rasch in einem Wasserbad (37 °C) erwärmt wurden. Die Zellsuspension wurde dann in zwei unterschiedlichen Konzentrationen mit frischem Medium verdünnt und auf die Platten ausgesät.

### **2.2.3 Kultivierung von COS1-Zellen**

Konfluente COS1-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen wurden aus dem Institut für Kardiovaskuläre Biochemie (siehe 1.3) bezogen. Die Kultivierung erfolgte wie bei VSMC (siehe 2.2.2). Im Unterschied zur Kultivierung der VSMC wurden die COS1-Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit und DMEM-HG kultiviert. Dieses Medium wurde mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin supplementiert.

### 2.3 Isolierung und Inkubation von Gefäßsegmenten

#### 2.3.1 *Arteria coronaria des Schweins*

Die Arteria coronaria des Schweins (porcine coronary arteries, PCA) wurde aus Schweineherzen, die am gleichen Tag aus einem Schlachthof geholt wurden, vorsichtig herausgetrennt und in einer mit eisgekühlter HEPES-Tyrode-Lösung gefüllten Petrischale von umgebendem Fett- und Bindegewebe gelöst. Das Gefäßlumen wurde mit HEPES-Tyrode-Lösung durchspült. Anschließend wurde die Aorta in 2-3 mm lange Abschnitte geteilt. Zusätzlich wurde das Endothel mechanisch entfernt, indem die Gefäßringe mit Hilfe einer ins Gefäßlumen eingeführten Pinzette auf einer angefeuchteten Unterlage vorsichtig gerollt wurden. Die Inkubation erfolgte in Reaktionsgefäßen mit 500 µl HEPES-Tyrode-Puffer bei 37 °C im Inkubator. Eine Inkubation mit 0,1 mM L-NAG (20 min) blockierte eventuell noch vorhandene <sup>•</sup>NO-Synthasen. Je nach Versuchsbedingung wurden die Koronararterien mit DETC (20 min) zur Hemmung der CuZnSOD inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gefäßsegmente sofort tiefgefroren und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung zu Proteinhomogenat gelagert (siehe 2.4.1).

#### 2.3.2 *Aorta thoracalis der Ratte*

Die Ratten, 300 - 400 g Körpergewicht (KG), wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Xylazin anästhesiert. Nach Injektion von 1000 IE Heparin in die *Vena cava caudalis* wurden die Tiere mittels Durchtrennung der *Aorta abdominalis* entblutet. Die *Aorta thoracalis* wurde unter Vermeidung von Zug und Druck entnommen und in einer mit HEPES-Tyrode-Lösung gefüllten, eisgekühlten Petrischale von umgebendem Fett- und Bindegewebe gelöst. Das Gefäßlumen wurde mit HEPES-Tyrode-Lösung durchspült. Anschließend wurde die Aorta in 2-3 mm lange Ringe geschnitten. Zusätzlich wurde das Endothel mechanisch entfernt, indem die Gefäßringe mit Hilfe einer ins Gefäßlumen eingeführten Pinzette auf einer angefeuchteten Unterlage vorsichtig gerollt wurden.

Für die VASP-Phosphorylierung wurden die Gefäßsegmente in Reaktionsgefäße mit 500 µl HEPES-Tyrode-Puffer überführt. Eine Vorinkubation mit 0,1 mM L-NAG (20 min) blockierte eventuell noch vorhandene <sup>•</sup>NO-Synthasen. Je nach Versuchsbedingung fand eine Inkubation mit PEG-SOD (20 min) oder DMNQ (2 min) statt. Die VASP-Phosphorylierung der Gefäßsegmente wurde durch Zugabe von YC-1 (100 µM) oder SNP (100 µM) gestartet.

## Material und Methoden

---

Nach 8 min wurde die Stimulation gestoppt, und die Gefäßsegmente wurden sofort tiefgefroren und bei  $-80\text{ °C}$  bis zur Weiterverarbeitung zu Proteinhomogenat gelagert (siehe 2.4.2).

### 2.4 Proteinextraktion

Bei der Proteinextraktion werden fein pulverisiertes Gewebe oder kultivierte Zellen lytiert. Die Lyse basiert dabei auf der Zerstörung der Zellmembran durch Zugabe eines dystonen Puffers und eines Detergens. Zur Gewinnung der löslichen Zellbestandteile wird die lytierte Zellsuspension zentrifugiert (13000 rpm,  $4\text{ °C}$ , 20 min) und der Überstand isoliert.

#### 2.4.1 *Extraktion nativer Proteine aus Gewebe und kultivierten Zellen*

Die tiefgefrorenen PCAs (siehe 2.3.1) wurden in eine tiefgekühlte Metallhülse mit Metallkugel gegeben und mit einem Dismembrator pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde in ein auf Eis gekühltes Reaktionsgefäß überführt und abgewogen. Das Gewebepulver der Koronararterien wurde mit Homogenisierungspuffer (siehe 1.9) suspendiert und für 20 min auf Eis stehen gelassen.

Bei VSMC und COS1-Zellen wurde das Nährmedium entfernt, die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellkulturschaber mit PBS von der Schale abgekratzt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert, in Homogenisierungspuffer resuspendiert und schließlich auf Eis für 20 min stehen gelassen.

Die oben erhaltenen Zellsuspensionen aus PCA und kultivierten Zellen wurden zusätzlich mit Ultraschall behandelt und anschließend 30 min (13000 rpm,  $4\text{ °C}$ ) zentrifugiert. Die Proteinmenge des Überstands wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.4.3). Bis zur Bestimmung der sGC-Aktivität (siehe 2.5) wurde der Überstand bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren.

### **2.4.2 Extraktion der Proteine für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Für das Immunoblotting wurden die gefrorenen und inkubierten Gefäßsegmente der Aorta thoracalis wie oben (siehe 2.2.4.1) pulverisiert, anschließend in Lysepuffer suspendiert und für 20 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das Homogenat für 20 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C) und der Überstand entnommen. Zur Bestimmung der Proteinmenge im Überstand wurde die Methode nach Bradford (siehe 2.4.3) verwendet. Bis zur späteren Verwendung für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (siehe 2.6) wurde der Überstand bei -80 °C eingefroren.

Nach der Transfektion wurde den COS1-Zellen (Zellkulturschale, 3,5 cm) das Nährmedium entfernt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Gel-Elektrophorese wurden die Zellen mit 70 µl SDS-Stop-Puffer (3% SDS in PBS) lysiert. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, RT, 10 min) wurde der Überstand entnommen und bei -80 °C bis zur Gel-Elektrophorese (siehe 2.6) eingefroren.

### **2.4.3 Messung der Proteinmenge nach Bradford**

Der Proteingehalt wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Verschiebung der Absorption von 465 nm zu 595 nm nach erfolgter Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung.

Zur Vorbereitung wurde die Bradford-Lösung Roti<sup>®</sup>-Quant 1:5 mit Wasser verdünnt. Für eine Standardkurve wurde BSA abgewogen, in Aqua bidest gelöst und Konzentrationen von 1, 5, 10, 20, 30 ng/µl erstellt. Standards, Leerwert mit einer Verdünnung des Probenpuffers und verdünnte Proben wurden zu je 80 µl auf eine Mikrotiterplatte mit Klarboden gegeben und jeweils mit 200 µl verdünnter Bradfordlösung versetzt. Die Absorption wurde mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers MRX Revelation TC abgelesen und die Proteinkonzentration der Probe mit dem Computerprogramm Revelation errechnet.

### 2.5 Bestimmung der Guanylatzyklase-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität der löslichen Guanylatzyklase wurde die Bildung von [<sup>32</sup>P]cGMP aus [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP unter definierten Bedingungen gemessen und daraus die Enzymaktivität berechnet.

#### 2.5.1 Inkubation

Für die sGC-Aktivitätsmessung wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Reaktionskomponenten getrennt auf Eis zusammengestellt. Die Komponenten ergaben insgesamt ein Endvolumen von 100  $\mu$ l.

**Tabelle 11: sGC-Aktivitätspuffer und Reaktionskomponenten für die Bestimmung der Guanylatzyklase-Aktivität**

#### sGC-Aktivitätspuffer

Substanz	Endkonzentration
$\gamma$ -Globulin	0,1 mg/ml
Kreatinphosphat	1,5 mg/ml
Kreatinkinase	0,2 mg/ml
Glutathion	4,5 mg/ml
TrisHCl	5 - 100 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 - 5 mM
DTPA	0,1 mM
IBMX	0,5 mM
L-Nitro-Arginin	0,3 mM
Hypoxanthin	0,2 mM

#### Enzym

Präparation	Endkonzentration
gereinigte sGC	0,1 – 0,3 $\mu$ g/ml
Homogenat	100 – 300 $\mu$ g/ml

#### Substrat

Substrat	Endkonzentration
[ <sup>32</sup> P]-GTP	0,1-0,5 $\mu$ Ci
GTP	0,1 mM
cGMP	0,2 mM



## Material und Methoden

Aktivatoren		Inhibitoren	
Zusatz	Endkonzentration	Zusatz	Endkonzentration
SNP	10 – 100 $\mu\text{M}$	Xanthinoxidase	$10^{-4}$ – 300 mU/ml
YC-1	10 – 100 $\mu\text{M}$	NS 2028	10 nM
DEA- $\cdot\text{NO}$	10 – 100 $\mu\text{M}$		
PIX	1 – 10 $\mu\text{M}$		
HMR3448	30 $\mu\text{M}$		
CO	Sättigung ca. 1 mM		

Das  $\gamma$ -Globulin diente als Schutzprotein, um Adsorptionen der nur in geringer Konzentration eingesetzten gereinigten sGC zu verhindern.  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen katalysierten als Kofaktoren den enzymatischen Umsatz von GTP zu cGMP. Der Zusatz von reduzierendem Glutathion und DTPA (Chelator von Übergangsmetallen) schützte die sGC vor Inaktivierung. Für die Superoxidproduktion wurde Hypoxanthin im GC-Inkubationspuffer vorgelegt und die Xanthinoxidase kurz vor Inkubationsstart zugesetzt.

Bei der Bestimmung der sGC-Aktivität in nicht gereinigten Enzympräparationen (Homogenaten) können darin vorhandene cGMP- oder GTP-abbauende Enzyme zu falschen Ergebnissen führen. Ein Überschuss an nicht radioaktivem cGMP minimiert den Abbau von  $^{32}\text{P}$ -cGMP und führt zu einer konstanten Ausbeute bei der chromatographischen Isolierung des cGMP. Der Zusatz von IBMX verhinderte den Abbau von cGMP durch Hemmung der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen. Kreatinphosphat und Kreatinkinase bilden ein "GTP-regenerierendes System", das durch eventuell vorhandene GTP-abbauende Enzyme gebildetes 5'-GDP wieder zu GTP phosphoryliert.

Der Reaktionsstart erfolgte je nach Versuchsbedingung mit Zugabe von Aktivatoren oder von XO. Die Inkubation wurde bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Die Inkubation dauerte 10, 15 oder 20 min und wurde sofort durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Zinkacetat (125 mM) abgestoppt. Der Zusatz von 500  $\mu\text{l}$  Natriumcarbonat (120 mM) verursachte eine Zinkcarbonat-Fällung, die auch zur weitgehenden Ausfällung des restlichen GTP führte.

### 2.5.2 Isolierung von cGMP

Die Zinkcarbonat-Fällung wurde pelletiert (10000 xg, 10 min) und der Überstand zur Isolierung des gebildeten [ $^{32}\text{P}$ ]cGMP auf Aluminiumoxid-Säulen (0,75 mal 2 cm) gegeben. Bei der sauren Chromatographie wurden die Überstände zusammen mit 2 ml Perchlorsäure (100

## Material und Methoden

---

mM) auf die zuvor mit zweimal 2 ml Perchlorsäure (100 mM) vorbehandelten Aluminiumoxid-Säulen aufgetragen. Nach zweimal Waschen mit Aqua bidest (zweimal 5 ml) wurde das in der Säule verbleibende cGMP mit 5 ml TRIS/HCl (0,5 M, pH 8) in Szintillationszählgefäße eluiert und der  $^{32}\text{P}$ -Zerfall mit einem Szintillations-Zähler erfasst.

### 2.5.3 Berechnung der Guanylatzyklase -Aktivität

Die spezifische Aktivität ist ein Maß für die gebildete Menge an cGMP (in nmol), die durch 1 mg Protein der eingesetzten Enzympräparation in 1 Minute gebildet wurde. Die Berechnung ergibt sich wie folgt (Formel 1):

#### Formel 1: Berechnung der sGC-Aktivität

$$A = \frac{(N-B) * S}{W * T * P * R} \quad (\text{nmol} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1})$$

A	=	spezifische Aktivität der sGC	T	=	Inkubationszeit (min)
N	=	Zerfallsrate des radioaktiven Produktes	P	=	Proteinmenge pro Ansatz (mg)
B	=	Leerwert			
S	=	Gesamtmenge des eingesetzten GTP (nmol)	R	=	Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität (cpm)
W	=	Wiederfindungsrate			

Für die Wiederfindungsrate wurde ein Faktor von 0,5 eingesetzt. Dieser Faktor berücksichtigt den Verlust von  $^{32}\text{P}$ cGMP bei der Zinkcarbonatfällung und beim Eluieren aus den Aluminiumoxid-Säulen (Mülsch, 1986).

### 2.5.4 Proteinisolierung mit Gelchromatographie

Für einige Versuche war es notwendig, die gereinigte rekombinante sGC mit niedermolekularen Stoffen (NS 2028, Tween 20) 10 min bei 4 °C zu inkubieren. Die Abtrennung dieser niedermolekularen Stoffe erfolgte nach der Größenausschlusschromatographie (Gelchromatographie) mit einer Sephadex-(G25-) Säule (5 cm \* Ø 1,5 cm). Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Eindringmöglichkeit und -dauer von Molekülen unterschiedlicher Größe in die Poren. Die Chromatographie wurde bei 4 °C mit eisgekühltem sGC-Aktivitätspuffer durchgeführt. Auf die zuvor mit sGC-Aktivitätspuffer equilibrierten Säulen wurde das Inkubat

## **Material und Methoden**

---

(Endvolumen: 100 µl) aufgetragen. Nach Durchlauf von 400 µl sGC-Aktivitätspuffer wurde die sGC schließlich mit 500 µl GC-Aktivitätspuffer eluiert. Der Verdünnungskoeffizient der Probe betrug 1/5.

### **2.6 Gel-Elektrophorese und Immunoblotting (Westernblot)**

#### **2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zur Proteinauftrennung**

Proteinproben unterschiedlicher Reinheitsgrade können über die Gelelektrophorese auf ihre Proteinzusammensetzung und Homogenität überprüft werden. Durch die Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) denaturieren die Proteine und erhalten proportional zu ihrer Größe eine negative Ladung. Somit entfallen Trennungseigenschaften durch unterschiedliche Ladung, und die Proteine können im Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) zur Auftrennung der Proteinbanden wurden SDS-Polyacrylamidgele mit einem 6 %-igem Polyacrylamid-Sammelgel und einem 12 %-igem Polyacrylamid-Trenngel verwendet. Für den anschließenden Gel-Lauf wurde ein Elektrophoresepuffer (siehe 1.9) verwendet. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 100 °C aufgeköcht, um eine komplette Denaturierung der Proteine zu erreichen. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (30 s, 10000 xg) und auf das Sammelgel aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 10 mA (Sammelgel) bzw. 20 mA (Trenngel).

#### **2.6.2 Immunoblotting (Westernblot)**

Zur weiteren Analyse der Proteine wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (geblottet). Zum elektrophoretischen Transfer wurde eine Transferkammer genutzt, in der durch direkten Kontakt von Nitrozellulosemembran und SDS-Polyacrylamid-Gel in einem Transferpuffer der Proteintransfer bei einer angelegten Stromstärke von 125 mA stattfand. Nach 90 Minuten Transfer wurde der Nitrozelluloseblot zweimal mit Wasser gewaschen und 5 min in 0,2 % Ponceau S-Lösung angefärbt, um Transfer und gleichmäßige Beladung des Gels zu überprüfen.

## Material und Methoden

---

Zum Entfärben der Proteinbanden wurden die Blots dreimal 5 min mit Waschpuffer I und dreimal 5 min mit Waschpuffer II bis zur vollständigen Entfärbung gewaschen. Die darauf folgenden Schritte unterscheiden sich je nach Antikörper:

### 1. Anti-VASP

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde der Nitrozelluloseblot 40 min mit einem Milchpulver-Blockingpuffer behandelt. Die Antigen-Antikörper-Bindung erfolgte bei einer 12-stündigen Inkubation (4 °C) des Blots mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper (AK) gegen phosphoryliertes Ser239-VASP in Milchpulver-Blockingpuffer. Hierbei war die Konzentration des AK 1 µg/ml. Zur Entfernung des ungebundenen AK wurde der Nitrozelluloseblot fünfmal mit Waschpuffer I (je 2 min) und zweimal mit Waschpuffer II (je 20 min) gewaschen. Nach der erneuten Inkubation mit dem Milchpulver-Blockingpuffer (20 min) erfolgte die AK-AK-Bindung mit dem Zweitantikörper Anti-Maus (1:5000) an den Erstantikörper Anti-Phospho-VASP im Milchpulver-Blockingpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur.

### 2. Anti-VSV

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde der Nitrozelluloseblot 2 Stunden mit einem Milchpulver-Blockingpuffer behandelt. Danach wurde der Blot dreimal mit Waschpuffer I und dreimal mit Waschpuffer II gewaschen. Für die Antigen-AK-Bindung wurde der Blot mit dem Anti-VSV-AK für 1 Stunde inkubiert. Dabei war der AK 1:1000 in einem BSA-Blockingpuffer verdünnt. Zur Entfernung des ungebundenen AK wurde der Nitrozelluloseblot fünfmal mit Waschpuffer I (je 2 min) und zweimal mit Waschpuffer II (je 20 min) gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem Milchpulver-Blockingpuffer für 20 min und anschließend die AK-AK-Bindung des Zweitantikörpers Anti-Maus (1:7000) an den Erstantikörper Anti-VSV bei Raumtemperatur für eine Stunde.

### 3. Anti-sGC

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde der Nitrozelluloseblot 40 min mit einem Pferdeserum-Blockingpuffer behandelt. Bei 4 °C erfolgte dann die 12-stündige Inkubation der Blots mit einem Anti-sGC-AK (1:1000). Der ungebundene AK wurde durch fünfmal Waschen mit Waschpuffer I und zweimal Waschen mit Waschpuffer II entfernt. Nach der Inkubation mit dem Pferdeserum-Blockingpuffer (20 min) folgte die

## Material und Methoden

---

AK-AK-Bindung mit dem Zweitantikörper Anti-Huhn (1:10000) im Pferdeserum-Blockingpuffer für eine Stunde.

Der ungebundene Zweitantikörper wurde wie der Erstantikörper durch Waschen entfernt. Die Detektion des Zweitantikörpers, ein AK-Meerrettichperoxidase-Konjugat, erfolgte mit den ECL-Lösungen I und II, die im gleichen Verhältnis auf den Blot gegeben wurden.

Die Meerrettichperoxidase und  $H_2O_2$  der ECL-Lösungen katalysieren die Chemilumineszenz-Reaktion des Luminols. Bei dieser Reaktion wird das Luminol in einen angeregten Energiezustand versetzt. Die anschließende Abgabe der Energie erfolgt durch Emission von Licht, das nach Auflegen eines photosensitiven Films (Fuji RX) die Proteinbanden als Schwärzung anzeigt.

Zur semi-quantitativen Bestimmung der relativen Proteinmengen wurden die Filme densitometrisch mit Scion Image bestimmt (siehe 2.12).

## 2.7 Amplifikation der Plasmide

### 2.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen (*E. coli*)

Von einer *Escherichia-coli*-(*E.-coli*)-DH5 $\alpha$ -Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 1500 g, 4 °C). In einem ersten Schritt wurden die Zellen in 20 ml RF1-Puffer aufgenommen und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen (10 min, 1500 g, 4 °C) folgte in einem zweiten Schritt die Resuspendierung der Zellen in 4 ml RF2-Puffer und die Inkubation für 15 min auf Eis. Die erhaltene Suspension kompetenter *E.-coli*-Zellen wurde zur Lagerung bei -70 °C in 500  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt.

### 2.7.2 Transformation kompetenter *E.-coli*

Zu 50  $\mu$ l *E.-coli*-Zellen wurden ca. 1  $\mu$ g Plasmid-DNA gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitze-Schock (37 °C, 20 sec) wurden 450  $\mu$ l LB-Medium hinzugegeben und die *E.-coli*-Zellen für eine Stunde inkubiert (37 °C, unter Schütteln). Von dieser Zellsus-

## Material und Methoden

---

pension wurden 100-150 µl auf LB-Amp-Platten aufgetragen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

### **2.7.3 Plasmid-DNA-Präparation im großen Maßstab**

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die transformierten *E.-coli*-Zellen (siehe oben) verwendet. Von LB-Amp-Platten wurde dabei eine einzelne Kolonie isoliert und mit 5 ml LB-Medium angeimpft (Inkubation über Nacht, 37 °C, 160 rpm). Von dieser Vorkultur wurden wiederum 100-150 µl entnommen, um eine Großkultur mit 50 ml LB-Amp-Medium anzulegen (Inkubation über Nacht, 37 °C, 160 rpm).

Nach Überführen dieser Großkultur in Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 6000 xg für 30 min wurde die Plasmid-DNA mit dem Midi-Plasmid-Kit eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert und abzentrifugiert (15000 xg, 30 min, 4 °C). Nach Lufttrocknen wurde das Pellet in 450 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 Volumen 100 % Ethanol, 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 5,2) und 30 min Inkubation bei -20 °C erneut präzipitiert. Nach Zentrifugation (30 min, 12000 xg, 4 °C), Waschen mit 70 % Ethanol und erneuter Zentrifugation (5 min, 12000 xg, 4 °C) und Lufttrocknen des Pellets wurde die Plasmid-DNA in TE-Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte mit Hilfe des UV-Spektrometers. Dazu wurde die Optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm gemessen. Zur Kontrolle auf Verunreinigungen wurde der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  errechnet, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte (empirischer Wert). Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde die gewonnene Plasmid-DNA einem analytischen Verdau unterworfen und in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.7.4).

### **2.7.4 Gelelektrophorese von DNA**

Die in 2.7.3 erhaltenen Proben wurden zur Kontrolle der Plasmid-Präparation mit 1/6 vol DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in einem Horizontal-Gel elektrophoretisch bei 40-120 V getrennt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Bande das untere Viertel des Gels erreichte. Die Agarosekonzentration betrug je nach der Größe der zu trennenden Fragmente 0,8-2 % (w/v). Als Elektrophoresepuffer wurde der TAE-Puffer (siehe 1.9) verwendet. Die Gele wurden anschließend in 0,1 % Ethidium-Bromid-Lösung 5 min gefärbt und unter UV-Licht photographiert (GelDoc<sup>®</sup>, Biorad).

## Material und Methoden

### 2.8 Transiente Transfektion von COS1-Zellen

Für die transiente Transfektion von Plasmid-DNA in COS1-Zellen wurde der DEAE/DEXTRAN-Kit verwendet. Diese Methode basiert auf der Bildung von Micellen, die die Plasmid-DNA in sich aufnehmen und anschließend mit der Zellmembran fusionieren. Die Plasmide kodierten jeweils eine Untereinheit der sGC (Tabelle 12). Die Plasmide wurden kotransfiziert und ergaben sGC-Heterodimere aus  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten. Einige Plasmide kodierten punktmutierte sGC-Untereinheiten mit einem spezifischen Austausch eines Cysteins gegen ein Serin. Die Kotransfektionen führten zur Expression folgender sGC in COS1-Zellen:

**Tabelle 12: Kotransfektionen aus  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten der sGC**

$\alpha_1$ -Untereinheit	$\beta_1$ -Untereinheit	sGC
WT $\alpha_1$	WT $\beta_1$	WT $\alpha_1\beta_1$
WT $\alpha_1$	$\beta_1$ C541S	$\alpha_1/\beta_1$ C541S
$\alpha_1$ C238S	$\beta_1$ WT	$\alpha_1$ C238S/ $\beta_1$

COS1-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) und Zellkulturschalen (Ø 6 cm) bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde den Zellen ein Transfektionsmedium zugegeben, das sich wie folgt (Tabelle 13) zusammensetzte:

**Tabelle 13: Transfektionsmedium**

Zellkulturflasche		Zellkulturschale	
Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM-HG	12 ml	DMEM-HG	1 ml
DEAE-Dextran	0,5 µg/ml	DEAE-Dextran	0,5 µg/ml
Chloroquin	0,15 mM	Chloroquin	0,15 mM
DNA	14 µg	DNA	1 µg

Nach 2 bis 3 Stunden wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen wurden für 2,5 min einem DMSO-Schock (10 % DMSO in PBS) ausgesetzt. Das Herauswaschen von DMSO erfolgte zweimal mit PBS.

## Material und Methoden

---

Nach Zugabe des Nährmediums wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit für 24 bis 72 Stunden im Inkubator kultiviert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

### 2.9 Bestimmung von Sauerstoffradikalen

#### 2.9.1 ESR-Spintrapping zum Nachweis von $\cdot\text{O}_2^-$

Die Elektronenspinresonanz (ESR) ist eine Methode zum Nachweis paramagnetischer Spezies. Das Messprinzip beruht auf der Absorption von Mikrowellenenergie aus einem hochfrequenten elektromagnetischen Feld. Wird die folgende Resonanzbedingung erfüllt (Formel 2), erfolgen Übergänge der ungepaarten Elektronen zwischen den Energieniveaus:

#### Formel 2: Resonanzbedingung (Elektronenspinresonanz)

$$\Delta E = h\nu = g\mu_B B_0$$

$h$  = Plancksches Wirkungsquantum

$\nu$  = Frequenz des elektromagnetischen Feldes

$g$  = Aufspaltungsfaktor

$\mu_B$  = Bohrsches Magneton

$B_0$  = magnetische Feldstärke

Aus messtechnischen Gründen wird die Absorption der Mikrowellenenergie meist als erste Ableitung registriert. Das entstandene Spektrum wird wesentlich durch den Aufspaltungsfaktor ( $g$ ) und durch die Hyperfeinaufspaltung bestimmt.

Ein freies Elektron besitzt einen  $g$ -Wert von  $g_{\text{elektron}} = 2,00232$ . Der  $g$ -Wert ist aber abhängig von der Orientierung des radikalischen Moleküls/Ions im äußeren Magnetfeld, so dass der  $g$ -Wert sich meist vom  $g_{\text{elektron}}$ -Wert unterscheidet.

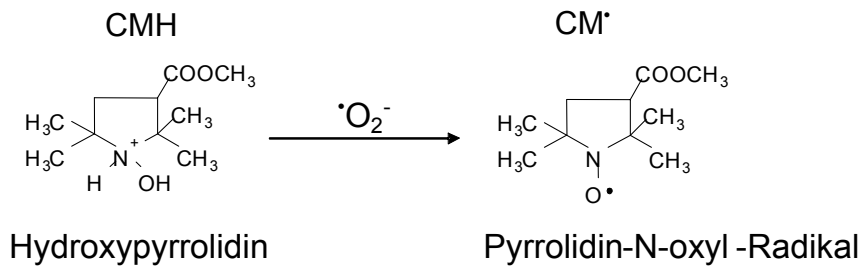
Die Hyperfeinaufspaltung reflektiert die Wechselwirkung des Magnetfeldes des ungepaarten Elektrons (Spin) mit dem benachbarten Kernspin ( $I$ ). Die Anzahl der Spektrumslinien ( $2I+1$ ) und die Aufspaltungskonstanten sind vom Kernspin, von der Art und von der Position des Kerns in einem Molekül abhängig.

Das  $\cdot\text{O}_2^-$  war wegen seiner Kurzlebigkeit in unserem biologischen Zell-System für eine direkte Messung nicht erfassbar. Mit Spintrapping war es möglich,  $\cdot\text{O}_2^-$  in einem biologischen System durch eine spezifische Reaktion mit 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidinhydrochlorid (CMH) unter Bildung eines stabileren paramagnetischen



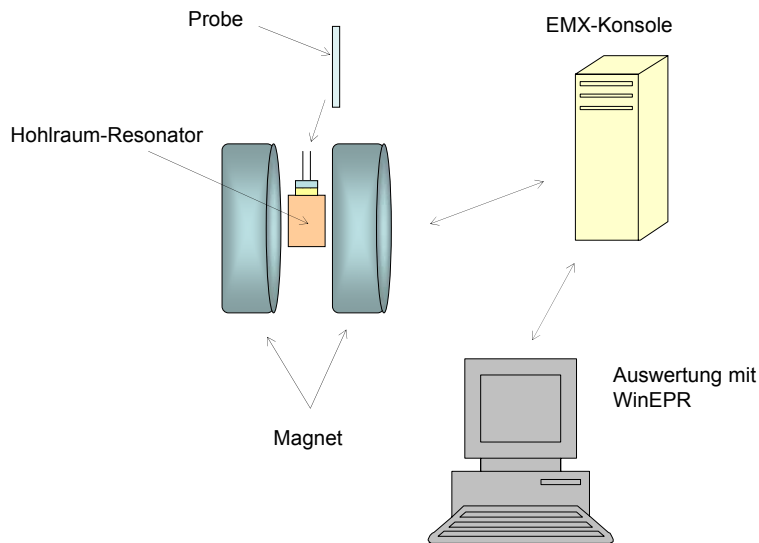
## Material und Methoden

Pyrrolidin-N-oxyl-Radikals (Abbildung 11) nachzuweisen (Hwang *et al.*, 2003; McNally *et al.*, 2003).



**Abbildung 11: Reaktion von CMH mit  $\cdot\text{O}_2^-$**

Die ESR-Messungen erfolgten mit einem EMX-Spektrometer von Bruker mit einem X-Band-Hohlraum-Resonator. Konfluente VSMC (Passage < 20) in 10 cm Zellkultur-schalen wurden für 24 Stunden in einem Hungermedium kultiviert, mit PBS zweimal gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach dem Zentrifugieren bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in modifiziertem HEPES-Tyrode-Puffer (180  $\mu\text{l}$ ) resuspendiert. Nach einer Ruhezeit von 15 min bei 37 °C im Inkubator wurde CMH (Endkonzentration: 2 mM) zugegeben, die Zellsuspension in Einmal-Mikro-Kapillaren überführt und die Kapillare im Hohlraum-Resonator fixiert (siehe Abbildung 12). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde zuerst ein Feld-Scan mit folgenden Parametern durchgeführt: microwave frequency = 9,72 GHz; modulation amplitude = 2 G; microwave power = 20mW; conversion time = 81,92 ms; time constant = 81,92 ms. Die Bildung des stabilen paramagnetischen Pyrrolidin-N-oxyl-Radikals CM• wurde anschließend in einem Zeit-Scan der Intensitätsveränderung des Tieffeld-Signals erfasst. Dazu wurden folgende Parameter eingestellt: conversion time = 655,4 ms; time constant = 81,9 ms, total time = 671,1 sec. Die Aufzeichnung und Bearbeitung der Signale erfolgte mit WinEPR. Die Steigungen der aufgezeichneten Kurven der Zeit-Scans wurden mittels linearer Regression (Graphpad Prism) ermittelt. Die Steigung für den Leerwert wurde von den Steigungen der Kontrolle und der Probe abgezogen.

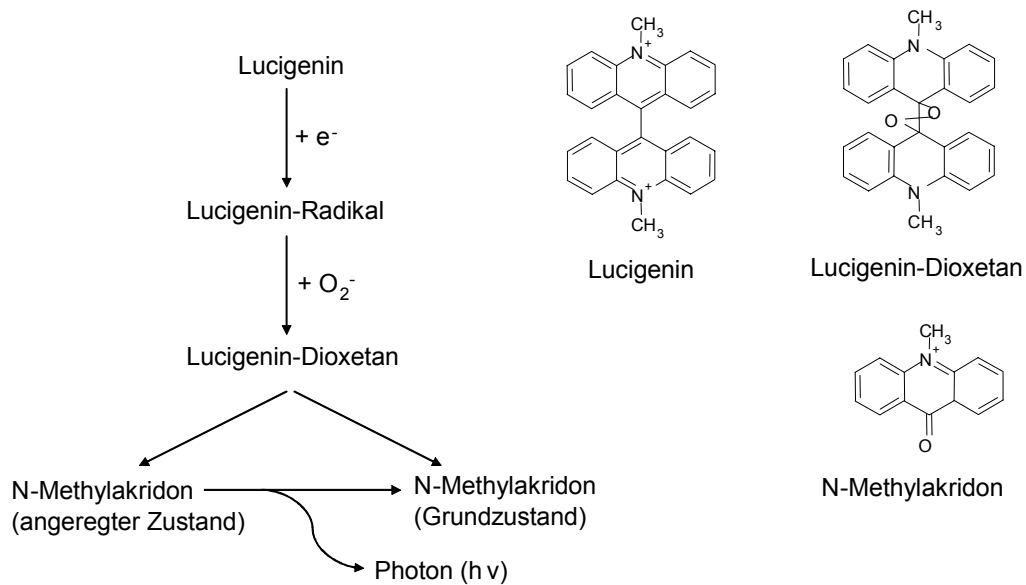


**Abbildung 12: Aufbau der ESR-Messung**

### **2.9.2 Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz zum Nachweis von $\cdot\text{O}_2^-$**

Bei der Messung der Lucigenin-vermittelten Chemilumineszenz werden Lichtquanten, nach Reaktion des Lucigenins mit  $\cdot\text{O}_2^-$ , erfasst.

Das Messprinzip der Lucigenin-vermittelten Chemilumineszenz basiert auf einer chemischen Reaktion des Lucigenins mit  $\cdot\text{O}_2^-$  (Abbildung 13). Dabei entstehen angeregte Reaktionsprodukte im Triplettzustand, die nach einer Dissipation von Lichtquanten in den Grundzustand zurückfallen. Diese Lichtquanten wurden mit einem modifizierten Szintillationszähler (siehe 1.8) erfasst. Zur Steigerung der Empfindlichkeit waren die Photoverstärker-Röhren, die die Lichtimpulse in elektrische Messsignale umsetzen, in einen out-of-Koinzidenz-Modus geschaltet.



**Abbildung 13: Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz (Vasquez-Vivar *et al.*, 1997)**

Für die Messung wurden konfluente VSMC in 10 cm Zellkulturschalen (Passage < 20) in Hungermedium für 24 Stunden kultiviert, mit PBS zweimal gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in modifiziertem HEPES-Tyrode-Puffer (siehe 1.9) resuspendiert und in Szintillationsvials (2 ml) überführt. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten im Inkubator bei 37 °C wurden die Vials unter Ausschluss von Licht in den Zähler gestellt. Die Zugabe von Lucigenin (Endkonzentration: 5  $\mu$ M) erfolgte unter Ausschluss von Licht. Nach einer Wartezeit von 2 min wurde die Zählung bei Raumtemperatur gestartet. Die Probe, die Kontrolle und der Leerwert wurden seriell in Reihe gemessen. Dabei wurde jede Probe sechsmal 30 Sekunden gemessen und die Signale in Zählungen pro Minute (counts per minute, cpm) angezeigt. Aus den letzten 4 Messungen wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Der Leerwert wurde von Kontrolle und Probe abgezogen und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle dargestellt.

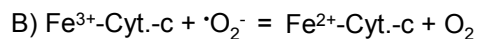
## Material und Methoden

### 2.9.3 Cytochrom-c-Reduktionsassay

Der photometrische Cytochrom-c-Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  (McCord und Fridovich, 1969b) beruht auf der Reduktion des Hämproteins Ferricytochrom-c ( $\text{Fe}^{3+}$ -Cyt.-c) zum Ferrocycytochrom-c ( $\text{Fe}^{2+}$ -Cyt.-c) mit einer Änderung des Extinktionskoeffizienten bei 550 nm ( $\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Bei diesem photometrischen Nachweis wurde der sGC-Aktivitätspuffer verwendet.  $\cdot\text{O}_2^-$  wurde mit XO (0, 1, 3, 6, 10, 15 mU/ml) und Hypoxanthin (0,2 mM) erzeugt. Die Messung erfolgte in Einmal-Küvetten ( $d=1\text{cm}$ ) bei Raumtemperatur für 5 min. Nach Zugabe von Cytochrom-c (Endkonzentration: 80  $\mu\text{M}$ ) wurde die Reaktion mit XO gestartet. Ein Überschuss an SOD (100 U/ml) blockierte die  $\cdot\text{O}_2^-$ -vermittelte Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$ - zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Cyt.-c und diente deshalb bei allen Versuchsbedingungen als Kontrollwert (Abbildung 14). Die Zunahme der Extinktion bei 550 nm wurde für 5 min registriert und die Steigung mittels linearer Regression (Graphpad prism) berechnet. Der Abzug des Kontrollwerts ergab die Absorptionsdifferenz ( $\Delta A$ ). Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes wurde ausgehend von  $\Delta A$  die Konzentration des gebildeten  $\text{Fe}^{2+}$ -Cyt.-c bestimmt (Formel 3 A). Die Berechnung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildungsrate basierte auf der 1:1-Stöchiometrie der Nachweisreaktion (Formel 3 B, C).

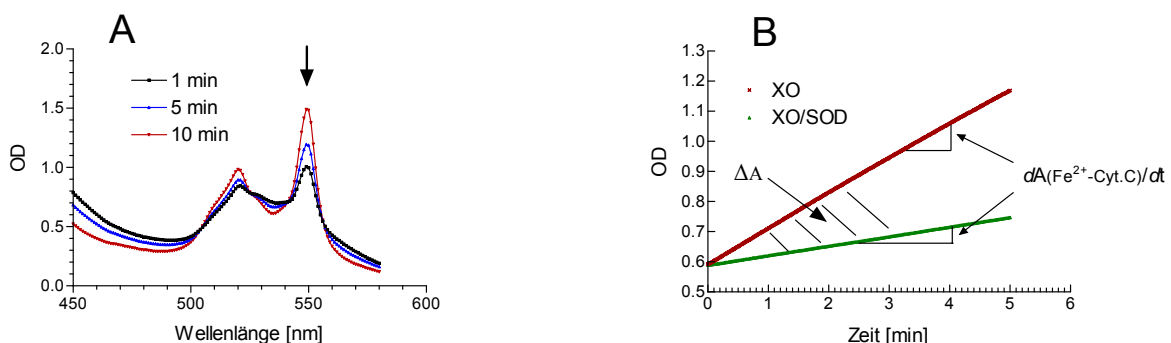
#### Formel 3: Bestimmung der $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildungsrate

$$\text{A) } \Delta c(\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt.-c}) = \frac{\Delta A(\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt.-c})}{K_{550} \cdot d}$$



$$\text{C) } \Delta c(\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt.-c}) = \Delta c(\cdot\text{O}_2^-)$$

$\Delta c\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt.-c}$ : Bildungsrate ( $d[\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt.-c}]/dt$ )  
 $\Delta A\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt.-c}$ : Absorptionsdifferenz ( $dA/dt$ )  
 $k_{550}$ :  $21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$   
 $\Delta c(\cdot\text{O}_2^-)$ : Bildungsrate ( $d[\cdot\text{O}_2^-]/dt$ )  
 $d$ : Schichtdicke der Küvette (1 cm)



**Abbildung 14: (A) Veränderung des UV-VIS Spektrum von Cytochrom-c mit XO (15 mU/ml) und Hypoxanthin (0,2 mM) über die Zeit; (B) Zeitverlauf der Extinktionsänderung bei 550 nm.**

Parallel zu allen Versuchsbedingungen wurde eine Referenz mit einem Überschuss SOD (100 U/ml) ermittelt. Die tatsächliche  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion ergab sich aus der Subtraktion der Steigungen (XO - XO/SOD).

### 2.10 Nachweis von Sulfinylradikalen

Die direkte Messung von Sulfinylradikalen ( $R-SOO^{\bullet}$ ) mit ESR liefert einen Hinweis auf eine oxidative Modifikation von Proteinthiolen.

Hämoglobin ( $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in modifiziertem HEPES-Tyrode-Puffer mit Hypoxanthin ( $0,2 \text{ mM}$ ) wurde entweder mit einem Ein-Elektronen-Oxidant  $Ce^{4+}/NTA$  ( $2 \text{ mM}$ ) oder mit XO ( $4 \text{ mU}/\text{ml}$ )  $2 \text{ min}$  bei Raumtemperatur inkubiert, in Teflonröhrchen überführt und in flüssigem  $N_2$  tiefgefroren. Die ESR-Messung erfolgte mit einem EMX-Spektrometer von Bruker (siehe 1.8) bei  $77 \text{ K}$  ( $-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Dabei wurde die tiefgefrorene Probe in ein Dewargefäß aus Glas, das mit flüssigem  $N_2$  gefüllt war, überführt und in den Hohlraum-Resonator eingebracht. Es wurde ein Feld-Scan durchgeführt mit folgenden Parametern:

microwave frequency =  $9.45 \text{ GHz}$ ; modulation amplitude =  $4 \text{ G}$ ; microwave power =  $20 \text{ mW}$ ; conversion time =  $81,92 \text{ ms}$ ; time constant =  $327,68 \text{ ms}$ ; sweep time =  $83,89 \text{ s}$ ; number of scans =  $10 - 16$ .

Zur Blockierung der Thiolgruppen wurde Hämoglobin ( $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit DTNB ( $4,5 \text{ mM}$ )  $10 \text{ min}$  auf Eis inkubiert. Die Entfernung des überschüssigen DTNB erfolgte mit der Größenausschlusschromatographie und führte zu einer Endkonzentration des Hämoglobins von  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (siehe 2.5.4).

### 2.11 cGMP-Enzym-Immuno-Assay (cGMP-EIA)

Die Messung von cGMP in VSMC erfolgte mit einem Enzym-Immuno-Assay (EIA) (siehe 1.1.11). Dieser Ligandenbindungsassay beruht auf einer kompetitiven AK-Antigen-Reaktion. Bei diesem Assay binden in-vivo produziertes cGMP und in-vitro zugesetztes Peroxidase-konjugiertes cGMP kompetitiv und konzentrationsabhängig als Antigene an einen Anti-cGMP-Antikörper (Anti-cGMP-AK) aus Kaninchen. Zusätzlich kommt es zu einer AK-AK-Reaktion von Anti-cGMP-AK und immobilisiertem Anti-Kaninchen-AK (Zweitantikörper). Nach Herauswaschen nicht gebundener Komponenten wird Substrat zugegeben, das die Peroxidase in einen photometrisch detektierbaren Farbstoff umsetzt (Abbildung 15).

Für die Messung von cGMP-Konzentrationen wurden konfluente VSMC in 24-well-Zellkulturschalen (Passage  $< 20$ ) in Hungermedium für  $24 \text{ Stunden}$  kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen, mit  $500 \mu\text{l}$  modifiziertem HEPES-Tyrode-Puffer (siehe 1.9) überschichtet und anschließend im Inkubator für  $10 \text{ min}$  stehen gelassen. Danach erfolgte die Zugabe des unspesi-

## Material und Methoden

fischen Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (siehe 1.1.2) mit einer Endkonzentration von 0,5 mM. Nach weiteren 10 min im Inkubator wurden die VSMC je nach Versuchsprotokoll mit folgenden Agenzien (Tabelle 14) behandelt:

**Tabelle 14:  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildner und -Blocker im cGMP-EIA**

$\cdot\text{O}_2^-$ -Bildner	Inkubationszeit	$\cdot\text{O}_2^-$ -Blocker	Inkubationszeit
PDGF (50 ng/ml)	2 min	PEG-SOD (100 U/ml)	15 min
Ang II (100 nMol)	20 min		
DMNQ (10 $\mu\text{Mol}$ )	2 min		

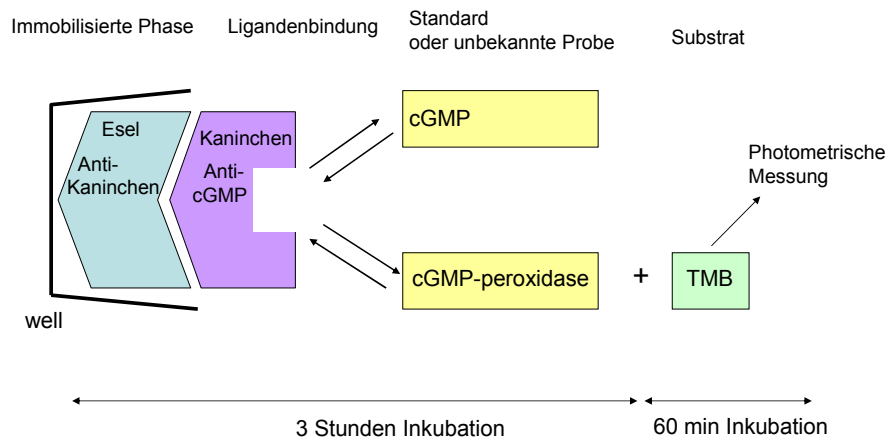
Die cGMP-Produktion erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator für 10 min. Je nach Versuchsprotokoll fand dabei eine basale oder eine YC-1-stimulierte cGMP-Produktion statt. Nach Beendigung der cGMP-Produktion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit flüssigen N<sub>2</sub> schockgefroren. Bis zur Verwendung im cGMP-EIA wurden die 24-well-Platten bei -80 °C aufbewahrt.

Vorgefertigte Puffer und Lösungen waren in dem cGMP-EIA-Kit meist in fester Form enthalten und mussten vor Versuchsbeginn nach Anweisung aufgelöst werden (Amersham Pharmacia Biotec, 1999). Die Lyse der gefrorenen VSMC in den 24-well-Platten erfolgte mit dem Lyse-Puffer (Bestandteil des Kits). Zur Erhöhung der Sensitivität der cGMP-Detektion wurde das Zellhomogenat mit einem Acetylierungsreagenz aus einem Volumenanteil Acetanhydrid und zwei Volumenanteilen Triethylamin (Bestandteile des Kits) behandelt. Danach wurden die Proben in Reservoirs (wells) gegeben (Bestandteil des Kits), die mit Anti-Kaninchen-AK beschichtet waren. Zusätzlich wurde der Anti-cGMP-AK zugegeben. Parallel zu den Proben wurden Reservoirs vorbereitet für eine Standardreihe mit bekannten cGMP-Konzentrationen (0 – 512 fmol/well), für einen Leerwert und für eine Bestimmung unspezifischer Bindungen. Es folgte eine Inkubation von zwei Stunden, der sich nach Zugabe Peroxidase-konjugierter cGMP eine einstündige Inkubation anschloss. Danach wurden die Reservoirs sehr intensiv mit einem Waschpuffer (Bestandteil des Kits) gewaschen und das Substrat 3,3',5',5'-Tetramethylbenzidin (TMB, Bestandteil des Kits) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min wurde für eine Endpunktsbestimmung Schwefelsäure (1 M) hinzugegeben.

## Material und Methoden

Die Absorption wurde bei 450 nm mit dem Mikrotiterplatten-Photometer MRX Revelation TC (siehe 1.8) erfasst.

Die cGMP-Bestimmung der Proben erfolgte anhand einer Standardkurve aus eingesetzten Standards für cGMP (0 – 512 fmol/well) und der prozentualen photometrischen Absorptionsänderung (% B/B0). Die Werte wurden angegeben als fmol/well.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des cGMP-EIA (Amersham Pharmacia Biotec, 1999)**

### 2.12 Computerprogramme

- MS Office 2000 für Windows, Microsoft Deutschland (Bad Homburg)
- Graphpad Prism 3.02 für Windows, GraphPad Software, San Diego (USA)
- Bruker WinEPR 2.11 für Windows, Bruker Biospin (Rheinstetten)
- Bruker WinEPR Aquisition für Windows, Bruker Biospin (Rheinstetten)
- Revelation Software 4.06, Dynex Technologies, Chantilly (USA)
- Scion Image beta 4.0.2, Scion Corporation, Frederick (USA)

### 2.13 Statistische Bewertung der Versuchsergebnisse

Die meisten Ergebnisse stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dar. Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde mit verschiedenen Chargen der gereinigten sGC mit unterschiedlichen basalen Enzym-Aktivitäten durchgeführt. Bei einigen Versuchen wurden deshalb die Kontrollwerte auf 100 % gesetzt. Die Kurvenanpassungen der graphischen Darstellungen, die statistischen Berechnungen der Signifikanz und die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgten mit Graphpad Prism. Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte von Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) und deren statistischer Vergleich erfolgte nach Normalisierung der Werte auf Maximal- und Minimalwerte (%) und anschließender Kurvenanpassung nach nichtlinearer sigmoidaler Regression mit variablen Hill-Koeffizienten. Die statistische Signifikanz zwischen 2 Mittelwerten wurde mit dem ungepaarten Student's t-Test errechnet. Bei multiplen Vergleichen wurde eine One-way analysis of variance (ANOVA) durchgeführt, gefolgt von einem multiplen Vergleichstest nach Bonferroni bzw. Newman-Keul oder gefolgt von einem Vergleichstest in Bezug zur Kontrolle (Dunnett-Korrektur). Der statistische Vergleich von KWK erfolgte mit den logarithmierten IC<sub>50</sub>-Werten.

Ein P-Wert von weniger als 0,05 ( $p < 0,05$ ) wurde als statistisch signifikant angenommen.



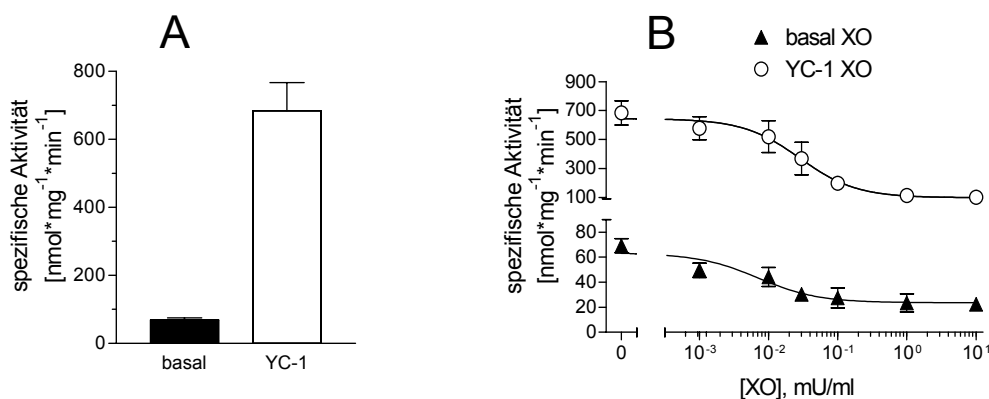
### III Ergebnisse

#### I sGC-Aktivitätsmessungen

##### 1.1 Hemmung der sGC-Aktivität durch Superoxid

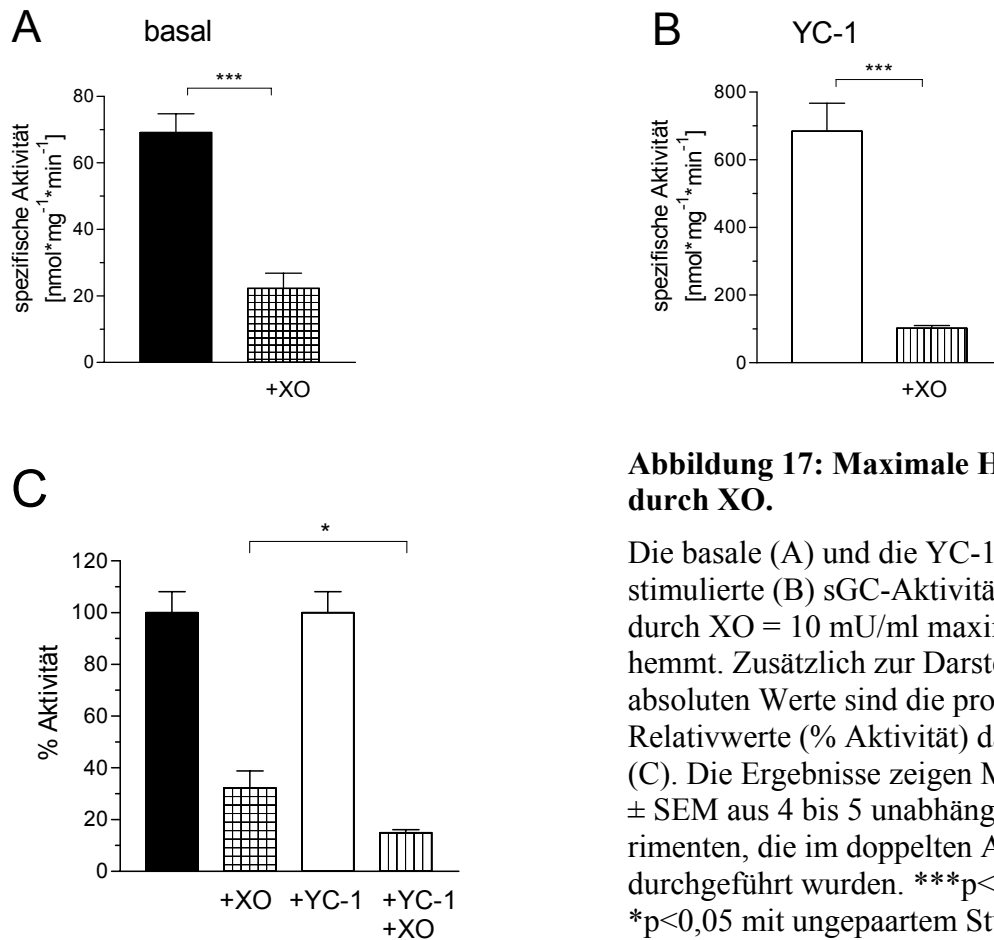
Zur Charakterisierung des Hemmeffekts von Superoxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) auf die Aktivität der gereinigten sGC wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit dem  $\cdot\text{O}_2^-$ -generierenden System Xanthinoxidase/Hypoxanthin erstellt. Dabei wurde eine KWK der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität gemessen. Die Aktivität der ungehemmten basalen und YC-1- (100  $\mu\text{M}$ ) stimulierten Aktivität war in diesen Versuchen  $69,1 \pm 5,6$  bzw.  $684,2 \pm 83,1$   $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . YC-1 führte zu einer Stimulation der sGC-Aktivität um den Faktor 10 (Abbildung 16 A). Die KWK mit XO (0,001 – 10  $\text{mU/ml}$ ) zeigte eine abnehmende basale und YC-1-stimulierte Aktivität (Abbildung 16 B).  $\cdot\text{O}_2^-$  führte zu einer maximalen Hemmung der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität um 63 % bzw. um 85 % (Abbildung 17 C). Die Normalisierung der in Abbildung 16 B dargestellten Werte und die anschließende nichtlineare Regression (siehe II.2.13) ergab  $\text{IC}_{50}$ -Werte der basalen und der YC-1-stimulierten Aktivitätsabnahme durch  $\cdot\text{O}_2^-$  von  $\text{IC}_{50(\text{basal})} = 0,003$   $\text{mU/ml}$  bzw.  $\text{IC}_{50(\text{YC-1})} = 0,022$   $\text{mU/ml}$  (Abbildung 18). Die  $\log_{10}\text{IC}_{50}$ -Werte der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität waren signifikant unterschiedlich:

$$\log_{10} \text{IC}_{50(\text{basal})} = -2,51 \pm 0,3 \text{ vs. } \log_{10} \text{IC}_{50(\text{YC-1})} = -1,65 \pm 0,2.$$



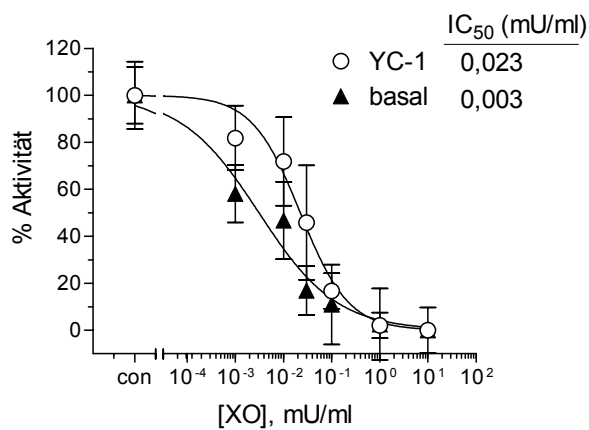
**Abbildung 16: (A) Basale und YC-1- (100  $\mu\text{M}$ ) stimulierte sGC-Aktivität; (B) KWK mit XO (0; 0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 1; 10  $\text{mU/ml}$ ) und Hypoxanthin (0,2  $\text{mM}$ ).**

Es wurden pro Probe ca. 5 - 10 ng gereinigte sGC eingesetzt und bei 37 °C für 10 bzw. 20 min im Wasserbad inkubiert. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 bis 5 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. Die Kurvenanpassung in (B) erfolgte nach einer nichtlinearen sigmoidalen Regression mit variablem Hill-Koeffizienten.



**Abbildung 17: Maximale Hemmung durch XO.**

Die basale (A) und die YC-1- (100  $\mu$ M) stimulierte (B) sGC-Aktivität wurden durch XO = 10 mU/ml maximal gehemmt. Zusätzlich zur Darstellung der absoluten Werte sind die prozentualen Relativwerte (% Aktivität) dargestellt (C). Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 bis 5 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. \*\*\* $p < 0,001$  \* $p < 0,05$  mit ungepaartem Student's t-Test.

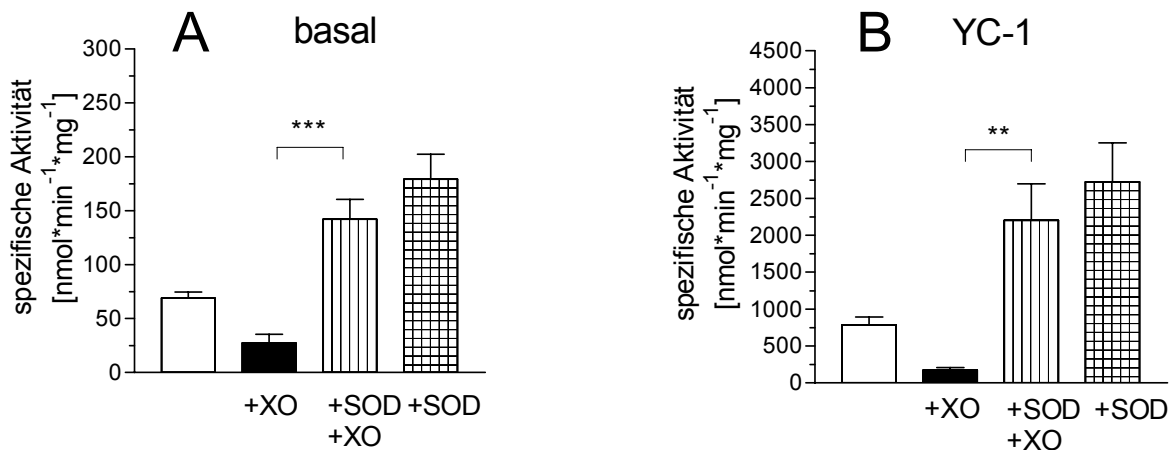


**Abbildung 18: Berechnung der  $IC_{50}$  aus Abbildung 16 B.**

Normalisierung auf Maximal- und Minimalwerte und anschließende lineare Regression mit variablen Hillkoeffizienten. Die beiden Kurven unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 1.2 Hemmung der sGC-Aktivität ist mit SOD reversibel

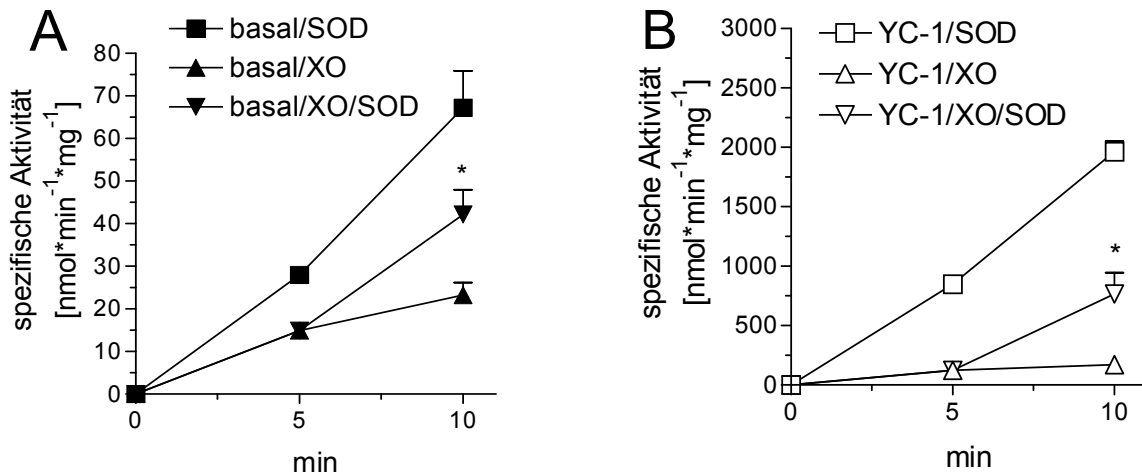
Um zu überprüfen, ob der Hemmeffekt der sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  aufgehoben werden kann, wurde Superoxiddismutase (SOD) zugegeben, ein spezifischer Fänger von  $\cdot\text{O}_2^-$ . In Abbildung 19 ist die Aufhebung der Hemmung der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität durch Vorinkubation mit SOD dargestellt. Die SOD zeigte dabei eine zusätzliche Aktivierung der sGC-Aktivität um das 2,1-fache (basal) und 2,8-fache (YC-1).



**Abbildung 19: Die Aufhebung der basalen (A) und der YC-1-stimulierten (B) sGC-Aktivitätshemmung durch Prä-Inkubation mit SOD.**

Pro Probe wurden ca. 5-15 ng gereinigte sGC eingesetzt. Die Proben wurden 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Versuchsbedingungen bei (A) und (B) waren wie folgt: XO = 0,1 mU/ml; SOD = 100 U/ml; YC-1 = 100  $\mu\text{M}$ . Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 bis 6 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  mit Newman-Keuls-Korrektur.

Um herauszufinden, ob es sich bei der Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  um einen reversiblen Inhibitionsmechanismus handelt, wurde bei einigen Proben 5 min nach dem Start der Inkubation SOD hinzugegeben. Sowohl bei der basalen als auch bei der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität war nach Zugabe von SOD eine signifikante Zunahme der  $\cdot\text{O}_2^-$ -gehemmten cGMP-Produktion zu beobachten (Abbildung 20), was eine schnelle reversible Modifikation der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  anzeigt.

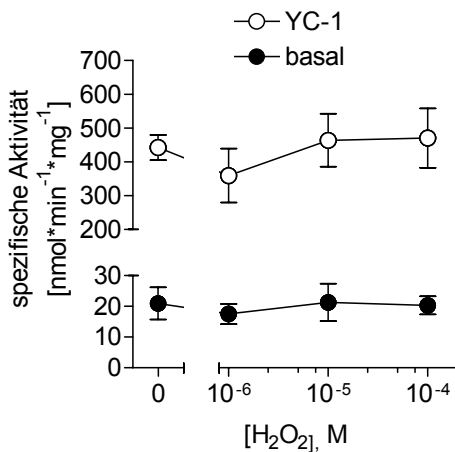


**Abbildung 20: Reversible Hemmung der basalen (A) und der YC-1- (100 µM) stimulierten (B) sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$ .**

Pro Probe wurden ca. 5-15 ng gereinigte sGC eingesetzt. Die Proben wurden bei 37°C für 5 und 10 min mit XO (0,1 mU/ml) oder Aqua bidest als Kontrolle im Wasserbad inkubiert. Bei den Inkubationen von 10 min wurde nach 5 min entweder SOD (300 U/ml) oder Aqua bidest als Kontrolle hinzugegeben. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. \* $p < 0,05$  mit ungepaartem Student's t-Test.

### 1.3 Einfluss von $\text{H}_2\text{O}_2$ auf die sGC-Aktivität

Da bei der Produktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch Disproportionierung auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht, war es unumgänglich, den Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die basale und YC-1-stimulierte sGC-Aktivität zu untersuchen. Die Inkubation erfolgte mit 1, 10 und 100 µM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und ergab keine signifikante Änderung der basalen und YC-1-stimulierten sGC-Aktivität (Abbildung 21).



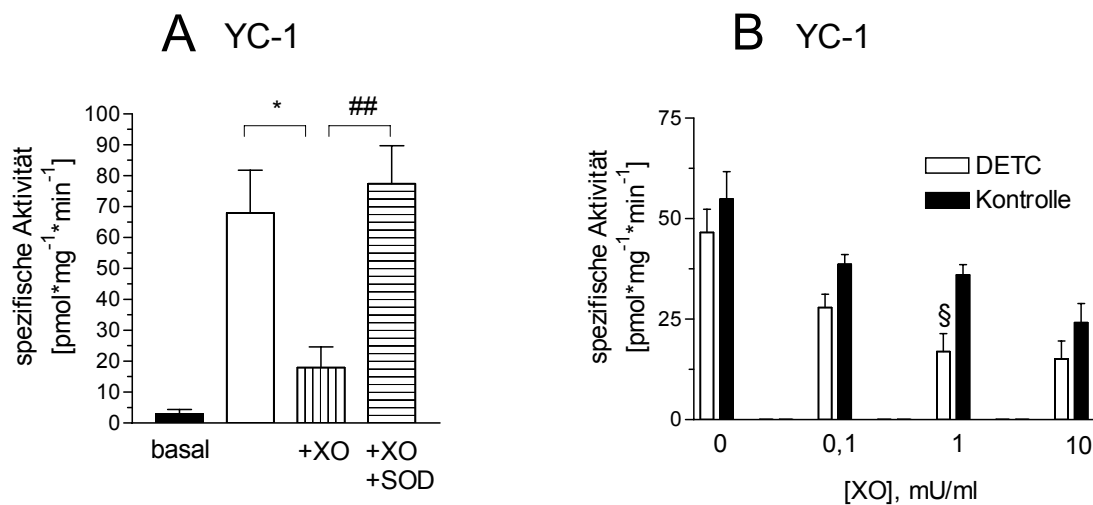
**Abbildung 21: Basale und YC-1- (100 µM) stimulierte sGC-Aktivität mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 1, 10, 100 µM).**

Pro Probe wurden ca. 5-15 ng gereinigte sGC eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

### 1.4 Hemmung der sGC in Gewebe- und Zell-Homogenaten

Um zu zeigen, dass auch die Aktivität der sGC in Homogenaten durch  $\cdot\text{O}_2^-$  gehemmt wird, wurden Aktivitätsmessungen in Homogenaten aus VSMC (Abbildung 22 A) und aus isolierten Schweinekoronararterien (porcine coronary artery, PCA) (Abbildung 22 B) durchgeführt. YC-1 (100  $\mu\text{M}$ ) steigerte die Aktivität der sGC in VSMC um das 23-fache und in PCA-Homogenaten um das 13-fache gegenüber der basalen Aktivität (Abbildung 22 A, B). Die sGC-Aktivität in VSMC konnte durch Zugabe von 3 mU/ml XO um 74 % gehemmt werden. Diese Hemmung wurde durch Zusatz von SOD (25 U/ml) komplett aufgehoben (Abbildung 22 A).

Um zu überprüfen, ob die endogene SOD in den Homogenaten die Sensitivität der sGC gegenüber  $\cdot\text{O}_2^-$  vermindert, wurde der Einfluss des SOD-Inhibitors Diethyldithiocarbamat (DETC) auf die Hemmung der sGC durch XO/HX untersucht. Die sGC in den mit DETC (1 mM; 20 min) vorbehandelten Koronararterien zeigten gegenüber den unbehandelten Kontrollen eine größere Empfindlichkeit gegen  $\cdot\text{O}_2^-$  (Abbildung 22 B). Die sGC-Aktivitätshemmung der DETC-vorbehandelten Koronararterien war bei 1 mU/ml XO signifikant niedriger als die sGC-Aktivität der entsprechenden Kontrollen.



**Abbildung 22: sGC-Aktivitätsmessungen an Homogenaten von VSMC und PCA.**

(A) Pro Probe wurden 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein des VSMC-Homogenats eingesetzt. Die Proben wurden 10 min bei 37°C im Wasserbad unter folgenden Bedingungen inkubiert:

YC-1 = 100  $\mu\text{M}$ ; XO = 3 mU/ml; SOD = 25 U/ml.

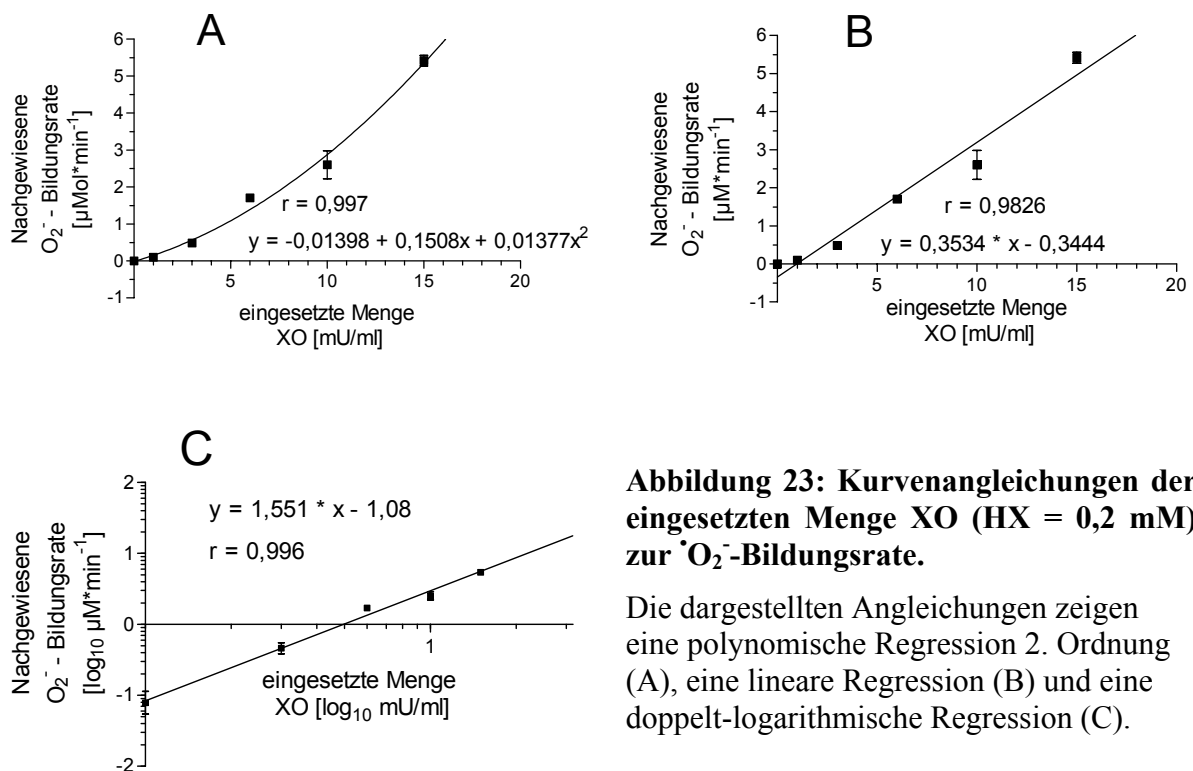
(B) PCA wurde mit DETC (1 mM) oder unbehandelt (Kontrolle) für 20 min inkubiert. Pro Probe wurden 20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein des PCA-Homogenats eingesetzt (YC-1 = 100  $\mu\text{M}$ ; XO = 0/ 0,1/ 1/ 10 mU/ml). Gezeigt wird eine statistische Auswertung aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM). \* $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  mit Bonferroni-Korrektur; § $p < 0,05$  mit ungepaartem Student's t-Test.

## 2 Superoxidmessungen

### 2.1 In-vitro-Superoxidmessung mit der Cytochrom-c-Methode

Um die Superoxid-Bildungsrate des Systems Xanthinoxidase/Hypoxanthin (XO/HX) zu bestimmen, wurde die Cytochrom-c-Methode angewandt. Bei dieser Methode wird die Reduktion des Ferri-Cytochrom-c ( $\text{Fe}^{3+}$ -Cyt c) zum Ferro-Cytochrom-c ( $\text{Fe}^{2+}$ -Cyt c) photometrisch bei 550 nm erfasst und die  $\text{O}_2^-$ -Bildungsrate mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet (siehe II.2.9.3).

Die in Abbildung 23 dargestellten Kurven zeigen Angleichungen aus der eingesetzten Menge XO (0, 1, 3, 6, 10, 15 mU/ml) zur nachgewiesenen  $\text{O}_2^-$ -Bildungsrate. Eine polynomi-sche Regression 2. Ordnung (Abbildung 23 A), eine lineare Regression (Abbildung 23 B) und eine doppelt-logarithmische Regression (Abbildung 23 C) wurden zur Angleichung der Kurve probeweise gewählt. Dabei zeigt die polynomische Regression 2. Ordnung eine bessere Anpassung an die experimentellen Daten als die lineare Anpassung. Die  $\text{O}_2^-$ -Bildungsraten wurden daher nach der polynomischen Regression 2. Ordnung und nach der doppelt-logarithmischen Regression bei niedrigen Bildungs-raten ( $< 0,1$  mU/ml) berechnet.



**Abbildung 23: Kurvenangleichungen der eingesetzten Menge XO (HX = 0,2 mM) zur  $\text{O}_2^-$ -Bildungsrate.**

Die dargestellten Angleichungen zeigen eine polynomi-sche Regression 2. Ordnung (A), eine lineare Regression (B) und eine doppelt-logarithmische Regression (C).

## Ergebnisse

**Tabelle 15: Darstellung der IC<sub>50</sub>-Werte und Berechnung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildungsrate mit Hilfe der Kurvenangleichungen**

IC <sub>50</sub>			Kurvenangleichung	
Stimulation	Kapitel	XO [mU*ml <sup>-1</sup> ]	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> [μMol*min <sup>-1</sup> ]	
			Abbildung 23 A	Abbildung 23 C
basal	1.1	3,09E-03	---	1,02E-05
YC-1	1.1	0,02	---	2,23E-04
YC-1/CO	4	0,49	0,06	0,03
DEA- $\cdot\text{NO}$	4	0,37	0,04	0,02
PIX	5.1	7,46	1,88	1,88
HMR3448	5.1	22,85	10,62	10,66
YC-1 *	1.4	0,77	0,11	0,06
YC-1/DETC *	1.4	0,07	---	1,42E-03

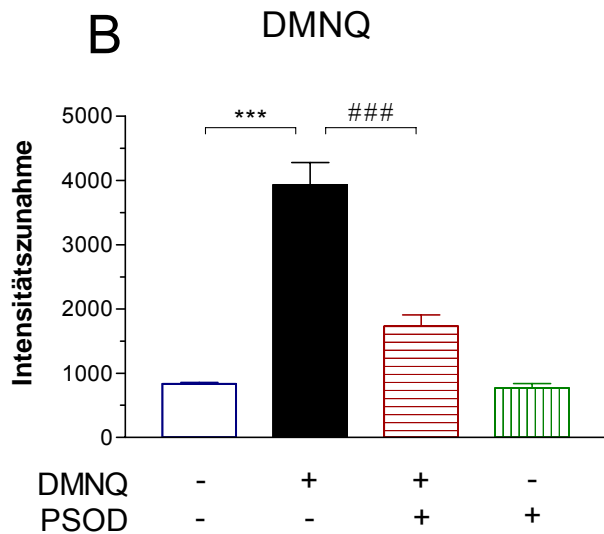
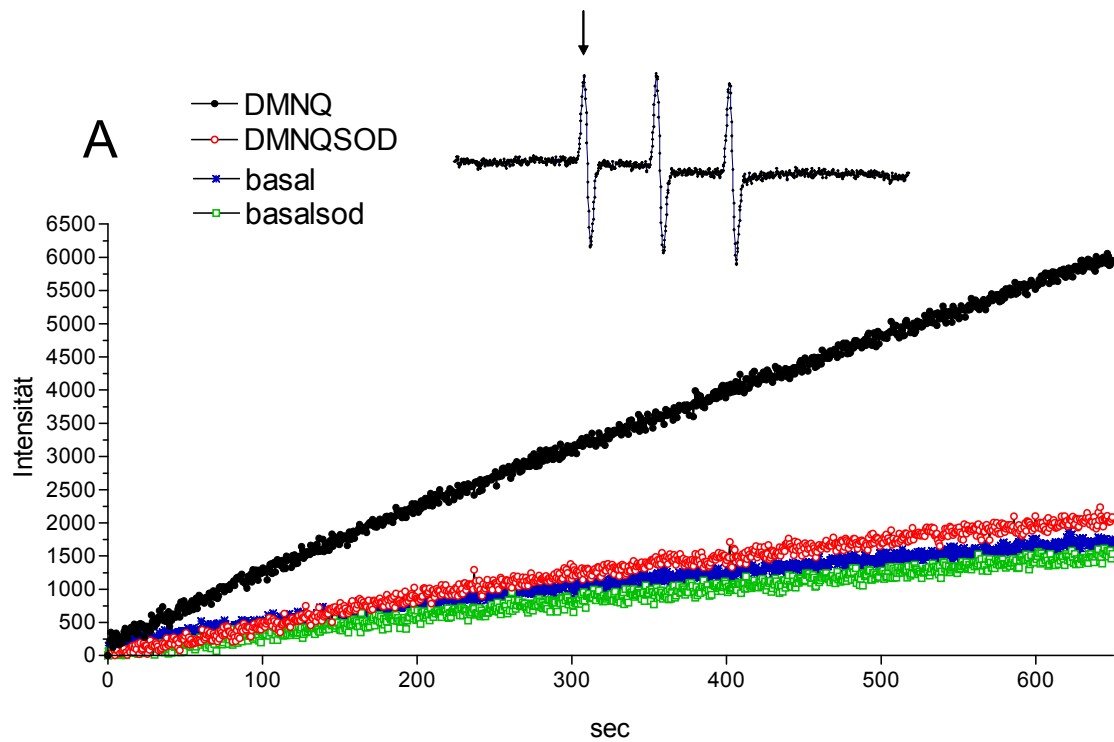
\*Homogenat aus Schweinekoronararterien

## 2.2 Nachweis von Superoxid in-vivo mit ESR

Die ESR-Spintrapping-Methode mit CMH wurde für den Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  in VSMC angewendet (II2.9.1). Diese Methode basiert auf einer spezifischen Reaktion von CMH und  $\cdot\text{O}_2^-$  zum paramagnetischen  $\text{CM}^\cdot$ -Radikal.

Der intrazelluläre Redoxcyclus DMNQ zeigte im Vergleich zur basalen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion einen ca. 5-fachen Anstieg der Superoxid-Produktion (Abbildung 25). Dieser Anstieg konnte fast komplett mit einem Überschuss an membrangängiger Polyethylenglykol-Superoxiddismutase (PEG-SOD, 100 U/ml) geblockt werden. Die Zugabe von Katalase zeigte dagegen keine Auswirkungen auf die Radikalbildung (Daten nicht abgebildet).

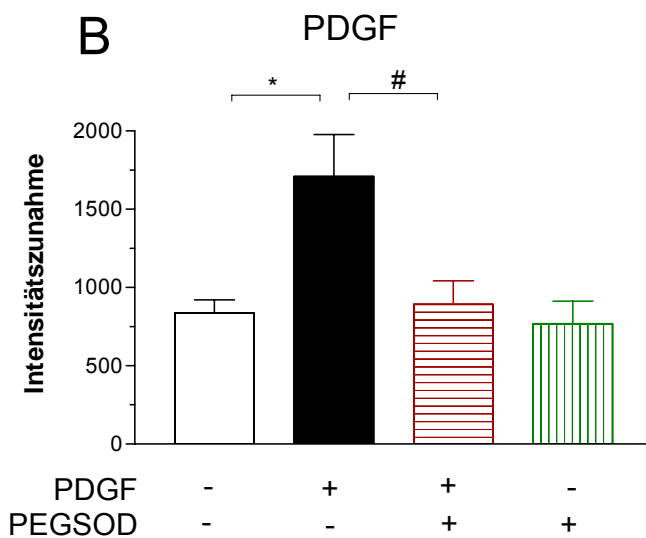
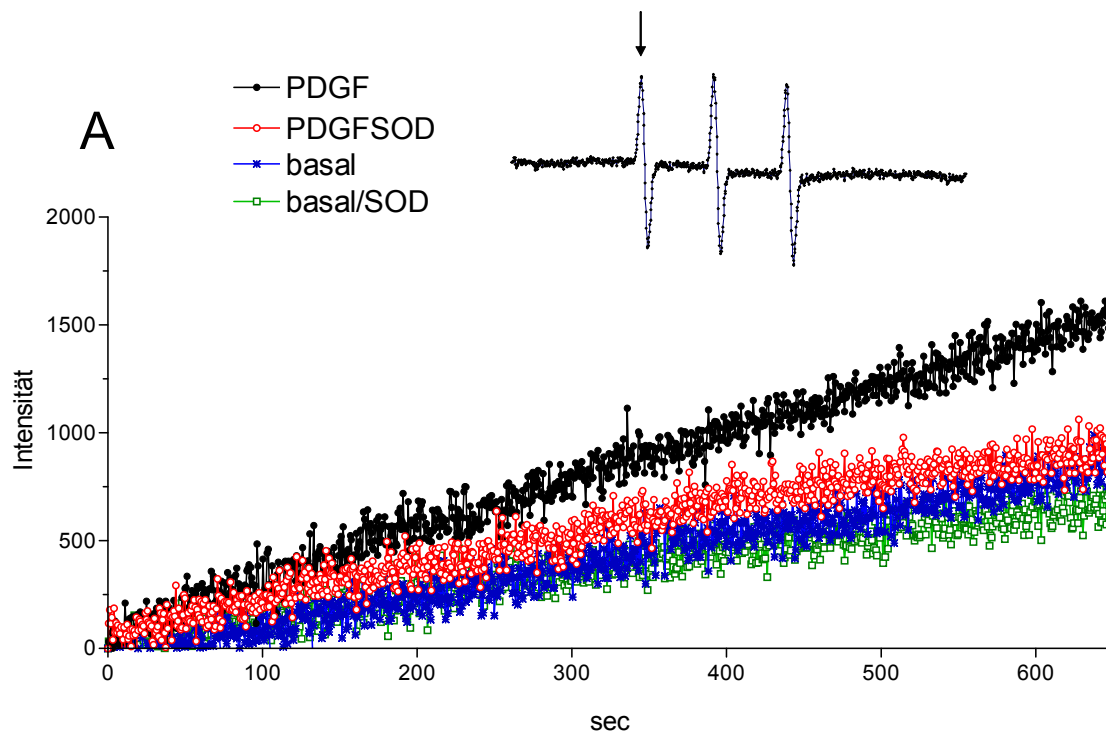
Die physiologischen Aktivatoren der membranständigen NADPH-Oxidase Ang II (Abbildung 26) und PDGF (Abbildung 25) zeigten einen Anstieg der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion um das 2,0-fache. Die Superoxidproduktion konnte dabei durch Zugabe von PEG-SOD (50 U/ml) signifikant geblockt werden. PEG-SOD alleine reduzierte die basale Superoxidproduktion um 8 %.



**Abbildung 24: Superoxid-Messungen mit ESR-Spintrapping. DMNQ produziert durch intrazelluläres Redoxcycling  $\cdot\text{O}_2^-$  (CMH = 2 mM).**

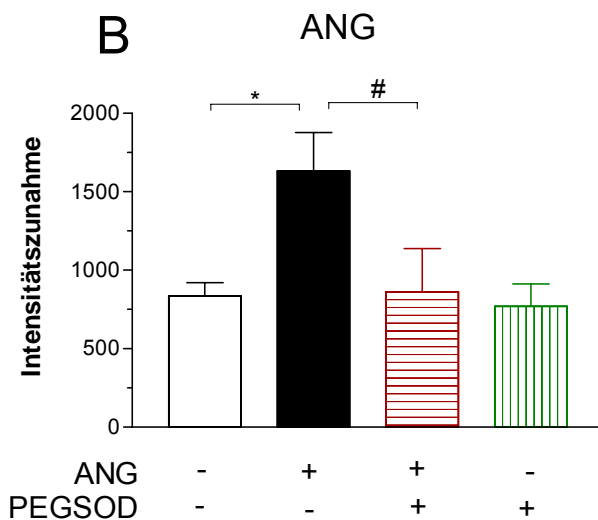
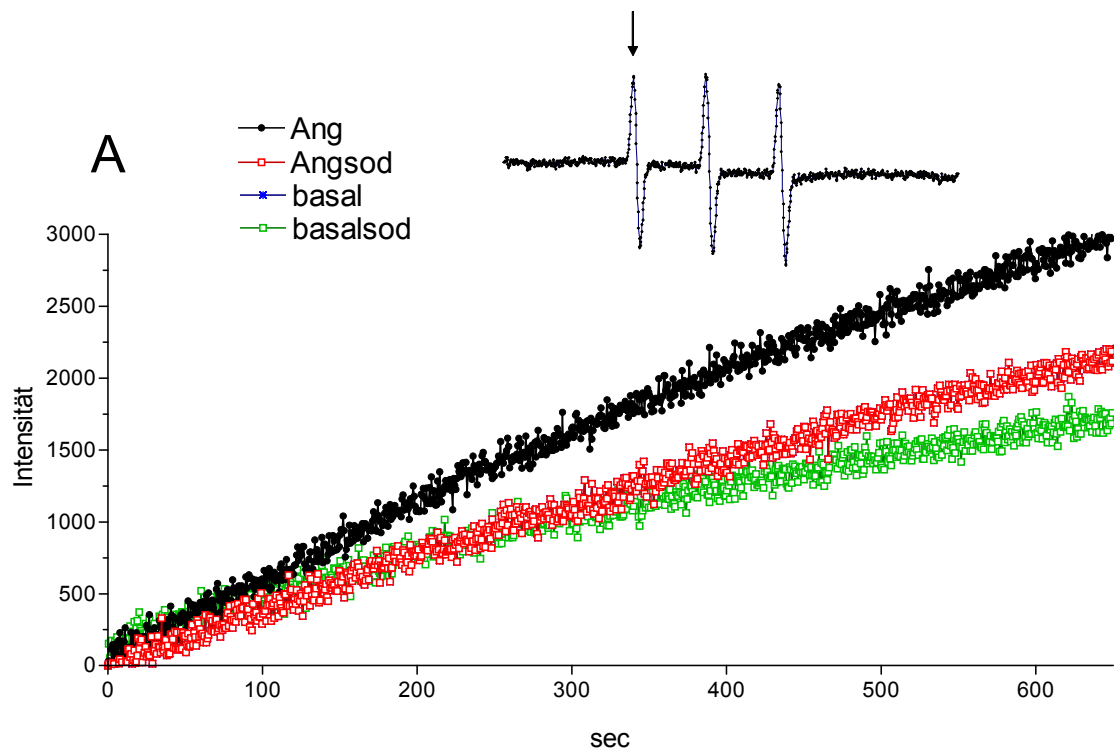
Dargestellt ist eine exemplarische Messung eines  $\text{CM}^\bullet$ -Triplets (A) und die zeitabhängige Intensitätsveränderung des  $\text{CM}^\bullet$ -Tiefeld-Signals einer Versuchsreihe (B). Gezeigt wird eine statistische Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Versuchsreihen ( $n > 3$ ): \*\*\* $p < 0,001$ ; ### $p < 0,001$  mit Bonferroni-Korrektur.





**Abbildung 25: ESR-Spintrapping von  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ; PDGF aktiviert membranständige NADPH-Oxidasen.**

Dargestellt ist eine exemplarische Messung eines  $\text{CM}^{\bullet}$ -Triplets (A) und die zeitabhängige Intensitätsveränderung des  $\text{CM}^{\bullet}$ -Tiefeld-Signals einer Versuchsreihe (B). Dargestellt ist eine statistische Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Versuchsreihen ( $n > 3$ ):  
 \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  mit Bonferroni-Korrektur.

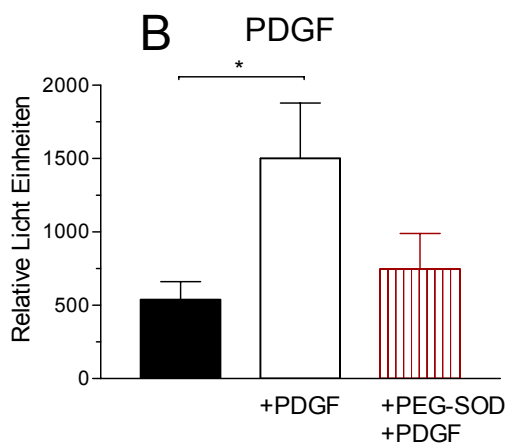
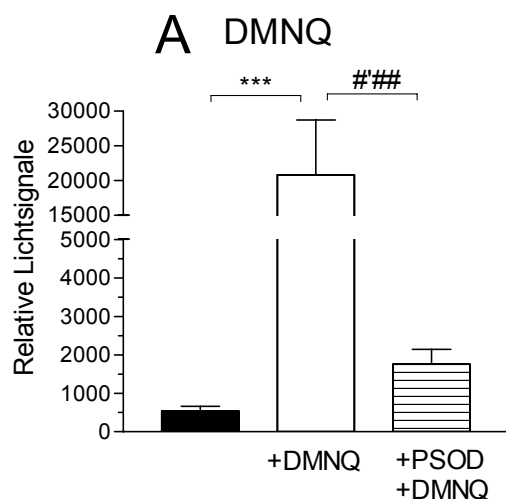


**Abbildung 26: Superoxid-Messungen mit ESR-Spintrapping; Ang II aktiviert membranständige NADPH-Oxidasen.**

Dargestellt ist eine exemplarische Messung eines  $CM^{\bullet}$ -Tripletts (A) und die zeitabhängige Intensitätsveränderung des  $CM^{\bullet}$ -Tiefeld-Signals einer Versuchsreihe (B). Dargestellt ist eine statistische Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Versuchsreihen ( $n > 3$ ):  
 \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  mit Bonferroni-Korrektur.

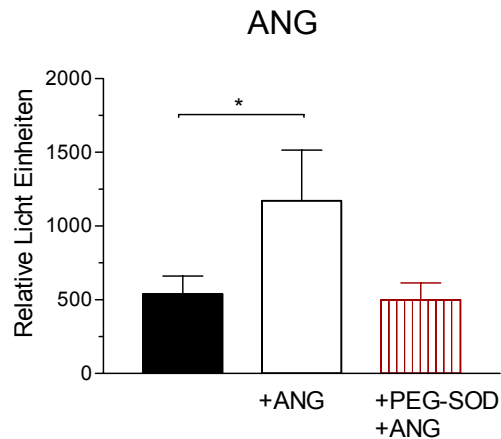
## 2.3 $\text{O}_2^-$ -Nachweis in glatten Gefäßmuskelzellen mit Lucigenin

Um die mit ESR-Spintrapping erhaltenen Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen, wurde die Lucigenin-abhängige Chemilumineszenz (CL) zur Bestimmung von  $\text{O}_2^-$  eingesetzt. Mit dieser Methode zeigte sich bei Zugabe von DMNQ (10  $\mu\text{M}$ ) in VSMC ein ca. 40-facher Anstieg der Superoxidproduktion gegenüber der basalen  $\text{O}_2^-$ -Produktion (Abbildung 27 A). Dieser Anstieg konnte durch Zugabe von 100 U/ml PEG-SOD fast komplett gehemmt werden. Auch die physiologischen Aktivatoren der NADPH-Oxidase induzierten einen signifikanten Anstieg der  $\text{O}_2^-$ -Produktion (Abbildung 27 B). PDGF (50 ng/ml) und Ang II (100 nM) steigerten die  $\text{O}_2^-$ -Produktion um das 2,8 bzw. 2,2-fache. Auch hier zeigte sich, dass  $\text{O}_2^-$  durch Zugabe von PEG-SOD (50 U/ml) abgefangen werden konnte. Die Lucigenin-abhängige CL als unabhängige Methode zur Detektion von Superoxid in-vivo führte also zu qualitativ ähnlichen Ergebnissen wie die ESR-Spintrapping-Methode mit CMH.



**Abbildung 27: Lucigenin-abhängige Chemilumineszenz-Messung**

(A) Produktion von  $\text{O}_2^-$  durch intrazelluläres Redoxcycling: DMNQ = 10  $\mu\text{M}$ ; PEG-SOD = 100 U/ml. (B) PDGF (50 ng/ml, 5 min) und Ang II (100 nM, 30 min) steigerten die  $\text{O}_2^-$ -Produktion um das 2,8-bzw. 2,2-fache. Gezeigt wird eine statistische Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten ( $n > 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM). \*\*\* $p < 0,001$ ; ### $p < 0,001$  mit Bonferroni-Korrektur; \* $p < 0,05$  mit ungepaartem Student's t-Test.



### 3 Hemmung der sGC-Aktivität durch $\cdot\text{O}_2^-$ in-vivo

#### 3.1 Nachweis der sGC-Hemmung durch $\cdot\text{O}_2^-$ in VSMC (cGMP-EIA)

Um nachzuweisen, dass die in-vitro mit isoliertem Enzym und Gewebehomogenaten beobachtete Hemmung der sGC auch in-vivo in intakten Zellen durch erhöhte intrazelluläre  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion erfolgt, wurde die YC-1-induzierte cGMP-Bildung in intakten VSMC unter Kontrollbedingungen und unter erhöhtem oxidativem Stress mit einem Enzym-Immuno-Assay (EIA) bestimmt. Die VSMC wurden zur Blockierung der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen mit IBMX (0,5 mM) für 20 min vorinkubiert. Zur Stimulation der endogenen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion wurden die Zellen mit DMNQ (10  $\mu\text{M}$ ) oder PDGF (50 ng/ml) für 2 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Inkubation mit YC-1 gestartet und für 8 min durchgeführt. Die weitere Verarbeitung der Zellen zur Bestimmung von cGMP erfolgte dann wie in II2.11 angegeben. Zur Auswertung wurde eine cGMP-Eichkurve erstellt (Abbildung 28). In Abbildung 29 A wird gezeigt, dass die YC-1-stimulierte Aktivität der sGC (100  $\mu\text{M}$  = 100 %) durch DMNQ (10  $\mu\text{M}$ ) um 79 % gesenkt wurde. Durch PDGF wurde der cGMP-Spiegel um 23,4 % gesenkt (Abbildung 29 B). Bei Zugabe von PEG-SOD wurde der cGMP-Spiegel wieder bis auf das 2-fache der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität erhöht. Diese Versuche zeigen, dass eine erhöhte Superoxidbildung in intakten Zellen die sGC-Aktivität direkt beeinflussen kann, d.h. unabhängig vom Abfangen des  $\cdot\text{NO}$ .

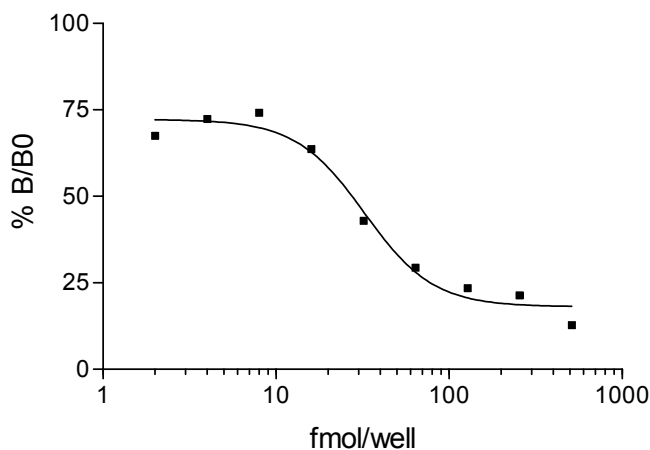
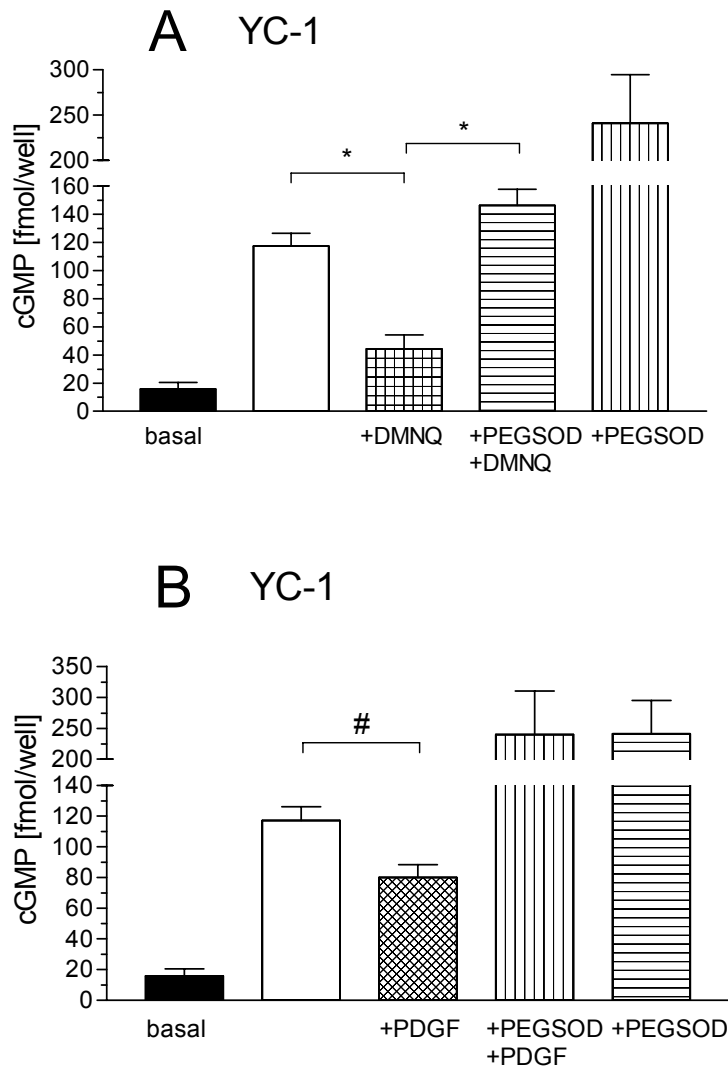


Abbildung 28: Exemplarische cGMP-Eichkurve. KWK mit cGMP-Standards.

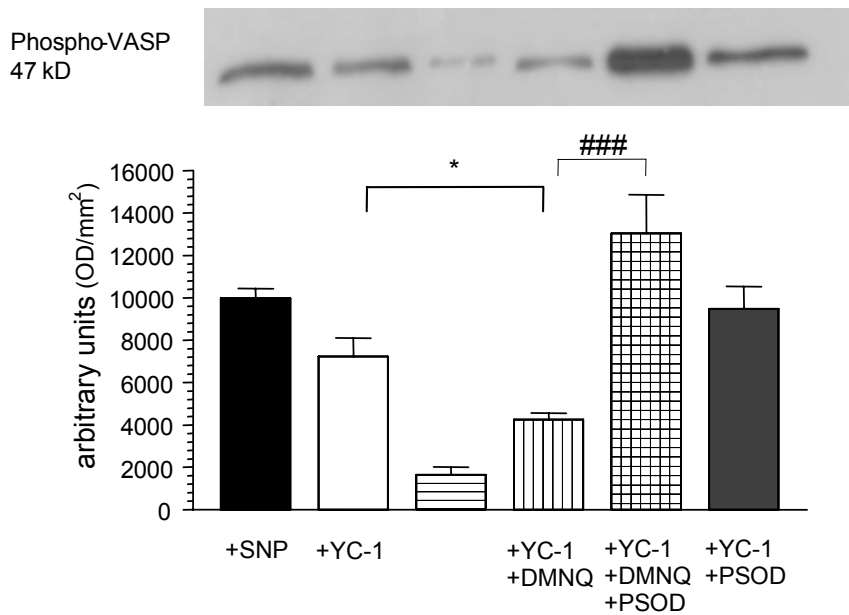


**Abbildung 29: Einfluss von DMNQ und PDGF auf den cGMP-Gehalt in VSMC in Anwesenheit von YC-1 (100  $\mu$ M) und SOD.**

Die Produktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  erfolgte einerseits (A) durch intrazelluläres Redoxcycling mit DMNQ (10  $\mu$ M), andererseits (B) durch Aktivierung der NADPH-Oxidasen durch PDGF (50 ng/ml). Die Vorinkubation mit PEG-SOD (A: 100 U/ml; B: 50 U/ml) verhinderte die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Die Werte sind als Mittelwerte von Doppelbestimmungen dargestellt. Gezeigt wird eine statistische Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten ( $n > 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM); \* $p < 0,05$  mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.01$  mit ungepaartem Student's t-Test.

### 3.2 Nachweis der sGC-Hemmung durch $\text{O}_2^-$ in Rattenaortenringen (VASP)

Die Hemmung der sGC-Aktivität durch eine erhöhte Superoxidbildung in isolierten Rattenaorten sollte mittels Bestimmung der cGMP-abhängigen Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein) nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung am Ser239 von VASP (P-VASP) eignet sich als spezifischer Biomarker für die Aktivierung des  $\text{NO}$ /cGMP-Signaltransduktionswegs (siehe auch I3). Dazu wurde die sGC in endothelfreien Rattenaortenringen, die zusätzlich zur Hemmung von  $\text{NO}$ -Synthasen mit dem NOS-Inhibitor  $\text{N}^{\text{O}}$ -Nitro-L-Arginin (L-NAG; 30  $\mu\text{M}$ ) inkubiert wurden, mit YC-1 (100  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Ringe homogenisiert und anschließend die VASP-Phosphorylierung im Homogenat mittels Western-Blot bestimmt (II2.4.2 und II2.6). P-VASP wurde im Westernblot als eine immunogene Bande bei 47 kDa nachgewiesen. YC-1 induzierte einen signifikanten Anstieg des P-VASP gegenüber den unbehandelten Kontrollringen (Abbildung 30). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von DMNQ (10  $\mu\text{M}$ ) wurde die YC-1-stimulierte VASP-Phosphorylierung signifikant gesenkt. Diese Hemmung konnte durch Vorinkubation mit PEG-SOD (100 mU/ml) vollständig aufgehoben werden. Die quantitative Analyse der Densitogramme der Western-Blots ergab eine Reduktion von 44,4 % des YC-1-stimulierten P-VASP bei Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  DMNQ im Vergleich zu YC-1 allein. Damit konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Superoxid-Bildung auch eine Hemmung der sGC in intakten Gefäßringen, unabhängig von einem Abfangen des  $\text{NO}$ , bewirkt.



**Abbildung 30: Die Produktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch intrazelluläres Redoxcycling (DMNQ, 10  $\mu\text{M}$ ) reduzierte die YC-1- (100  $\mu\text{M}$ ) stimulierte VASP-Phosphorylierung in isolierten Rattenaorten.**

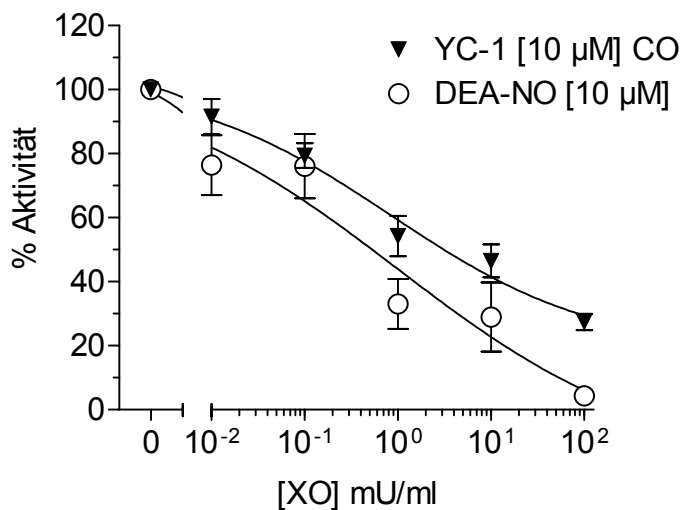
Die Vorinkubation mit PEG-SOD (100 U/ml) verhinderte die Hemmung der VASP-Phosphorylierung. Abgebildet ist ein exemplarischer Blot. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit Scion Image (II.2.12) aus 3 unabhängigen Experimenten; \* $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$  mit Bonferroni-Korrektur.

#### 4 Einfluss des „Umwelt- $\cdot\text{NO}$ “ auf die sGC-Hemmung durch $\cdot\text{O}_2^-$

Um den Einfluss von „Umwelt- $\cdot\text{NO}$ “ für die sGC-Aktivitätshemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  aufzuklären, wurde der Einfluss einer CO-gesättigten Atmosphäre auf die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Hemmung der sGC in-vitro untersucht. Die sättigende CO-Begasung (ca. 1 mM) sollte den Einfluss an Umwelt- $\cdot\text{NO}$  durch Verdrängung minimieren. In Abbildung 31 sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der  $\cdot\text{O}_2^-$ -induzierten Hemmung der  $\cdot\text{NO}$ - und YC-1/CO- aktivierten sGC-Aktivität dargestellt. Wie in der Einleitung beschrieben, ist CO ein schwacher Aktivator der sGC, dessen Wirkung allerdings durch Zugabe von YC-1 potenziert wird (siehe auch I2.2.2). So konnte auch in diesen Versuchen mit CO eine schwache 1,3-fache, in Gegenwart von YC-1 eine 10-fache und in Gegenwart von YC-1/CO eine 28-fache Stimulation der basalen sGC-Aktivität gemessen werden (Daten nicht abgebildet). Für die Hemmung der YC-1/CO- (10  $\mu\text{M}$ /1 mM) stimulier-

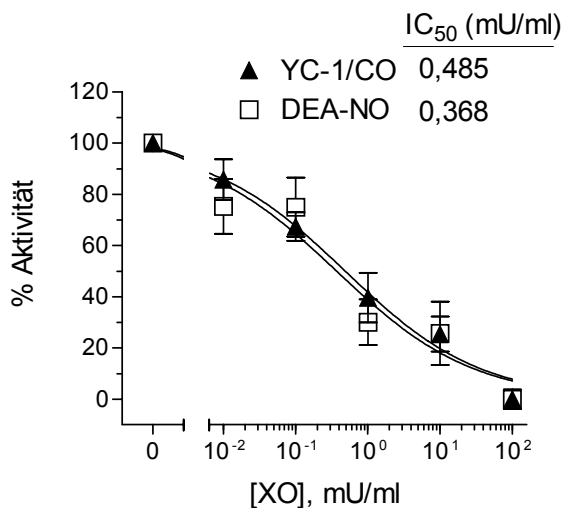
## Ergebnisse

ten sGC-Aktivität durch XO ergab sich eine  $IC_{50}$  von 0,485 mU/ml. Zum Vergleich wurde der Einfluss des Superoxid-generierenden Systems XO/HX auf die  $\cdot NO$ -stimulierte sGC-Aktivität bestimmt. Dazu wurde der  $\cdot NO$ -Donor DEA-NONOate (10  $\mu M$ ) eingesetzt, der die sGC um das 91-fache der basalen Aktivität stimulierte. Diese Aktivierung wurde bei einer XO-Konzentration von 0,368 mU/ml halbmaximal gehemmt. Nach Normalisierung der KWK auf Maximal- und Minimalwerte fielen die Hemmkurven für YC-1/CO und  $\cdot NO$ -induzierte sGC-Aktivität übereinander (Abbildung 32).



**Abbildung 31: KWK der Superoxid-induzierten Hemmung der YC-1/CO- (10  $\mu M$ )/(1 mM) und der DEA-NO- (10  $\mu M$ ) stimulierten sGC-Aktivität.**

Die Hemmung der sGC-Aktivität erfolgte mit XO (0 - 100 mU/ml)/HX (0,2 mM). Gezeigt wird eine statistische Auswertung von 4 unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die Kurvenanpassung erfolgte nach einer nichtlinearen sigmoidalen Regression mit variablen Hill-Koeffizienten.



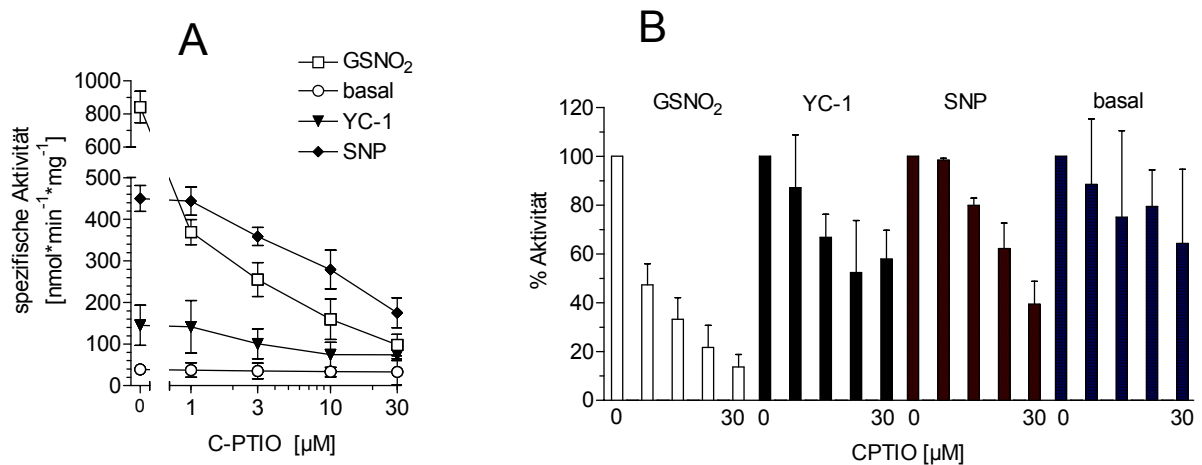
**Abbildung 32: Berechnung der  $IC_{50}$  aus Abbildung 31**

Darstellung der KWK nach Transformation auf Maximal- und Minimalwerte und anschließender Kurvenanpassung nach einer nichtlinearen sigmoidalen Regression mit variablen Hill-Koeffizienten. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant.



## Ergebnisse

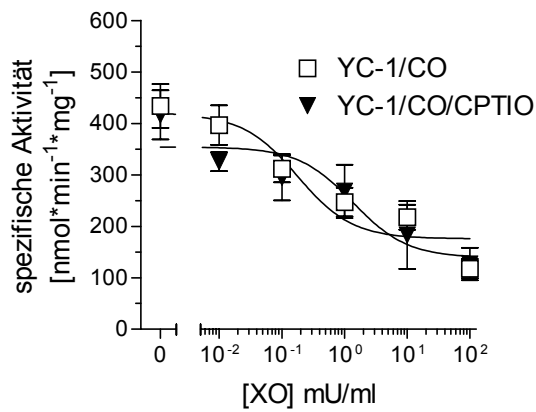
In einem weiteren Versuch sollte die mögliche Interferenz durch das „Umwelt- $\cdot\text{NO}$ “ mit dem  $\cdot\text{NO}$ -Fänger 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-imidazolin-1-oxyl-3-oxid (C-PTIO) verhindert werden. Ein Vorversuch zeigte, dass durch C-PTIO (30  $\mu\text{M}$ ) die Aktivität der YC-1-stimulierten sGC um 49 %, die Aktivität der mit dem  $\cdot\text{NO}$ -Donor GSNO<sub>2</sub>- (10  $\mu\text{M}$ ) stimulierten sGC um 88,4 %, die SNP- (10  $\mu\text{M}$ ) stimulierte sGC-Aktivität um 61 % und die basale Aktivität um 14,1 % (Abbildung 33 A, B) reduziert wurde.



**Abbildung 33: KWK mit C-PTIO bei basaler, YC-1- (10  $\mu\text{M}$ ), SNP- (10  $\mu\text{M}$ ), GSNO<sub>2</sub>- (10  $\mu\text{M}$ ) stimulierter sGC-Aktivität. Gereinigte sGC wurde 5 min mit Carboxy-PTIO (0/1/3/10/30  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert.**

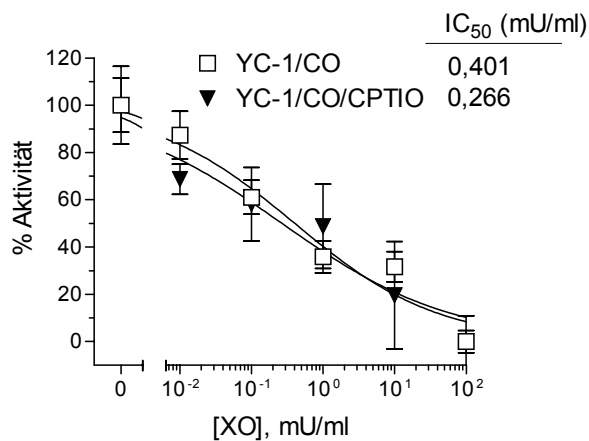
Pro Probe wurden ca. 5-15 ng gereinigte sGC eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von 3 unabhängigen Experimenten ( $n=3$  pro Bedingung, Mittelwert  $\pm$  SEM). (A) KWK unter Angabe der spezifischen Aktivität. (B) Darstellung der auf Maximalwerte (100 %) transformierten Daten aus (A).

Im nachfolgenden Experiment wurde der Einfluss des Superoxid-generierenden Systems XO/HX auf die YC-1/CO- stimulierte sGC-Aktivität in An- und Abwesenheit von Carboxy-PTIO (10  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Carboxy-PTIO hatte keinen signifikanten Einfluss auf die KWK der  $\cdot\text{O}_2^-$ -induzierten sGC-Hemmung (Abbildung 34 und Abbildung 35).



**Abbildung 34: KWK nach Vorinkubation mit C-PTIO (10  $\mu\text{M}$ ).**

Pro Probe wurden ca. 5-15 ng gereinigte sGC eingesetzt. Die Proben wurden 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert: YC-1 =  $10 \mu\text{M}$ ; CO-Sättigung =  $1 \text{ mM}$ ; XO = 0/ 0,01/ 0,1/ 1/ 10/ 100 mU/ml; HX =  $0,2 \text{ mM}$ . Gezeigt wird eine statistische Auswertung aus 4 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die Kurvenangleichung erfolgte nach nichtlinearer sigmoidaler Regression.



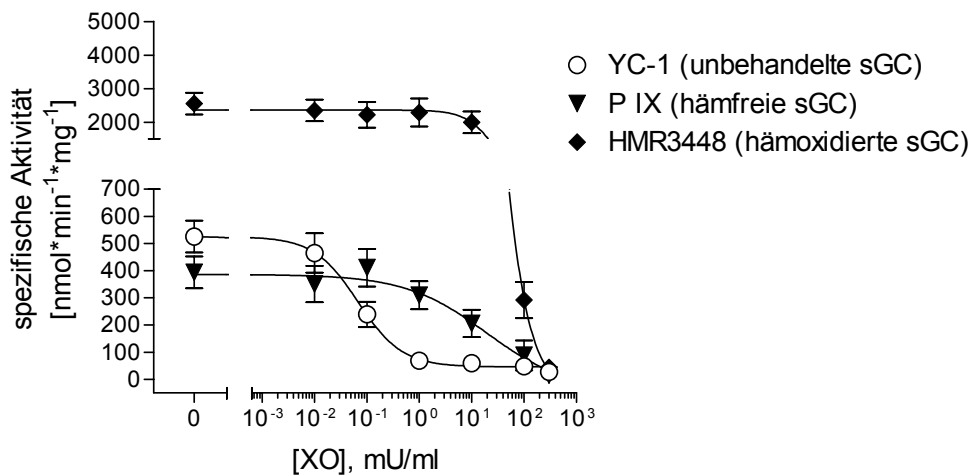
**Abbildung 35: Berechnung der  $\text{IC}_{50}$  aus Abbildung 34:**

Normalisierung auf Maximal- und Minimalwerte und Kurvenanpassung nach nichtlinearer sigmoidaler Regression mit variablen Hill-Koeffizienten. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant.

### 5 Mechanismus der sGC-Inhibition durch Superoxid

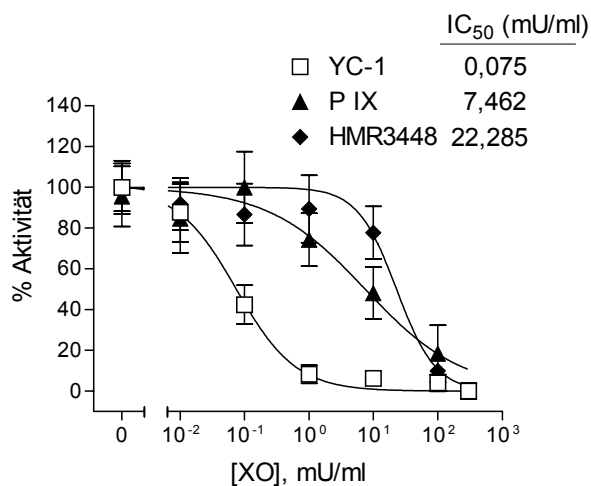
#### 5.1 Einfluss des Häms der sGC auf die Hemmung durch Superoxid

Zur Aufklärung der Funktion des Häms und dessen Oxidationszustand bei der Hemmung der sGC-Aktivität durch Superoxid wurde zum einen das Häm-Eisen der sGC spezifisch mit NS2028, dem Inhibitor der  $\text{NO}$ -sensitiven sGC, oxidiert, zum anderen wurde das Häm-Eisen mit Tween 20 (1 %) entfernt (siehe auch II2.5.4). Danach wurde der Einfluss von Superoxid auf die mit HMR3448-stimulierte Häm-oxidierte sGC bzw. die mit PIX-stimulierte Häm-freie sGC untersucht. Die Inkubation mit Tween 20 ergab eine Reduktion der YC-1-stimulierten sGC um 91,7 %, die Oxidation mit NS2028 eine Reduktion der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität um 82,5 %. Die basale Aktivität der Häm-freien sGC war nicht nachweisbar, wohingegen die hämoxidierte sGC ca. 50 % der basalen Aktivität der nativen gereinigten sGC aufwies (Daten nicht dargestellt). Durch PIX (1  $\mu\text{M}$ ) wurde das Häm-freie Enzym maximal auf ca.  $400 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  aktiviert, während das Häm-oxidierte Enzym durch HMR3448 (30  $\mu\text{M}$ ) maximal auf ca.  $2500 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  stimuliert werden konnte (Abbildung 36). Im Vergleich zur YC-1-stimulierten sGC wurden sowohl die Häm-freie als auch die Häm-oxidierte sGC erst bei viel höheren Konzentrationen von XO gehemmt. Die  $\text{IC}_{50}$  für die PIX-stimulierte sGC war ca. 100-fach und für die HMR3448-stimulierte sGC ca. 300-fach höher als die  $\text{IC}_{50}$  für YC-1-stimulierte sGC (Abbildung 37). Dies bedeutet, dass sowohl die Häm-freie als auch die Häm-oxidierte sGC wesentlich insensitiver gegenüber einer Superoxid-Hemmung ist als die  $\text{NO/CO}$ - und YC-1-sensitive sGC mit zweiwertigem Häm-Eisen.



**Abbildung 36: KWK mit XO/HX der Häm-freien und der Häm-oxidierten sGC**

20 bis 30 ng gereinigte sGC pro Probe wurden entweder mit NS2028 (10  $\mu$ M, - $\blacklozenge$ -), Tween 20 (1 %, - $\blacktriangledown$ -) oder unbehandelt (- $\circ$ -) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Größenausschlusschromatographie (II2.5.4) wurden die Proben 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Die KWK wurde erstellt mit XO= 0/ 0,01/ 0,1/ 1/ 10/ 100/ 300 mU/ml. Gezeigt wird eine statistische Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten ( $n > 3$  pro Bedingung, Mittelwert  $\pm$  SEM).



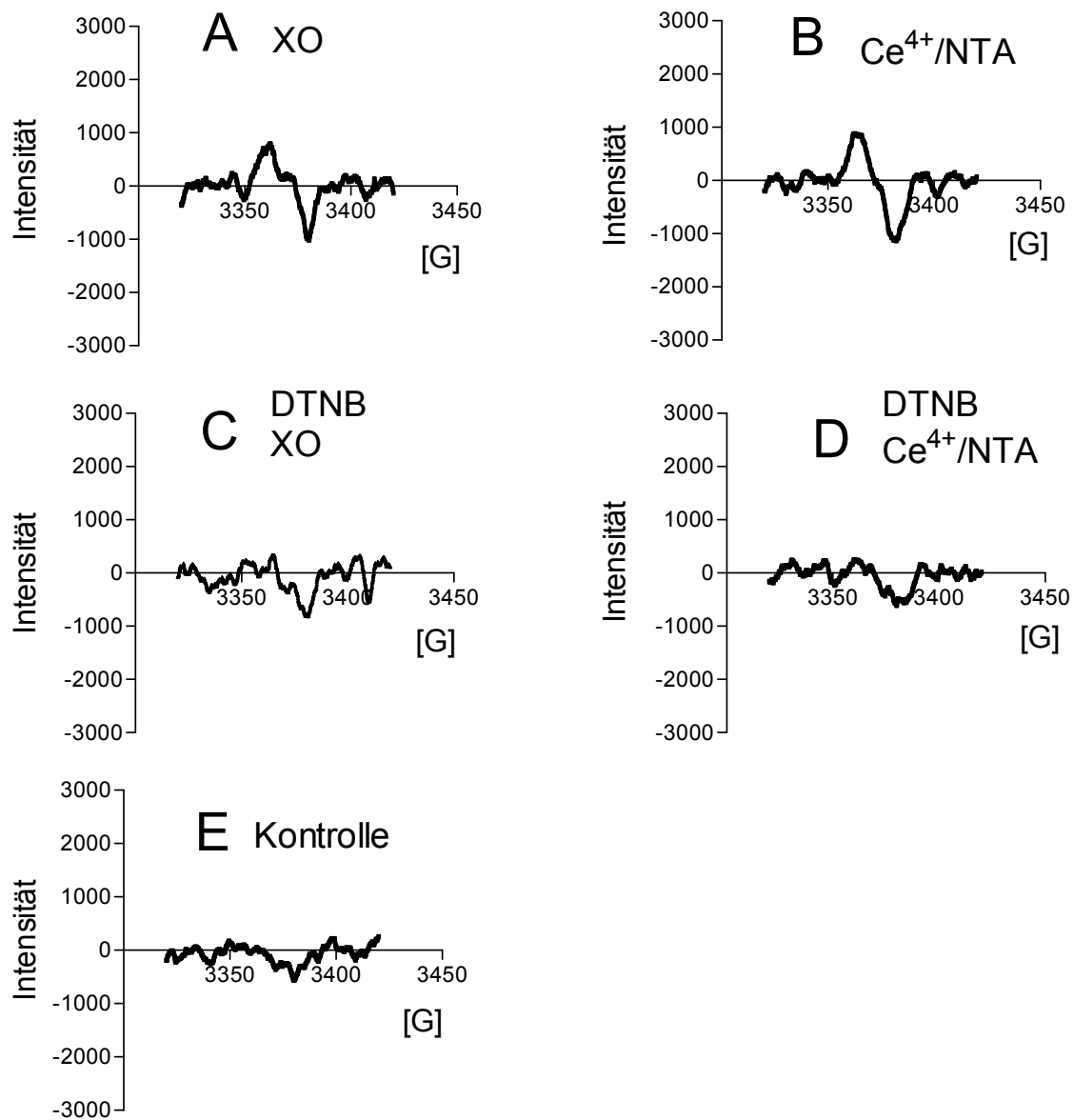
**Abbildung 37: Berechnung der  $IC_{50}$  aus Abbildung 36.**

Darstellung der KWK nach Transformation auf Maximal- und Minimalwerte und anschließender Kurvenanpassung nach einer nichtlinearen sigmoidalen Regression mit variablen Hill-Koeffizienten. Die Kurven der oxidierten HMR3448-stimulierten und hämfreien PIX-stimulierten sGC-Aktivität unterschieden sich signifikant von der Aktivität der unbehandelten YC-1-stimulierten sGC.

### **6 Bedeutung der Modifikation von sGC-Cysteinen für die Hemmung der sGC durch $\cdot\text{O}_2^-$**

#### **6.1 Messungen von Sulfinyl-Radikalen mit ESR**

Die Superoxid-induzierte Hemmung der sGC kann möglicherweise über eine Oxidation von Protein-Thiol-Gruppen erfolgen. Dabei sind sowohl die Bildung von Disulfid-Gruppen als auch die Bildung von Sulfoxiden (Sulfen-, Sulfin-, Sulfon-Säuren) möglich. Als Intermediat bei der Sulfinsäure-Bildung entsteht das Sulfinyl-Radikal. Damit besteht die Möglichkeit, diese Zwischenstufe der Protein-Thiol-Oxidation mittels ESR-Spektroskopie zu erfassen. Um zu prüfen, ob diese Oxidation durch das in diesen Untersuchungen eingesetzte Superoxid-generierende System (XO/HX) möglich ist, wurde die Bildung von Sulfinyl-Radikalen mit dem Modellprotein Hämoglobin untersucht. Als Vergleichssystem diente die 1-Elektronen-Oxidation durch  $\text{Ce}^{4+}$ -Ionen in Gegenwart von Nitrilotriessigsäure (NTA). Dazu wurde eine wässrige Lösung von Hämoglobin (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) entweder mit  $\text{Ce}^{4+}$  (2 mM)/NTA oder mit XO/HX (XO = 4 mU/ml; HX = 0,2 mM) bei Raumtemperatur inkubiert und nach 2 min in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren. Anschließend wurden die ESR-Spektren bei  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  aufgezeichnet (siehe auch II.2.10). Wie in Abbildung 38 A, B gezeigt, wurde unter beiden Bedingungen ein Protein-ständiges Radikal generiert, das charakteristische Eigenschaften eines Sulfinyl-Radikals mit g-Werten bei 2,02, 2,01 und 2,00 aufwies (Kolberg *et al.*, 2002). Durch Maskierung der freien Cystein-Thiol-Gruppen des Hämoglobins mit DTNB (4,5 mM, 10 min Vorinkubation auf Eis) wurde die Bildung des Cer- und Superoxid-induzierten ESR-Signals teilweise verhindert (Abbildung 38 C, D). In Abwesenheit von Cer-Ionen oder  $\cdot\text{O}_2^-$  zeigte Hämoglobin kein ESR-Signal im dargestellten Messbereich (Abbildung 38 E). Damit zeigt dieses Experiment, dass  $\cdot\text{O}_2^-$  prinzipiell Protein-Thiol-Gruppen zur Stufe des Sulfinyl-Radikals oxidieren kann.



**Abbildung 38:  $\cdot\text{O}_2^-$ -induzierte Sulfinyl-Radikal-Bildung am Hämoglobin.**

Die Bildung paramagnetischer Sulfinyl-Radikale durch Reaktion mit  $\text{Ce}^{4+}$  (2 mM)/NTA (A) oder mit XO (4 mU/ml)/HX (0,2 mM) (B) zeigten eine oxidative Modifikation von Protein-Thiolen. Die Blockierung der Thiolgruppen durch Vorinkubation mit DTNB verhinderte die Oxidation (C, D). Gezeigt wird eine repräsentative Messreihe aus mindestens 3 unabhängigen Messreihen ( $n > 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM).

### 6.2 Einfluss eines Austausches von Cystein $\alpha_1$ 238 und $\beta_1$ 541 gegen Serin auf die Hemmung der sGC durch $\cdot\text{O}_2^-$

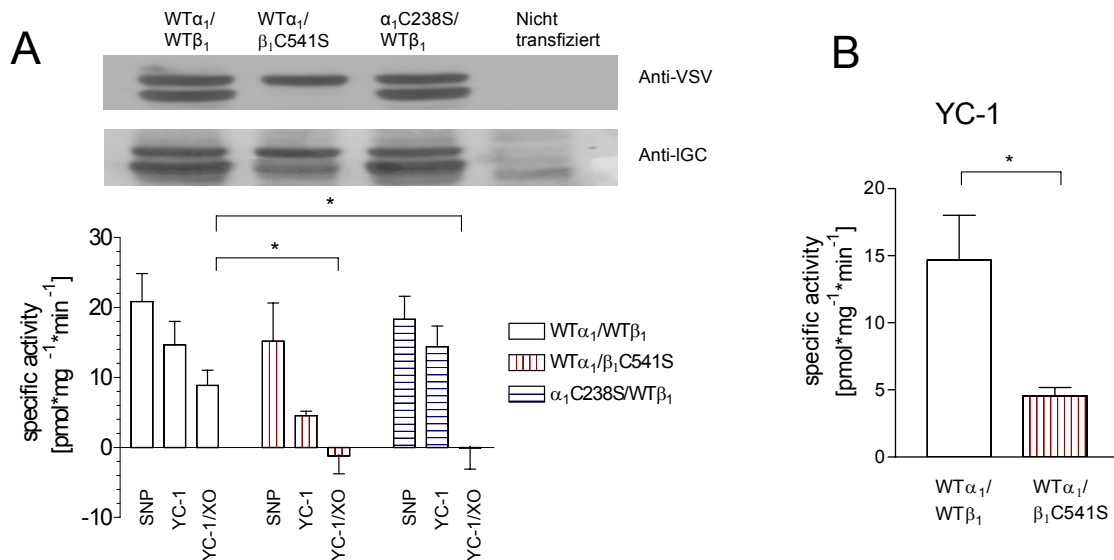
Um zu klären, welche Cystein-Reste bei der Hemmung der sGC-Aktivität involviert sind, wurden Mutanten der sGC-Untereinheiten  $\alpha_1$ C238S und  $\beta_1$ C541S mit der jeweiligen WT-Untereinheit als Heterodimer in COS1-Zellen kotransfiziert und exprimiert (II2.8). Die Mutante  $\alpha_1$ C238S und die Wildtyp-Untereinheiten trugen zusätzlich einen VSV-Taq (III.2 und 0). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen transfiziert und nach mechanischer Ablösung und Ultraschall-Lyse im hypotonen Homogenisierungspuffer die sGC-Aktivität bestimmt. Parallel wurden Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen transfiziert, lysiert und die Expression der  $\alpha_1$ C238S Mutante und der Wildtyp-Untereinheiten mittels Immunoblotting gegen den exprimierten VSV-Taq bestimmt. Zusätzlich wurden die Blots nach dem Strippen nochmals mit einem polyklonalen Anti-sGC $\alpha_1\beta_1$ -AK inkubiert. Wie in Abbildung 39 dargestellt, konnten die COS1-Zellen mit den Mutanten erfolgreich transfiziert werden. Dabei zeigten die Wildtyp-sGC und die mutierte  $\alpha_1$ C238S/WT $\beta_1$ -sGC beim Immunoblotting gegen den exprimierten VSV-Taq 2 Banden, die mutierte WT $\alpha_1/\beta_1$ C541S-sGC dagegen nur eine WT $\alpha_1$  Bande, da die  $\beta_1$ C541S-Untereinheit nicht mit dem VSV-Taq markiert war (0). Das Immunoblotting mit dem Anti-sGC $\alpha_1\beta_1$ -AK offenbarte die erfolgreiche Transfektion von WT $\alpha_1$ /WT $\beta_1$ -, WT $\alpha_1/\beta_1$ C541S- und  $\alpha_1$ C238S/WT $\beta_1$ -sGC. Die schwachen Banden bei den nicht transfizierten COS1-Zellen wiesen auf eine schwache Expression der endogenen WT-sGC hin (unterer Blot).

Die Stimulation der sGC-Aktivität der Homogenate der transfizierten und nicht transfizierten COS1-Zellen erfolgte mit YC-1 und SNP. Zusätzlich wurde die YC-1-stimulierte sGC-Aktivität durch das  $\cdot\text{O}_2^-$ -generierende System XO (3 mU/ml)/HX (0,2 mM) gehemmt. Die nicht transfizierten COS1-Zellen zeigten auch sGC-Aktivität, die etwa 1/3 der sGC-Aktivität in den transfizierten Zellen betrug.

In der Abbildung 39 wurde diese endogene sGC-Aktivität von der Aktivität der transfizierten Zellen subtrahiert, um ausschließlich die Aktivität der transfizierten sGC darzustellen. Die Stimulation der sGC mit SNP war bei den sGC-Mutanten nicht signifikant unterschiedlich zur Wildtyp-sGC. Eine signifikant geringere Aktivierung um 69 % zeigte die YC-1-stimulierte sGC-Mutante WT $\alpha_1/\beta_1$ C541S im Vergleich zur WT-sGC (Abbildung 39 B).

## Ergebnisse

Aus der Abbildung 39 A geht hervor, dass die Aktivität der YC-1-stimulierten Wildtyp-sGC und der mutierten sGC  $\alpha_1$ C238S/WT $\beta_1$  und WT $\alpha_1$ / $\beta_1$ C541S durch  $\cdot\text{O}_2^-$  unterschiedlich gehemmt werden. Die transfizierte WT $\alpha_1$ /WT $\beta_1$ -sGC wurde um 62 %, die  $\alpha_1$ C238S/WT $\beta_1$ -sGC um 93,7 % und die WT $\alpha_1$ / $\beta_1$ C541S-sGC um 90,2 % gehemmt. Beide sGC Mutanten wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Hemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  auf.



**Abbildung 39: (A) Transfektion von WT $\alpha_1$ /WT $\beta_1$ , WT $\alpha_1$ / $\beta_1$ C541S und  $\alpha_1$ C238S/WT $\beta_1$  sGC in COS1-Zellen und Bestimmung der sGC-Aktivitäten der Homogenate.**

Pro Probe wurden ca. 20 - 80  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37  $^{\circ}\text{C}$  für 15 min (SNP = 100  $\mu\text{M}$ , YC-1 = 100  $\mu\text{M}$ , XO = 3 mU/ml). Die endogene sGC-Aktivität der nicht transfizierten COS1-Zellen wurde von den sGC-Aktivitäten der transfizierten COS1-Zellen abgezogen. Gezeigt wird eine statistische Auswertung aus 4 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte  $\pm$  SEM), die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

\* $p < 0,05$  mit Dunnett-Korrektur. Die Blots sind Beispiele einer repräsentativen Transfektion.

(B) Signifikant unterschiedliche Aktivierung durch YC-1. \* $p < 0,05$  mit ungepaartem Student's t-Test.



### 6.3 Rolle von Kupfer bei der Superoxid-induzierten Hemmung der sGC

Die Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  könnte durch Katalyse von Kupfer-Ionen vermittelt sein. So fanden Gerzer und Kollegen, dass die sGC in stöchiometrischen Mengen Kupfer-Ionen enthält (Gerzer *et al.*, 1981). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass sich die sGC durch Zugabe von Kupfer-Ionen hemmen ließ (Schrammel *et al.*, 1996b). Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollten daher klären, ob die  $\cdot\text{O}_2^-$ -induzierte Inhibition der sGC-Aktivität durch Katalyse von Kupfer-Ionen vermittelt wird.

Da das Glutathion (GSH) Kupfer-Ionen cheliiert (Schrammel *et al.*, 1996b), wurde bei der Bestimmung der sGC-Aktivität Dithiothreitol (DTT, 3 mM) statt GSH als Schutz-Thiol eingesetzt. In Abbildung 40 betrug die basale sGC-Aktivität mit DTT  $9,48 \pm 2,8$  nmol \* mg<sup>-1</sup> \* min<sup>-1</sup> und war damit um 86,3 % niedriger als die basale Aktivität mit GSH. Die YC-1-stimulierte sGC zeigte mit DTT im Vergleich zu GSH ebenfalls eine geringere Aktivität (DTT:  $89,4 \pm 14,9$  vs. GSH:  $684,2 \pm 83,1$  nmol \* mg<sup>-1</sup> \* min<sup>-1</sup>).

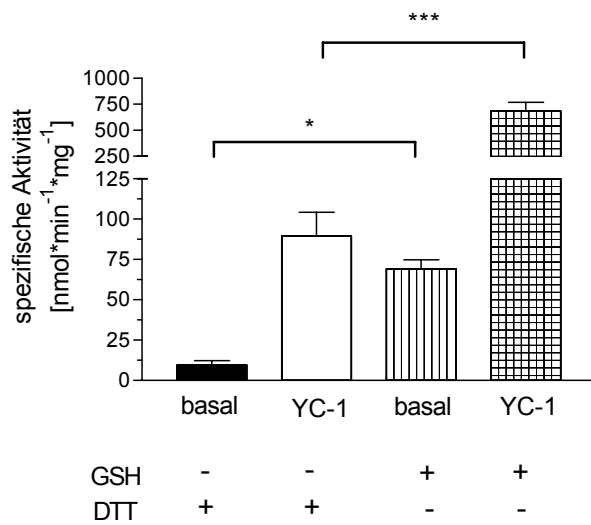
Die Zugabe von CuSO<sub>4</sub> (3 μM) verringerte signifikant die YC-1-stimulierte sGC-Aktivität mit DTT um 59,3 % auf  $36,4$  nmol \* mg<sup>-1</sup> \* min<sup>-1</sup> (Abbildung 41). Durch Neocuproin (50 μM), einem Cu<sup>+</sup>-spezifischen Chelator, wurde die CuSO<sub>4</sub>-induzierte Hemmung signifikant aufgehoben. Dagegen zeigte Cuprizone, ein Cu<sup>2+</sup>-spezifischer Chelator, keine Auswirkungen (Daten nicht gezeigt) auf die CuSO<sub>4</sub>-vermittelte Hemmung der sGC-Aktivität. Um zu klären, ob die sGC-Präparation endogene Kupfer-Ionen enthält, die die Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  katalysieren, wurde untersucht, ob eine Maskierung dieser Kupferionen mit Neocuproin die Sensitivität der sGC gegenüber Superoxid beeinflussen kann. Neocuproin beeinflusste nicht die basale sGC-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die Hemmung der sGC-Aktivität mit XO (0,1 mU/ml)/HX (0,2 mM) wurde dagegen durch Neocuproin leicht verstärkt (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 42 stellt die KWK der sGC-Aktivität mit XO/HX plus DTT (3 mM) dar. Verglichen wurde die Abnahme der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität nach Vorinkubation mit CuSO<sub>4</sub> (1 μM) und einer Kontroll-KWK ohne CuSO<sub>4</sub>-Vorinkubation. Es zeigte sich, dass die Vorinkubation mit CuSO<sub>4</sub> die sGC-Aktivität um 38,8 % hemmte. XO verringerte zusätzlich die Cu<sup>+</sup>-gehemmte sGC-Aktivität, führte allerdings im Vergleich zur Kontrolle bei 0,1 und 1 mU/ml zu keiner stärkeren Aktivitätshemmung.

Insgesamt wurde die sGC-Aktivität nach CuSO<sub>4</sub>-Vorinkubation nur maximal um 34,3 % durch  $\cdot\text{O}_2^-$  gehemmt, die KWK der Kontrolle zeigte hingegen einen maximalen Hemmeffekt durch  $\cdot\text{O}_2^-$  von 64,4 %. Die Normalisierung auf Maximal- und Minimalwerte und die lineare

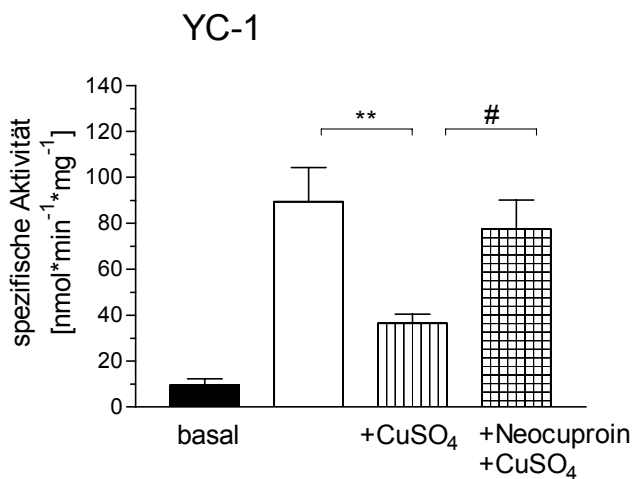
## Ergebnisse

sigmoidale Regression mit variablem Hill-Koeffizienten ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 43).



**Abbildung 40: Basale und YC-1-stimulierte sGC-Aktivität mit DTT und GSH.**

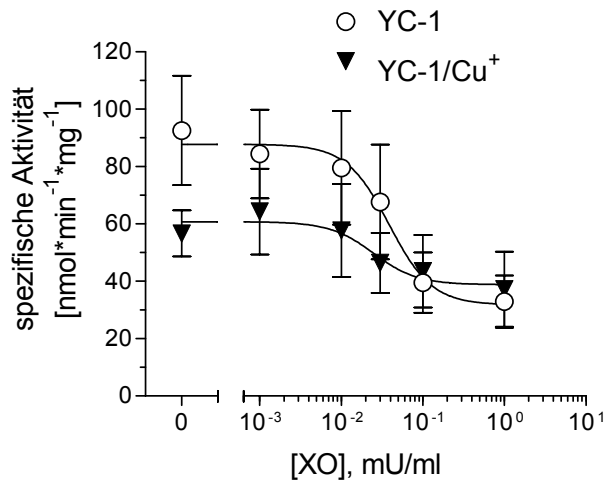
Pro Probe wurden ca. 15 - 20 ng gereinigte sGC eingesetzt. Die Proben wurden 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. (GSH = 3 mM, DTT = 3 mM, YC-1 = 100 µM). Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte ± SEM aus 4 bis 5 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 mit Newmans-Keul-Korrektur.



**Abbildung 41: Hemmung der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität durch CuSO<sub>4</sub> (3 µM).**

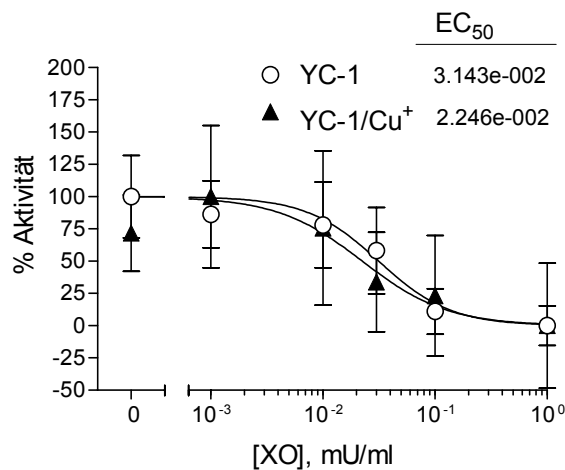
Die Hemmung konnte durch den Cu<sup>+</sup>-spezifischen Chelator Neocuproin aufgehoben werden. Bei der Bestimmung der sGC-Aktivität wurde DTT (3 mM) als niedermolekulares Thiol eingesetzt. YC-1 = 100 µM, CuSO<sub>4</sub> = 3 µM, Neocuproin = 50 µM. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte ± SEM aus 5 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. \*\*p<0,01, #p<0,05 mit Bonferroni-Korrektur.

## Ergebnisse



**Abbildung 42: KWK der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität mit XO/HX nach Vorinkubation mit  $\text{CuSO}_4$  ( $1 \mu\text{M}$ ).**

Pro Probe wurden ca. 15 - 20 ng gereinigte sGC eingesetzt. Die Proben wurden 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Bei der Bestimmung der sGC-Aktivität wurde DTT ( $3 \text{mM}$ ) als Thiol eingesetzt. YC-1 =  $100 \mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4 = 1 \mu\text{M}$ , XO = 0,001/ 0,01/0,03/0,1/1  $\text{mU/ml}$ . Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. Die Kurvenanpassung erfolgte nach nichtlinearer sigmoidaler Regression mit variablen Hill-Koeffizienten.



**Abbildung 43: Berechnung der  $\text{IC}_{50}$  aus Abbildung 42:**

Normalisierung auf Minimal- und Maximalwerte und nachfolgende nichtlineare sigmoidale Regression mit variablen Hill-Koeffizienten. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant.

### IV Diskussion

Bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen, die mit einer endothelialen und/oder glattmuskulären Dysfunktion einhergehen, und die auf einer Störung des L-Arginin/<sup>•</sup>NO/cGMP-Signaltransduktionswegs beruhen, wurde als kausaler pathogener Mechanismus eine erhöhte vaskuläre Superoxid-Bildung nachgewiesen (Rueckschloss *et al.*, 2003b; Warnholtz *et al.*, 1999b; Cai und Harrison, 2000). Als Superoxidquellen in vaskulärem Gewebe wurden Xanthinoxidase, entkoppelte NO-Synthasen, membranständige NADPH-Oxidasen, bestimmte Cytochrom-P450-Isoenzyme und Mitochondrien identifiziert (Wolin, 2000; Ohara *et al.*, 1993b). Dabei besteht weitgehender Konsens, dass <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> den <sup>•</sup>NO/cGMP-Signaltransduktionsweg durch Wegfangen des <sup>•</sup>NO (Reduzierung der <sup>•</sup>NO-Bioverfügbarkeit) und gleichzeitiger Bildung des reaktiven Peroxynitrits (ONOO<sup>-</sup>) stört. Peroxynitrit hemmt die Funktion verschiedener Proteine, die für die vaskuläre Homöostase wichtig sind, wie z.B. die Prostacyklinsynthase (PGS) (Zou *et al.*, 1997).

Weniger beachtet wurde bisher die Möglichkeit, dass <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> auch direkt die sGC hemmen kann (Cherry *et al.*, 1990a). Damit könnte dem Superoxid eine weit größere biologische Bedeutung zukommen als bisher angenommen: als Signaltransduktionsmolekül mit der sGC als definiertem Rezeptor und Effektor. Voraussetzung dafür wäre eine spezifische und schnell-reversible Modulation der sGC-Aktivität. In dieser Arbeit wurde deshalb die direkte <sup>•</sup>NO-unabhängige Hemmung der sGC-Aktivität durch <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene untersucht. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Klärung des Inhibitions-Mechanismus.

#### **1 Hemmung der sGC-Aktivität durch <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> in vitro**

Die direkte Hemmung der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität durch <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> wurde mit gereinigter sGC untersucht. <sup>•</sup>NO als Aktivator der sGC eignete sich nicht für unsere Studien, weil <sup>•</sup>NO durch <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> direkt abgefangen wird, ONOO<sup>-</sup> bildet und damit bei einem Überschuss an <sup>•</sup>NO die sGC vor einer Hemmung durch <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> schützt. So benötigte die DEA-NONOate-stimulierte sGC-Aktivität eine im Vergleich zur basalen sGC-Aktivität wesentlich höhere Superoxidbildung zur halbmaximalen Aktivitätshemmung (IC<sub>50</sub>(DEA-NO) = 0,37 vs.

## Diskussion

---

$IC_{50\text{basal}} = 0,0031 \text{ mU/ml}$ ). Zur Aktivierung der sGC wurde deshalb YC-1 eingesetzt, ein  $\text{NO}$ -unabhängiger Aktivator der sGC (Mülsch *et al.*, 1997; Friebe *et al.*, 1996). In meinen Untersuchungen aktivierte YC-1 (100  $\mu\text{M}$ ) die gereinigte sGC ca. 10-fach. Als  $\text{O}_2^-$ -generierendes System wurde die Xanthinoxidase (XO) ausgewählt, die Hypoxanthin (HX) zu Xanthin und anschließend zu Harnsäure oxidiert und dabei  $\text{O}_2^-$  (gleichzeitig aber auch Wasserstoffperoxid) freisetzt. Diese Methode erlaubte eine steuerbare und kontinuierliche  $\text{O}_2^-$ -Produktion. Mit zunehmender Menge an XO konnte eine Inhibierung sowohl der basalen als auch der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 16). Die signifikant unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werte weisen auf eine unterschiedliche Sensitivität der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität gegenüber einer Hemmung durch  $\text{O}_2^-$  hin, die basale sGC-Aktivität war 7-mal sensitiver als die YC-1-stimulierte sGC-Aktivität (Abbildung 18). Dieser Unterschied war nicht darauf zurückzuführen, dass YC-1  $\text{O}_2^-$  abfängt (Wang *et al.*, 2002). So konnte auch in dieser Arbeit mit der  $\text{O}_2^-$ -sensitiven Cytochrom-c-Reduktion (siehe II.2.9.3) nachgewiesen werden, dass YC-1 die Superoxid-Produktion durch XO/HX nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden die basale und die YC-1-stimulierte sGC-Aktivität durch XO/HX in signifikant unterschiedlichem Ausmaß maximal um 67,7 % bzw. 85 % gehemmt. Diese Beobachtung deutet auf einen unterschiedlichen Wirkungsgrad der  $\text{O}_2^-$ -Hemmung hin (Abbildung 17).

Die  $IC_{50}$ -Werte für die Hemmung der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität durch  $\text{O}_2^-$  bei gereinigtem Enzym wurden experimentell ermittelt (Tabelle 15) und ergaben  $\text{O}_2^-$ -Bildungsraten im Bereich von  $\mu\text{M}/\text{min}$ .

### 1.1 Aufhebung der Hemmung durch SOD

Die Hemmung der basalen und der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität durch XO/HX konnte durch Prä-Inkubation mit SOD aufgehoben werden (Abbildung 19). Die Prä-Inkubation mit einem Überschuss an SOD führte nicht nur zu einer Aufhebung des Hemmeffekts, sondern zeigte darüber hinaus eine Aktivierung der basalen und YC-1-stimulierten Aktivität. Dieser zusätzliche Effekt scheint ein indirekter Aktivierungseffekt der SOD zu sein, weil eine Prä-Inkubation der SOD alleine eine bis zu 2-fache Aktivierung bewirkte. Es ist davon auszu-

gehen, dass bereits im Versuchsansatz bei der Bestimmung der sGC-Aktivität eine basale Superoxidbildung durch Autoxidation des zugesetzten Thiols (GSH oder DTT) erfolgte (Misra, 1974), die zu einer Hemmung der basalen sGC-Aktivität von ca. 50 % führte.

Durch SOD wird diese basale Hemmung aufgehoben, wodurch die scheinbare Aktivierung der sGC durch SOD zu erklären ist. Zusätzlich kann an dieser SOD-abhängigen sGC-Aktivierung auch das in Spuren (ppb-Bereich) vorkommende  $\cdot\text{NO}$  aus der Atmosphäre beitragen, wie Friebe und Kollegen (Friebe *et al.*, 1998b) nachweisen konnten. Dieser Aspekt wird noch später diskutiert.

### 1.2 Reversible Modifikation der sGC

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Hemmung der basalen und YC-1-stimulierten sGC durch Superoxid um einen reversiblen Inhibitionsmechanismus handelt, wurde ein Experiment, wie in Abbildung 20 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurde bei kontinuierlicher  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion (XO/HX) zur Bestimmung der sGC-Aktivität nach der Hälfte der Inkubationszeit (5 min) SOD hinzugefügt und die Reaktion nach weiteren 5 min gestoppt. Es zeigte sich, dass die  $\cdot\text{O}_2^-$ -induzierte Hemmung der basalen und der YC-1-stimulierten cGMP-Produktion nach Zugabe von SOD sofort aufgehoben wurde.

Dieser Befund macht deutlich, dass es sich bei der Hemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  um eine schnell-reversible Modifikation der sGC handelt.  $\cdot\text{O}_2^-$  kann daher im Sinne eines Signaltransduktionsmoleküls die Aktivität der sGC reversibel regulieren.

### 1.3 Einfluss von $\text{H}_2\text{O}_2$

Da das zur  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung eingesetzte System Xanthinoxidase/Hypoxanthin gleichzeitig auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bildet (Lynch und Fridovich, 1979), war es notwendig den direkten Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die sGC-Aktivität zu untersuchen. In meinen Versuchen zeigte die Zugabe von Wasserstoffperoxid (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) keinen signifikanten Einfluss auf die basale und YC-1-stimulierte sGC-Aktivität (Abbildung 21). Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls keinen direkten Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Aktivität der gereinigten sGC feststellen (Sabetkar *et al.*,

2001). Andererseits konnte eine schwache Aktivierung der sGC durch  $H_2O_2$  in Gegenwart von YC-1 in Gewebehomogenaten nachgewiesen werden (Sabetkar *et al.*, 2001).

Dieser Befund deutet auf eine zusätzliche Komponente in Gewebehomogenaten hin, die die Aktivierung der sGC durch  $H_2O_2$  ermöglicht. Nach Ansicht von Wolin und Kollegen könnte Katalase diese zusätzliche Komponente darstellen (Wolin und Burke, 1987).

### 1.4 Hemmung der löslichen Guanylatzyklase in Homogenaten

Um zu zeigen, dass die Superoxid-induzierte Hemmung der sGC-Aktivität auch in einem komplexeren System realisierbar ist, wurde der Einfluss des  $\cdot O_2^-$ -generierenden Systems XO/HX auf die YC-1-stimulierte Aktivität der sGC in Homogenaten aus kultivierten glatten Muskelzellen und isolierten Rattenaortenringen untersucht.

Wie in Abbildung 22 A dargestellt, konnte auch in Zellhomogenaten eine Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\cdot O_2^-$  nachgewiesen werden. Ebenso konnte die YC-1-stimulierte sGC-Aktivität in Homogenaten aus Rattenaortenringen durch XO/HX konzentrationsabhängig gehemmt werden (Abbildung 22 B). Allerdings wurde hier im Vergleich zur gereinigten sGC eine halbmaximale Hemmung erst bei einer 35-fach höheren XO-Konzentration beobachtet. Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied auf der Anwesenheit von endogener SOD in den Aortenhomogenaten beruhte, wurden die Aortenringe vor der Homogenisierung für 20 min mit Diethyldithiocarbamat (DETC, 1 mM) inkubiert. DETC ist ein Zellmembran-permeabler Inhibitor der CuZnSOD (Heikkila *et al.*, 1976). Die Ausschaltung der endogenen CuZnSOD führte zu einer signifikant potenteren Hemmung der YC-1-stimulierten sGC (ca. 30-fach) durch Xanthinoxidase/Hypoxanthin im Vergleich zu Homogenaten aus unbehandelten Kontrollorten (Abbildung 22 B).

Damit konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass die endogene SOD im Gewebe die sGC vor Inaktivierung durch Superoxid schützt. Dies deckt sich mit Berichten über eine ausgeprägte endotheliale und glattnuskuläre Dysfunktion in Mäusen mit deletierter CuZnSOD (Wambi-Kiesse und Katusic, 1999; Omar *et al.*, 1991; Laight *et al.*, 1998).

## 2 **Bestimmung der Superoxidproduktion in-vitro und in-vivo**

Der Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  in-vitro und vor allem in-vivo gestaltete sich äußerst schwierig und stellte eine besondere experimentelle Herausforderung dar. Das Superoxidanion-Radikal ist einer direkten Messung kaum zugänglich. Dies basiert einerseits auf der extremen Instabilität gegenüber Disproportionierung (Wolin, 2000; Beckman und Koppenol, 1996), die in einer chemischen Halbwertszeit von  $<1$  s resultiert, andererseits auf der sehr großen Reaktivität von  $\cdot\text{O}_2^-$  mit verschiedenen biologischen Reaktionspartnern, die die biologische Lebensdauer noch weiter verkürzen. Zur Spezifitätserhöhung wird SOD eingesetzt, das  $\cdot\text{O}_2^-$  zu Wasserstoffperoxid und Wasser umsetzt. Alle Nachweisreaktionen von  $\cdot\text{O}_2^-$  beruhen auf indirekten Messungen.

### 2.1 **In-vitro-Nachweis von $\cdot\text{O}_2^-$ (Cytochrom-c)**

Mit der photometrischen Bestimmung von Cytochrom-c (II2.9.3 und III2.1) wurde die Superoxid-Bildungsrate von Xanthinoxidase/Hypoxanthin ermittelt. Bei dieser Nachweisreaktion reduziert  $\cdot\text{O}_2^-$   $\text{Fe}^{3+}$ -Cytochrom-c zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Cytochrom-c. Diese Reduktion lässt sich durch eine spezifische Änderung des Absorptionsspektrums bei 550 nm spektrophotometrisch verfolgen. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes konnte aus den eingesetzten XO-Konzentrationen die Superoxid-Bildungsraten ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) ermittelt werden. Die Anwendung der doppelt-logarithmischen Regression und der polynomischen Regression 2. Ordnung aus den experimentellen Daten führte schließlich zur Bestimmung von teilweise extrapolierten  $\text{IC}_{50}$ -Werten der KWK aus den sGC-Aktivitätsbestimmungen (Tabelle 15). Die XO zeigt bei unterschiedlichen Konzentrationen ein verändertes Verhältnis der  $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion (Lynch und Fridovich, 1979). Zusätzlich beeinflusst auch die Änderung des pH-Werts dieses Produkt-Verhältnis (Udilova, 1999; Fridovich, 1970; Lynch und Fridovich, 1979). Die mit dieser Methode ermittelten  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildungsraten sind daher nur als Schätzwerte zu betrachten (Abbildung 23 und Tabelle 15).



### 2.2 In-vivo-Nachweis von $\cdot\text{O}_2^-$

#### 2.2.1 ESR-Spintrapping mit CMH

Da sich die Cytochrom-c-Methode nicht zur in-vivo-Detektion von  $\cdot\text{O}_2^-$  eignete, musste zu diesem Zweck ein alternatives Verfahren eingesetzt werden. Eine solche Methode ist die ESR-Detektion von stabilen Radikalen, die bei Reaktion von Superoxid mit Nichtradikalen (Radikalfängern) gebildet werden. Bei der hier angewendeten Methode reagiert  $\cdot\text{O}_2^-$  spezifisch mit CMH, einem Hydroxylamin, zu einem paramagnetischen  $\text{CM}^\bullet$ -Radikal, einem Nitroxid, das als stabiles Radikal mittels ESR-Spektroskopie detektiert wird. Das CMH ist chemisch verwandt mit CPH (Abbildung 11), soll aber aufgrund der veresterten Carboxyl-Funktion besser membrangängig sein. Das ESR-Spektrum des  $\text{CM}^\bullet$ -Radikals zeigt wegen der Kopplung des freien Elektrons mit dem N-Kern des Nitroxids eine Triplettaufspaltung. Die ESR-Signalintensität des  $\text{CM}^\bullet$ -Radikals steigt mit zunehmender Superoxid-Bildung. Da ein stabiles Radikal gebildet wird, kann die Superoxidbildungsrate über die Akkumulation des  $\text{CM}^\bullet$ -Radikals, d.h. Zunahme der ESR-Signalintensität, bestimmt werden (Hwang *et al.*, 2003; McNally *et al.*, 2003).

Zunächst wurde die Superoxidbildung in kultivierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta mittels Spintrapping bestimmt. Dazu wurden die Zellen in Quarzkapillaren mit dem Spintrap inkubiert und die Zunahme der Signalintensität einer der Triplettlinien über die Zeit kontinuierlich registriert (II.2.9.1). Das Verfahren war genügend sensitiv, um eine basale Superoxid-Bildung nachzuweisen (Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26). Um die Superoxid-Bildung zu steigern, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem synthetischen Redoxcyclus DMNQ (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. DMNQ ist ein Chinon-Derivat (Abbildung 44), das in der Zelle enzymatisch reduziert wird. Die reduzierte Form reagiert mit molekularem Sauerstoff unter Reoxidation zum Chinon und Freisetzung von  $\cdot\text{O}_2^-$ . DMNQ führte zu einem 4,7-fachen Anstieg der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion gegenüber der basalen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung.

DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon)

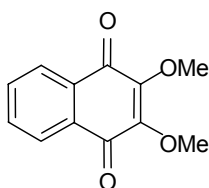


Abbildung 44: Strukturformel von DMNQ

## Diskussion

---

Die physiologischen Aktivatoren Ang II und PDGF induzierten einen 2-fachen Anstieg der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion, allerdings mit unterschiedlicher Kinetik. PDGF induzierte einen sofortigen Anstieg in der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion, Ang II induzierte erst nach einer Vorinkubation von mindestens 20 min eine maximale  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion. Die unterschiedliche Kinetik der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion von PDGF und Ang II ist mit den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen zu erklären. Nach der Bindung von Ang II oder PDGF an ihre jeweiligen Rezeptoren kommt es durch unterschiedliche Signalwege zur Zusammenführung der Untereinheiten der NADPH-Oxidase in der Zellmembran. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion nach Stimulierung durch Ang II ist biphasisch (Seshiah *et al.*, 2002). So konnten Seshiah und Kollegen bei der Aufklärung der Ang II-Stimulierung der vaskulären NADPH-Oxidase eine erste, wenige Sekunden andauernde, PKC-abhängige ROS-Produktion und nach 30 min eine zweite, länger andauernde ROS-Produktion nachweisen. Die zweite Phase der ROS-Produktion war abhängig von der Aktivierung des EGF-Rezeptors und der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Eine Messung der initialen Ang II-stimulierten  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion war mit der von mir angewendeten Messmethode des ESR-Spintrapping und der Lucigenin-abhängigen Chemilumineszenz (II2.9.1 und II2.9.2) nicht möglich. Stattdessen wurde die zweite Phase der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion erfasst. Die Aktivierung der vaskulären NADPH-Oxidase durch PDGF ist PKC-abhängig (Marumo *et al.*, 1997b). PDGF zeigte in dieser Arbeit mit ESR-Spintrapping und Lucigenin-abhängiger Chemilumineszenz schon nach wenigen Minuten eine lang anhaltende Aktivierung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion.

Der hier beobachtete ca. 2-fache Anstieg in der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung nach Stimulation der NADPH-Oxidasen in VSMC der Rattenaorta ist vergleichsweise moderat und deckt sich mit früheren Veröffentlichungen (Sorescu *et al.*, 2001). Die Stimulation der NADPH-Oxidasen der Leukozyten führt dagegen zu einer schnellen und massiven Freisetzung von  $\cdot\text{O}_2^-$ .

Mit CMH-Spintrapping lässt sich  $\cdot\text{O}_2^-$  sensitiv und spezifisch in VSMC nachweisen. Der intrazelluläre Redoxcyclus DMNQ und die endogenen Peptid-Liganden Ang II bzw. PDGF erhöhten die Superoxid-Bildung in glatten Muskelzellen.

### 2.2.2 *Lucigenin-abhängige Chemilumineszenz*

Zur Überprüfung der mittels ESR-Spintrapping erzielten Ergebnisse wurde die Lucigenin-abhängige Chemilumineszenz (CL) als eine unabhängige Methode eingesetzt. Die Nachweisreaktion beruht auf der Reaktion des Lucigenins mit  $\cdot\text{O}_2^-$  zu einem optisch angeregten Reaktionsprodukt (Vasquez-Vivar *et al.*, 1997) (II.2.9.2 und Abbildung 13). In einigen Publikationen wurde die Spezifität der Nachweisreaktion für Superoxid mit Lucigenin allerdings in Frage gestellt (Vasquez-Vivar *et al.*, 1997), weil Lucigenin zum Redoxcycling befähigt ist. Bei der Umwandlung des Lucigenins in ein reaktives Detektormolekül durch eine Ein-Elektronen-Reduktion kann es durch Redoxcycling zur Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  kommen. Andere Publikationen gehen aber davon aus, dass es bei einer Lucigenin-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nicht zum nachweisbaren Redoxcycling kommt (Skatchkov *et al.*, 1999). Daher wurde in dieser Arbeit eine Lucigenin-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Superoxid-Produktion in glatten Muskelzellen wurde mit dem Redoxcycler DMNQ oder mit den physiologischen Aktivatoren der membranständigen NADPH-Oxidase Ang II bzw. PDGF aktiviert (Griendling *et al.*, 1994; Marumo *et al.*, 1997a). Mit DMNQ wurde ein 38,6-facher Anstieg der basalen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion festgestellt (Abbildung 27 A), ein viel höherer Anstieg als beim ESR-Spintrapping mit CMH (ca. 5-fach). Die CL-Messung von Ang II und PDGF zeigten zur ESR-Messung vergleichbare Anstiege der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion (Abbildung 27 B). Der außerordentlich starke Anstieg der mit DMNQ ausgelösten CL könnte darauf beruhen, dass DMNQ mit dem Lucigenin ein direktes Redoxcycling eingeht und die artifizielle Superoxid-Bildung verstärkt. Andererseits wäre es auch möglich, dass DMNQ und NADPH-Oxidase Superoxid in unterschiedlichen Kompartimenten der inhomogenen Probe (Zellen, Medium) generieren, die für Lucigenin und CMH unterschiedlich zugänglich sind.

Es bleibt festzuhalten, dass auch mittels Lucigenin-induzierter CL eine erhöhte Superoxid-Produktion in VSMC durch AT II und PDGF nachweisbar ist.

### 3 *In-vivo-Hemmung der sGC durch $\cdot\text{O}_2^-$*

#### 3.1 **Bestimmung von cGMP in VSMC und Nachweis der sGC-Hemmung durch $\cdot\text{O}_2^-$**

Um nachzuweisen, dass eine erhöhte Superoxidbildung auch in intakten Zellen zu einer  $\cdot\text{NO}$ -unabhängigen Hemmung der sGC führt, wurde in kultivierten VSMC in Gegenwart von YC-1 die Superoxid-Bildung mit DMNQ oder PDGF stimuliert und die sGC-Aktivität indirekt über die Messung der zellulären cGMP-Konzentration (siehe cGMP-EIA, II2.11 und III3.1) bestimmt. Der durch YC-1-induzierte Anstieg des cGMP (7,4-fach gegenüber der basalen cGMP-Konzentration) wurde sowohl durch DMNQ als auch durch PDGF signifikant gehemmt (Abbildung 29 A, B). Sehr deutlich ist dieser Effekt mit DMNQ (10  $\mu\text{M}$ ) zu sehen, das die cGMP-Konzentration um 79 % verminderte. Auch die Zugabe von PDGF, das die Superoxid-Produktion in VSMC ca. 2-fach erhöhte, führte zu einer Absenkung der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität um ca. ein Viertel. Nach Vorinkubation (20 min) mit der Zellmembran-permeablen PEG-SOD wurde die durch DMNQ und PDGF-induzierte Abnahme der YC-1-induzierten cGMP-Bildung nicht nur vollständig verhindert, sondern gegenüber den unbehandelten Kontroll-Zellen sogar auf das Doppelte erhöht (Abbildung 29 A, B).

Dieser Befund lässt folgende Schlussfolgerungen zu: In den kultivierten VSMC muss die sGC unter einer konstitutiv direkten oder indirekten ("Umwelt- $\cdot\text{NO}$ ") Hemmung durch endogenes Superoxid stehen, anders ist nicht zu erklären, warum exogen zugesetzte SOD die cGMP-Spiegel erhöhen kann. Weiterhin scheint die endogene SOD-Aktivität nicht auszureichen, um eine partielle Hemmung der sGC durch basales oder durch PDGF-generiertes Superoxid zu verhindern. Erst durch Inkubation mit PEG-SOD, das exogen zugesetzt wurde, kommt es zur vollständigen Protektion der sGC und zur optimalen Produktion von cGMP.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt klar, dass in-vivo die sGC-Aktivität und die cGMP-Produktion durch  $\cdot\text{O}_2^-$  gehemmt werden.

### 3.2 Auswirkung der sGC-Hemmung durch $O_2^-$ auf die $^{\bullet}NO/cGMP$ -Signaltransduktion

Um zu überprüfen, ob die  $^{\bullet}O_2^-$ -induzierte Abnahme der cGMP-Konzentration in den VSMC tatsächlich zu einer Hemmung der cGMP-abhängigen Signaltransduktion führt, wurde die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK) in der Aorta thoracalis der Ratte mit einem indirekten Verfahren bestimmt. Dazu wurde mit einem spezifischen Antikörper die Phosphorylierung von VASP, eines ubiquitären Substrats der cGK, im Westernblot bestimmt. Die VASP-Phosphorylierung eignet sich als biochemischer Marker für den Aktivitätszustand des  $^{\bullet}NO/cGMP$ -Signaltransduktionssystems in vaskulärem Gewebe und Thrombozyten (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2002; Smolenski *et al.*, 1998; Mülsch *et al.*, 2001). Die Stimulation mit dem  $^{\bullet}NO$ -Donor SNP oder mit YC-1 führte zu einem starken Anstieg der VASP-Phosphorylierung (Abbildung 30). Dieser Anstieg wurde durch DMNQ signifikant um 44,4 % gehemmt. Diese Hemmung der VASP-Phosphorylierung durch DMNQ wurde durch PEG-SOD vollständig verhindert.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Befunden zur cGMP-Messung in VSMC (cGMP-EIA, siehe oben) und zeigen, dass die Hemmung der cGMP-Bildung durch  $^{\bullet}O_2^-$  tatsächlich zu einer verminderten Aktivität der cGK führt.

### 3.3 Biologische Bedeutung der $^{\bullet}O_2^-$ -induzierten Hemmung der sGC

Die durch biologische Signale modulierbare Produktion von  $^{\bullet}O_2^-$  durch die vaskuläre NADPH-Oxidase (Griendling *et al.*, 1994; Sorescu *et al.*, 2001; Warnholtz *et al.*, 1999b; Marumo *et al.*, 1997b) stellt eine wichtige Komponente der in dieser Arbeit postulierten Signaltransduktion durch  $^{\bullet}O_2^-$  dar. Die Stimulation der NADPH-Oxidase in VSMC führte zu einem ca. 2-fachen Anstieg der  $^{\bullet}O_2^-$ -Produktion, wie ich mittels ESR-Spintrapping mit CMH und Lucigenin-abhängiger Chemilumineszenz in Übereinstimmung mit Griendling und Kollegen zeigen konnte. Die Stimulation der  $^{\bullet}O_2^-$ -Bildung durch PDGF induzierte in meinen Untersuchungen eine Reduktion der cGMP-Produktion um ca. 25 %, die durch Gabe von Zellmembran-permeabler SOD nicht nur vollständig verhindert wurde, sondern sogar zu einem Anstieg der cGMP-Spiegel über das Ausgangsniveau hinaus führte. Aus den vorherigen

## Diskussion

---

Überlegungen (3.1) ergab sich, dass die aktuelle Aktivität der sGC im Gewebe von endogenem  $\cdot\text{NO}$  und  $\cdot\text{O}_2^-$  beeinflusst wird. In Abwesenheit von  $\cdot\text{NO}$  überwiegt der Einfluss von Superoxid, der zu einer Verminderung der basalen sGC-Aktivität führt. Der Aktivitätszustand der sGC könnte als Sensor des Redoxzustands der Zelle dienen. Bei einem ausgeglichenen zellulären Redoxzustand hat die sGC 100 % ihrer Aktivität. Kommt es zu einer Abweichung von diesem Redoxgleichgewicht zugunsten eines erhöhten oxidativen Stresses, also einem Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von  $\cdot\text{O}_2^-$ , nimmt die Aktivität der sGC ab. Überwiegen andererseits in der Zelle antioxidative Systeme (hohe Expression von SOD und GSH), führt das zu einer Aktivitätssteigerung der sGC und zu einer vermehrten Produktion von cGMP. So zeigte der Überschuss zellpermeabler PEG-SOD eine Aktivitätssteigerung um 100 %. Eine erhöhte Menge an SOD in der Zelle sollte somit zu einer erhöhten sGC-Aktivität führen. Tatsächlich konnten DeRubertis et al. zeigen, dass transgene Mäuse mit erhöhter CuZnSOD eine erhöhte renale cGMP-Exkretion haben (DeRubertis *et al.*, 2004). Ebenso konnte die Gruppe von Wolin zeigen, dass durch Hemmung der CuZnSOD mit DETC die cGMP-Konzentration in isolierten pulmonaren Arterien signifikant abnahm (Cherry *et al.*, 1990b). Diesen Befund konnte ich in kultivierten VSMC bestätigen (nicht gezeigt). Auch zeigte sich eine eingeschränkte endothelabhängige Relaxation mit DETC-vorinkubierten Koronararterien (Omar *et al.*, 1991)

Die Regulation von Enzymen durch  $\cdot\text{O}_2^-$  beschränkt sich nicht nur auf die sGC. Andere Enzymsysteme werden ebenfalls durch  $\cdot\text{O}_2^-$  reguliert. In Tabelle 16 sind Enzymsysteme aufgeführt, die sensitiv auf  $\cdot\text{O}_2^-$  reagieren.

**Tabelle 16: Zusammenstellung von Enzymsystemen, die von  $\cdot\text{O}_2^-$  direkt reguliert werden**

Enzym	Mechanismus	Referenz
Calcineurin	Interaktion mit dem $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Zn}^{\text{II}}$ -binukleären Cluster des Calcineurins	Namgaladze <i>et al.</i> , 2002
Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP 1B)	reversible Sulfoxidation von Thiolen der PTP 1B	Barrett <i>et al.</i> , 1999
Proteinkinase C (PKC)	Stimulation der autonomen PKC-Aktivität über Thiol-Oxidationen und Freisetzung von Zink	Knapp und Klann, 2000; Knapp und Klann, 2002

### 3.4 Bedeutung von Umwelt- $\cdot\text{NO}$ für die SOD-induzierte Aktivierung der sGC

Es wurde von Friebe und Koesling (Friebe *et al.*, 1998b) postuliert, dass die sGC-Aktivitätssteigerung nach Zugabe von SOD darauf beruht, dass durch Wegfangen von basalem Superoxid im Versuchsansatz zur Bestimmung der sGC-Aktivität die Konzentration von „Umwelt- $\cdot\text{NO}$ “, das die sGC konstitutiv aktiviert, erhöht wird. Die Konzentration an Umwelt- $\cdot\text{NO}$  in der Atmosphäre beträgt 1 – 5 ppb (Friebe *et al.*, 1998b). Die Konzentration von „Umwelt- $\cdot\text{NO}$ “ in der Inkubationslösung lässt sich nach dem Henry-Dalton-Gesetz berechnen und liegt im subnanomolaren Bereich.

Um zu überprüfen, welchen Anteil das Umwelt- $\cdot\text{NO}$  an der basalen sGC-Aktivität hat, wurde Carboxy-PTIO, ein  $\cdot\text{NO}$ -Scavenger, dem Versuchsansatz zur Bestimmung der sGC-Aktivität zugesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde die basale Aktivität der sGC zwar tendenziell um ca. 30 %, wegen der großen Streuung jedoch nicht signifikant vermindert (Abbildung 33 A, B). Hingegen war mit 10 - 30  $\mu\text{M}$  Carboxy-PTIO eine deutliche maximale Abnahme der YC-1-stimulierten sGC-Aktivität um ca. 40 % nachzuweisen. Erwartungsgemäß wurde die mit den  $\cdot\text{NO}$ -Donoren S-Nitro-Glutathion- ( $\text{GSNO}_2$ ) und SNP-stimulierte sGC-Aktivität wesentlich potenter gehemmt als die mit YC-1-stimulierte Aktivität, halbmaximal bei ca. 1  $\mu\text{M}$  ( $\text{GSNO}_2$ ) bzw. 20  $\mu\text{M}$  (SNP) (Abbildung 33 A, B). Unter der Voraussetzung, dass Carboxy-PTIO keine direkt hemmende Wirkung auf die sGC besitzt, zeigen diese Befunde, dass Umwelt  $\cdot\text{NO}$  maximal 40 % zur YC-1-stimulierten sGC-Aktivität beitragen kann. Insofern ist ein Beitrag des Umwelt- $\cdot\text{NO}$  zur SOD-induzierten Aktivierung der sGC nicht vollkommen auszuschließen.

Es wurde anschließend untersucht, ob Wegfangen des Umwelt- $\cdot\text{NO}$  mit Carboxy-PTIO die Hemmung der CO/YC-1-stimulierten sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass durch C-PTIO die KWK für die XO/HX-induzierte Hemmung der sGC nicht signifikant verändert wurde (Abbildung 34 und Abbildung 35). Die Hemmung der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  persistierte also auch nach Entfernung des Umwelt- $\cdot\text{NO}$ .

Diese Beobachtung macht ersichtlich, dass Umwelt- $\cdot\text{NO}$  nur eine untergeordnete Rolle bei der Hemmung der sGC durch Superoxid spielt.

### 4 Molekularer Mechanismus der sGC-Hemmung durch $\cdot\text{O}_2^-$

In den weiteren Untersuchungen sollte der molekulare Mechanismus der schnell-reversiblen Hemmung der sGC durch Superoxid auf Ebene der sGC aufgeklärt werden.

#### 4.1 Modifikation von sGC-Thiolen durch $\cdot\text{O}_2^-$

##### 4.1.1 Messung von Sulfinyl-Radikalen

Eine wahrscheinliche Interaktion von Superoxid mit Proteinen ist neben der Reaktion mit Protein-gebundenen Übergangsmetallen die oxidative Modifikation von Thiol-Gruppen in Cysteinresten und Bildung von Sulfoxiden aus Methionylresten. Die sequenzielle Oxidation von Cystein-Thiolen führt zu Disulfiden, Sulfensäuren, Sulfinensäuren und Sulfonsäuren (Abbildung 45). Von diesen Modifikationen sind nur die Disulfidbildung und die Sulfensäurebildung reversibel und kommen daher als potenzielle Modifikation der schnell-reversiblen Hemmung der sGC in Frage (siehe III1). Die Bildung von Sulfinyl-Radikalen ist ein Zwischenprodukt in der Oxidation vom Thiol-Gruppen (-SH) zur Sulfonsäure (-SO<sub>3</sub>H) und ist über eine direkte ESR-Messung detektierbar (Kolberg *et al.*, 2002). Damit weisen Sulfinyl-Radikale auf eine oxidative Modifikation von Protein-Thiolen hin.

Gemäß Thannickal führt die Oxidation von Sulfhydrylgruppen zur Bildung von Sulfensäuren. Diese Stufe der Sulfoxidation ist mit Glutathion unter intermediärer Bildung eines Disulfids reversibel. Die weitergehende Oxidation führt zu den nicht reversiblen Oxidationsstufen Sulfin- und Sulfonsäure (Thannickal und Fanburg, 2000). Für die Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP-1B) wurde eine reversible Sulfoxidation von Protein-Thiolen durch  $\cdot\text{O}_2^-$  beschrieben (Barrett *et al.*, 1999).  $\cdot\text{O}_2^-$  reguliert die Aktivität der Phosphatase durch Bildung eines Cystein-Sulfensäure-Derivats.

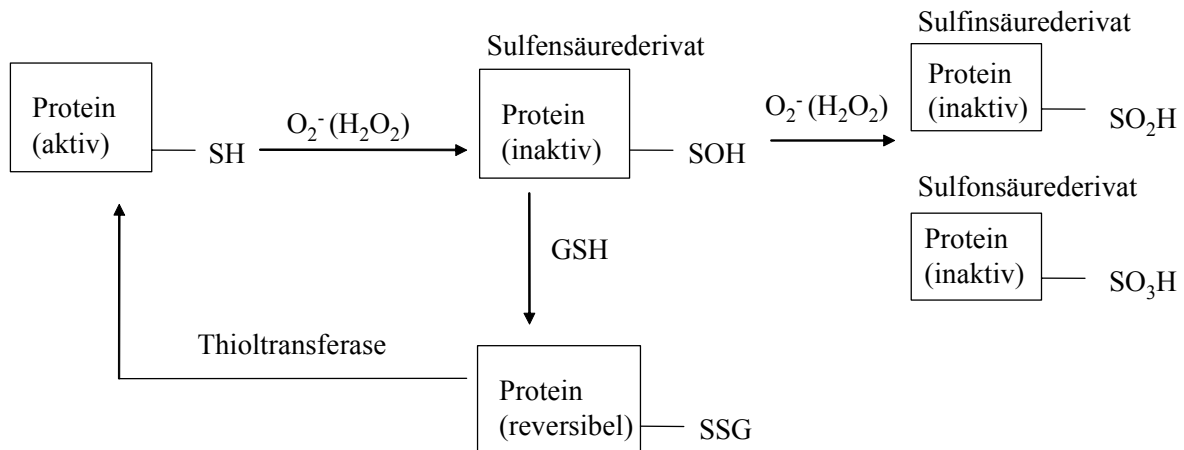
Die direkte ESR-Messung der Sulfinylradikale erfolgte mit Hämoglobin als Modellprotein nach der von Kolberg beschriebenen Methode (Kolberg *et al.*, 2002). Die Ein-Elektronen-Oxidation mit Cer/NTA und die Oxidation mit XO/HX (XO = 4 mU/ml) führten zu ähnlichen ESR Signalen (III6.1) und lassen somit die Aussage zu, dass  $\cdot\text{O}_2^-$  Thiol-Gruppen oxidiert. Die Oxidation von Thiolgruppen wurde in früheren Publikationen mit verschiedenen Techniken bestimmt. Dabei reichen die Angaben der Reaktionskonstanten von  $1,8 \cdot 10^5 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$



## Diskussion

(Dikalov *et al.*, 1996)  $200 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$  (Jones *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003) bis  $30 - 1000 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$  (Winterbourn und Metodiewa, 1999).

Diese Befunde lassen die Aussage zu, dass auch kritische Thiol-Gruppen der sGC durch Superoxid reversibel oxidiert werden könnten.



**Abbildung 45: Schema der oxidativen Modifikation von Proteinthiolen (Thannickal und Fanburg, 2000).**

### 4.1.2 Bedeutung von Cysteinen der sGC für die Hemmung durch $\cdot\text{O}_2^-$

Da Cysteine der sGC eine Angriffsstelle für oxidative Modifikationen (s.o.) darstellen, sollte untersucht werden, ob bestimmte Cysteine die Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  vermitteln. Dazu wurden Cysteine der sGC ausgesucht, die als potenzielle Interaktionspartner des  $\cdot\text{O}_2^-$  die Aktivität der sGC direkt beeinflussen.

Das Cystein 238 der  $\alpha_1$ -Untereinheit ( $\alpha_1\text{C238S}$ ) stellt eine potenzielle Bindungsstelle des YC-1 in der Hämbindungsdomäne der sGC dar. Durch Photoaffinitäts-Markierung konnten Stasch und Kollegen zeigen, dass Bay 41-2272 an diesem Cystein spezifisch bindet (Becker *et al.*, 2001b). Der Austausch dieses Cysteins gegen ein Serin führte zu einer neuen, noch nicht publizierten sGC-Mutante, die im Rahmen dieser Arbeit als möglicher Interaktionspartner für  $\cdot\text{O}_2^-$  untersucht wurde.

## Diskussion

---

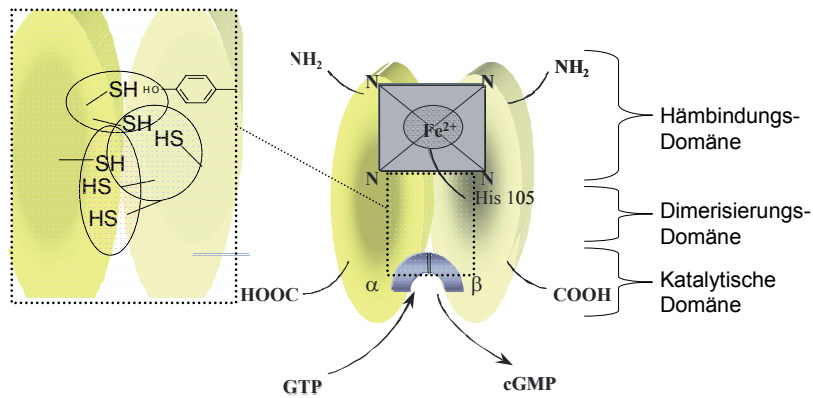
$\cdot\text{O}_2^-$  könnte auch am Cystein 541 der  $\beta_1$ -Untereinheit ( $\beta_1\text{C541S}$ ) die Aktivität der sGC regulieren. Dieses Cystein ist in der katalytischen Domäne der sGC lokalisiert und wesentlich am katalytischen Umsatz von GTP zu cGMP beteiligt (Sunahara *et al.*, 1998; Friebe *et al.*, 1999).

Beide Cysteine könnten durch  $\cdot\text{O}_2^-$  oxidativ modifiziert werden und damit eine lokale Änderung der Ladungsdichteverteilung bzw. räumlichen Struktur der sGC bewirken. Diese Veränderungen hätten eine wesentliche Veränderung der sGC-Aktivität zur Folge. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Cysteine durch Punktmutation mit Serin ausgetauscht. Die Plasmide dieser punktmultierten Untereinheiten wurden zusammen mit der jeweiligen Wildtyp-Untereinheit in COS1-Zellen kotransfiziert und nach der Expression der sGC-Mutanten in Aktivitätsstudien näher charakterisiert (siehe II.2.8 und III.6.2).

Das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung zeigte eine vergleichbare SNP-Aktivierung der Wildtyp-sGC und der beiden sGC-Mutanten. Die Aktivierung mit YC-1 hingegen wies auf einen signifikanten Unterschied zwischen  $\text{WT}\alpha_1/\text{WT}\beta_1$ -sGC und  $\text{WT}\alpha_1/\beta_1\text{C541S}$ -sGC hin. So betrug die Aktivität der YC-1-stimulierten  $\text{WT}\alpha_1/\beta_1\text{C541S}$ -sGC nur ca. 30 % der YC-1-stimulierten  $\text{WT}\alpha_1/\text{WT}\beta_1$ -sGC. Bei Friebe und Kollegen zeigte diese sGC-Mutante eine sehr geringe Aktivierung durch YC-1 und SNP (Friebe *et al.*, 1999). Die Hemmung der YC-1-stimulierten Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  führte bei der Wildtyp-sGC zu einer Reduktion der Aktivität um ca. 60 %. Dagegen zeigten beide sGC-Mutationen eine Hemmung der YC-1-stimulierten Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  um ca. 90 %. Dieser signifikante Unterschied in der Aktivitätshemmung macht deutlich, dass der Austausch des Cysteins 238 der  $\alpha_1$ -Untereinheit und 541 der  $\beta_1$ -Untereinheit zu einer Sensitivierung gegenüber  $\cdot\text{O}_2^-$  führten. Dabei könnte eine Rolle spielen, dass die Punktmutation dieser Cysteine mit einer eingeschränkten Funktion der benachbarten Cysteine einhergeht. Vorstellbar wäre, dass die Mutation von Cysteinen die Bildung von Disulfidbrücken bei der Aktivierung der sGC verhindert. Diese Veränderung könnte Thiole, die an der Aktivierung der sGC wesentlich beteiligt sind, für eine oxidative Veränderung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  empfänglicher machen. In den nachfolgenden Abbildungen wurden diese Überlegungen skizziert (Abbildung 46 bis Abbildung 48).

Diese Studien mit sGC-Mutanten zeigen insgesamt, dass das Fehlen kritischer Cysteine zur Beeinträchtigung der sGC-Aktivität führt, vor allem bei vermehrter  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion.

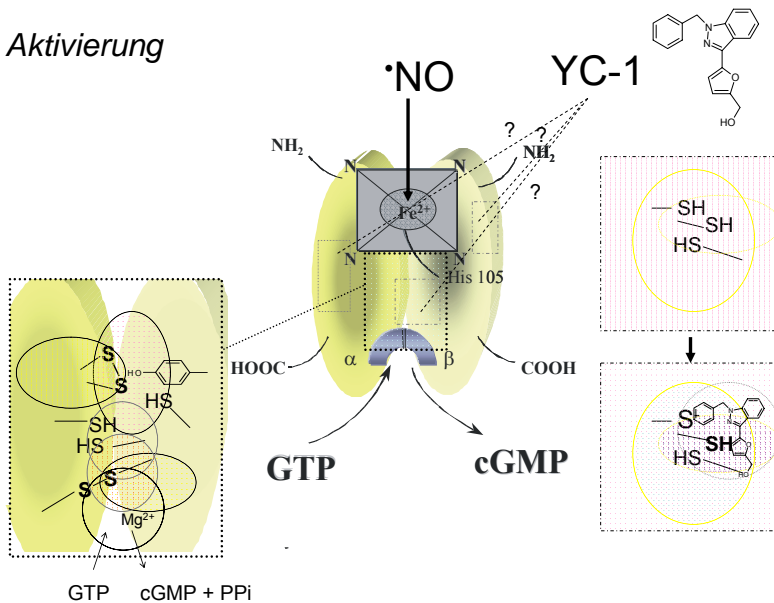
*basal*



**Abbildung 46: Basaler Aktivitätszustand der sGC.**

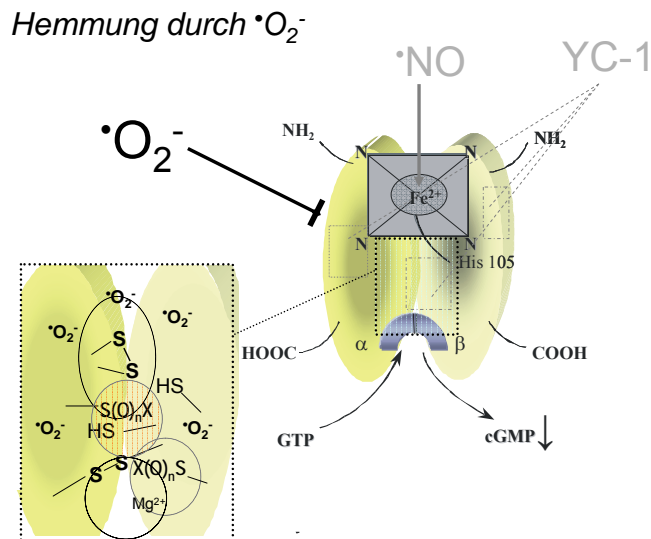
Das Häm-Eisen ist ungebunden. Die Signalweiterleitung von der Hämbindungsdomäne zur katalytischen Domäne ist nicht aktiv. Es kommt zu keinem Umsatz von GTP zu cGMP.

*Aktivierung*



**Abbildung 47: direkte ( $\cdot\text{NO}$ ) und indirekte (YC-1) Aktivierung der sGC.**

Die Signalweiterleitung zur katalytischen Domäne der sGC ist aktiv. Das Aktivierungssignal führt zu einer Änderung der Ladungsdichtestruktur und der Bindungsverhältnisse innerhalb der sGC. Das Aktivierungssignal bewirkt ferner eine gesteigerte cGMP-Produktion in der katalytischen Domäne.



**Abbildung 48: Die Hemmung der basalen und der aktivierten sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$ .**

Die Oxidation von Cystein-Thiolen führt zur Bildung von Sulfoxiden. Diese Veränderung in Ladungsdichte und Enzymstruktur bewirkt eine eingeschränkte intramolekulare Signalweiterleitung. Die Konsequenz ist eine reduzierte Produktion von cGMP.

### 4.2 Rolle des Häm-Eisens der sGC bei der $\cdot\text{O}_2^-$ -Hemmung

Um zu untersuchen, welche Rolle das enzymgebundene Häm und der Redox-Zustand des Häm-Eisens bei der Hemmung der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  spielen, wurde aus gereinigter sGC einerseits das Häm durch Tween 20 entfernt, andererseits das Häm-Eisen mit NS2028 oxidiert (II2.5.4 und III5.1).

Die Entfernung des Häm-Eisens führte zu einer YC-1-insensitiven sGC mit nur schwacher YC-1-Aktivierbarkeit. Die hämfreie sGC wird spezifisch durch Protoporphyrin IX (PIX) aktiviert. Dies wurde ausgenutzt, um den Erfolg der Häm-Entfernung aus dem Enzym zu verifizieren (Abbildung 36). Die hämfreie sGC wurde durch XO/HX signifikant weniger potent gehemmt (ca. 100-fach) als die hämhaltige YC-1-sensitive sGC (Abbildung 37).

Dieser Befund führte zur Annahme, dass die Anwesenheit des Häms in der sGC für die Hemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  zwingend notwendig ist. Eine mit PIX-rekonstituierte Häm-freie sGC erfüllt diese Voraussetzung nicht mehr.

Die Oxidation des Häm-Eisens der sGC mit NS2028 führte zu einer YC-1-insensitiven sGC (III5.1). Diese oxidierte sGC wurde mit HMR3448, einem Aktivator der Häm-oxidierten sGC (Töpfer, 2001) konzentrationsabhängig ( $EC_{50} = 15 \mu\text{M}$ ) und effizient (30-fach) aktiviert. Auch die HMR3448-aktivierte sGC wurde durch XO/HX signifikant weniger potent gehemmt (300-fach) als die YC-1-sensitive sGC mit zweiwertigem Häm-Eisen (Abbildung 37). Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung der sGC durch Superoxid direkt mit dem Oxidationszustand des Häm-Eisens zusammenhängt. Ein möglicher Inhibitionsmechanismus könnte hier die Bildung eines Hämeisen-Peroxo-Komplexes sein, der die Aktivität der YC-1-sensitiven sGC hemmt. Hämeisen-Peroxo-Komplexe wurden bei der Katalyse der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Detoxifikation anaerober Mikroorganismen durch das Enzym Superoxid-Reduktase nachgewiesen (Emerson *et al.*, 2003; Clay *et al.*, 2003). Allerdings müsste dann eine Änderung des Häm-Absorptionsspektrums der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  nachzuweisen sein, wofür es in der Literatur (Mülsch, 1986) und aufgrund eigener Untersuchungen (nicht gezeigt) keine Anhaltspunkte gab. Außerdem wurde keine verstärkte Aktivierung der sGC durch den Aktivator der Häm-oxidierten sGC HMR3448 unter Superoxideinfluss beobachtet, sodass eine Oxidation des Häm-Eisens durch Superoxid auszuschließen ist.

Es ist daher eher anzunehmen, dass das zweiwertige Häm-Eisen das Enzym in einer  $\cdot\text{O}_2^-$ -sensitiven Konformation hält, die kritische Thiol-Gruppen für den Angriff des Superoxids zugänglich macht.

### 4.3 Hemmung der sGC-Aktivität durch Kupfer

Die Hemmung der sGC durch Superoxid kann möglicherweise über Katalyse von Übergangsmetallen bewirkt werden. So ist noch nicht ganz geklärt, ob enzymgebundenes Kupfer und/oder nicht von Häm-gebundenes Eisen Kofaktoren der sGC sind. Gerzer *et al.* fanden stöchiometrische Mengen an Kupfer und Spuren von Eisen in der aus Rinderlunge gereinigten sGC (Gerzer *et al.*, 1981), was auf eine physiologische Funktion von Kupfer und nicht von Häm-gebundenem Eisen im nativen Enzym hindeuten könnte. Dies konnte von Mülsch jedoch nicht in vollem Umfang bestätigt werden - es fanden sich in 6 verschiedenen sGC-Präparationen, die nach dem Verfahren von Gerzer und Kollegen (Gerzer *et al.*, 1981) gewonnen

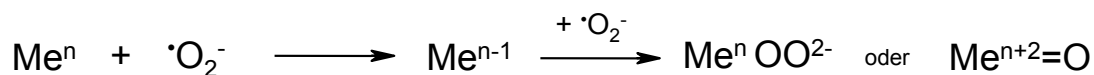
## Diskussion

---

wurden, nur Spuren von Cu (Mülsch, 1986). Hoenicka et al. untersuchten den Kupfergehalt einer in einem Baculovirus/Sf9-System überexprimierten und zur Homogenität gereinigten rekombinanten sGC aus Rattenlunge (Hoenicka *et al.*, 1999). Sie fanden eine nicht-stöchiometrische Menge an Kupfer, was eher auf eine Kontamination der sGC durch Kupfer hindeutete.

Schrammel et al. (Schrammel *et al.*, 1996b) konnten nachweisen, dass die sGC-Aktivität durch Kupfer-Ionen direkt hemmbar ist. In Übereinstimmung mit Schrammel konnte ich beweisen, dass es sich um eine Cu<sup>+</sup>-vermittelte Hemmung handelt, da nach Zugabe von Cu<sup>++</sup> in Form von CuSO<sub>4</sub> die Aufhebung der Hemmung der sGC nur mit dem Cu<sup>+</sup>-spezifischen Neocuproin erreicht wurde (Abbildung 41). GSH konnte allerdings Kupfer chelieren und den Hemm-Effekt aufheben (Schrammel *et al.*, 1996b), eine Beobachtung, die eine Affinität des Kupfers zu Thiol-Gruppen aufzeigt. DTT hatte stattdessen keinen Einfluss auf die Hemmung der sGC durch Kupfer (Abbildung 40).

Die Hemmung der sGC-Aktivität durch Kupfer führte zur Frage, ob <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> bei dieser Inhibition eine wesentliche Rolle spielt. So konnten Shukla und Kollegen zeigen, dass Kupfer-Ionen die Relaxation von Gefäßen diabetischer Kaninchen und die Bildung von cGMP hemmen und dass diese Inhibition durch Zugabe von SOD und CAT aufgehoben werden konnte (Shukla *et al.*, 2004). Die Cu<sup>+</sup>-vermittelte Hemmung der sGC könnte nach dem von Ullrich und Kollegen vorgestellten (Ullrich und Bachschmid, 2000) Mechanismus ablaufen, der die Bildung von Metall-Peroxo-Komplexen postuliert (Abbildung 49). Diese Autoren konnten zeigen, dass Superoxid das Calcineurin über Interaktion mit dem binukleären Fe<sup>II</sup>-Zn<sup>II</sup>-Cluster direkt hemmen kann (Namgaladze *et al.*, 2002). Eine Ausbildung von Kupfer-Peroxo-Komplexen könnte die Oxidation von sGC-Thiolen katalysieren und damit die sGC-Aktivität hemmen.



**Abbildung 49: Bildung von Metall-Peroxo-Komplexe (Ullrich und Bachschmid, 2000).**

Die Vorinkubation mit Kupfer (1 μM) und die anschließende KWK mit XO/HX zeigte, dass zusätzlich zur Hemmung der sGC durch Cu<sup>+</sup> eine Hemmung durch <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> erfolgte. Die

## Diskussion

---

Hemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  nach Kupfer-Vorinkubation war allerdings geringer (Abbildung 42) und die Berechnung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 43).

Diese Befunde zeigen insgesamt, dass  $\text{Cu}^+$ -Ionen die sGC-Aktivität hemmen. Allerdings verhalten sich  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\text{Cu}^+$ -Ionen in Bezug auf die Aktivitätshemmung der sGC nicht additiv, sondern kompetitiv. Wahrscheinlich ist daher, dass Kupfer und  $\cdot\text{O}_2^-$  offensichtlich an einer gemeinsamen Stelle der sGC, möglicherweise an der gleichen Thiol-Gruppe des Enzyms, angreifen und die Hemmung auslösen.

### 4.4 Schlussfolgerung

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die basale und YC-1-stimulierte Aktivität der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  signifikant gehemmt werden kann. Die Hemmung der gereinigten sGC ließ sich durch Zugabe von SOD schnell aufheben und zeigt damit, dass  $\cdot\text{O}_2^-$ , wie für ein biologisches Signaltransduktionsmolekül zu fordern, die Aktivität der sGC schnell und reversibel hemmt.

Sowohl in VSMC (cGMP-EIA) als auch in Gefäßringen der Rattenaorta (P-VASP-Immunoblotting) konnte eine in-vivo-Hemmung der sGC durch Superoxid nachgewiesen werden. Der ca. 2-fache Anstieg der endogenen cGMP-Produktion der VSMC nach Zugabe von exogen zugesetzter PEG-SOD macht deutlich, dass die sGC konstitutiv partiell durch  $\cdot\text{O}_2^-$  gehemmt wird. Bei einem Überschuss an exogener SOD kommt es zu einer vollständigen Protektion der sGC und damit zu einer optimalen cGMP-Produktion. Das deutet darauf hin, dass die sGC als Signaltransduktionsmolekül in der Redoxregulation der Zelle in zwei Richtungen agieren könnte. Einerseits kann die Aktivität der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  gehemmt werden. Dieser Fall könnte auftreten bei einem oxidativen Stresszustand. Andererseits könnte die Aktivität erhöht werden, indem  $\cdot\text{O}_2^-$  vermehrt abgefangen wird. Dieser Fall könnte auftreten, wenn in der Zelle antioxidative Abwehrmechanismen überwiegen. Damit könnte  $\cdot\text{O}_2^-$  neben dem Abfangen von  $\cdot\text{NO}$  auch über einen modulierenden Effekt auf die Aktivität der sGC selbst als biologisches Signalmolekül wirken.

Die Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der  $\cdot\text{O}_2^-$ -vermittelten Inhibition der sGC weisen auf eine oxidative Modifizierung von Thiol-Gruppen hin. Versuche mit Häm-oxidierter und Häm-freier sGC machen eine Lokalisation dieser  $\cdot\text{O}_2^-$ -sensitiven Thiol-Grup-

pen in unmittelbarer Nähe des zweiwertigen Häm-Eisens der sGC wahrscheinlich. Der Austausch von zwei Cysteinen gegen Serine offenbarte eine erhöhte Sensitivität der mutierten sGC gegenüber  $\cdot\text{O}_2^-$ . Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung der Cysteinreste bei der sGC-Aktivität. So könnten Cysteinthiole der Häm-bindungsdomäne über ihre Ladungsdichte und räumliche Orientierung mit dem Häm-Eisen interagieren und dessen Position in der Häm-bindungstasche „justieren“. Eine Störung dieser Justierung, z.B. bei einer oxidativen Modifikation von Thiolgruppen durch  $\cdot\text{O}_2^-$ , könnte zu einem Aktivitätsverlust der sGC führen. Auch die Signalweiterleitung zur katalytischen Domäne kann durch oxidative Modifikation durch  $\cdot\text{O}_2^-$  betroffen sein.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen in dieser Arbeit, dass  $\cdot\text{O}_2^-$  die sGC direkt und schnell-reversibel hemmt. Die sGC fungiert dabei als biologisches Rezeptor- und Effektor-enzym für das Signalmolekül  $\cdot\text{O}_2^-$ . Die oxidative Modifikation von Thiol-Gruppen in der Nähe des Häm-Eisens der sGC könnte dem Mechanismus der sGC-Aktivitätshemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  zu Grunde liegen.

## 5 Zusammenfassung der Diskussion

1. Die basale und YC-1-stimulierte sGC-Aktivität wird  $\cdot\text{NO}$ -unabhängig von  $\cdot\text{O}_2^-$  gehemmt. Die Zugabe von SOD führt zu einer Aufhebung der Hemmung und deutet auf einen schnell-reversiblen Inhibitionsmechanismus hin.  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität der gereinigten sGC.
2. Auch in einem komplexeren System wie z.B. Gewebe und Zellhomogenaten war die sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  inhibierbar. Diese Hemmung ließ sich aufheben durch exogene Zugabe von SOD. Die größeren Konzentrationen an  $\cdot\text{O}_2^-$  zur halbmaximalen Inhibierung der sGC-Aktivität waren zum Teil auf das Vorhandensein endogener CuZn-SOD zurückzuführen.
3. Der Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  in-vitro führte zur Berechnung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildungsrate des Systems XO/HX in  $\mu\text{M}/\text{min}$  und ermöglichte eine Abschätzung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte der sGC-Aktivitätshemmung. Die in-vivo-Detektion von  $\cdot\text{O}_2^-$  in kultivierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta mittels Elektronenspinresonanz mit CMH-Spintrapping zeigte



eine 5-fache Steigerung der basalen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion mit dem intrazellulären Redox-cycler DMNQ und eine 2-fache Steigerung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion nach Stimulation der NADPH-Oxidase mit den physiologischen Aktivatoren PDGF und Ang II. Die mit ESR-Spintrapping ermittelten Werte wurden mit der Lucigenin-abhängigen Chemilumineszenz qualitativ bestätigt.

4. Die Messung der zellulären cGMP-Produktion in glatten Muskelzellen der Rattenaorta (cGMP-EIA) zeigte eine deutliche Reduzierung der cGMP-Bildung durch kontinuierliche  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion mit DMNQ. Die Detektion der VASP-Phosphorylierung als Indikator für den Aktivitätszustand des  $\cdot\text{NO}$ /cGMP-Signaltransduktion bestätigte die fehlende cGMP-abhängige Signalweiterleitung nach Hemmung der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$ . Die physiologische Produktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch Aktivierung membranständiger NADPH-Oxidase mit PDGF verringerte die cGMP-Produktion um ca. 25 %. Die Prä-Inkubation mit Zell-permeabler PEG-SOD führte, alleine oder auch in Gegenwart von PDGF, zu einer 2-fachen Steigerung der YC-1-stimulierten cGMP-Produktion. Die biologische Bedeutung der sGC-Hemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  könnte ein „Redox-Signaling“ mit der sGC als biologischem Sensor sein.
5. Der Inhibitionsmechanismus könnte auf einer oxidativen Modifikation von Thiol-Gruppen zu Sulfoxiden basieren. Zwischenprodukte dieser oxidativen Modifizierung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  sind Sulfinyl-Radikale, die mittels Elektronenspinresonanz direkt detektiert werden konnten. Sowohl die Entfernung als auch die Oxidation des Häm-Eisens führten zu einer signifikant geringeren Inhibierbarkeit durch  $\cdot\text{O}_2^-$ . Es ist daher anzunehmen, dass das zweiwertige Häm-Eisen die sGC in einer Superoxid-sensitiven Konformation hält, die kritische Thiolgruppen für  $\cdot\text{O}_2^-$  zugänglich macht. Der Austausch dieser kritischen Thiol-Gruppen führte zu sGC-Mutanten mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber  $\cdot\text{O}_2^-$ . Die Beteiligung von  $\text{Cu}^+$ -Ionen an der Inhibierung der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  konnte nicht bestätigt werden.

### V Zusammenfassung

Im kardiovaskulären System ist die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) ein Schlüsselenzym der  $\text{NO}/\text{cGMP}$ -Signaltransduktion. Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) aktiviert durch direkte Anbindung an das Häm-Eisen die Produktion von zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP). In glatten Muskelzellen führt ein erhöhter cGMP-Spiegel zur Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK) und letztendlich zur Vasodilatation.

Superoxidanionradikale ( $\text{O}_2^-$ ) sind an der Entstehung und Progression von Herz-Kreislauferkrankungen beteiligt. Im vaskulären Gewebe stellt  $\text{O}_2^-$  einen Gegenspieler zum  $\text{NO}$  dar. So führt eine vermehrte Produktion von  $\text{O}_2^-$  zu einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit von  $\text{NO}$  ( $\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$ ) (Ohara *et al.*, 1993a).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob bei einer vaskulären Störung des  $\text{NO}$ -Systems die Funktion der sGC durch  $\text{O}_2^-$  auch direkt betroffen ist. Damit könnte dem Superoxid eine weit größere biologische Bedeutung zukommen als bisher angenommen, nämlich die Funktion als Signaltransduktionsmolekül mit der sGC als definiertem Rezeptor und Effektor.

Die sGC-Aktivitätsuntersuchungen mit gereinigter sGC zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der basalen und der YC-1- (100  $\mu\text{M}$ ) stimulierten ( $\text{NO}$ -unabhängigen) sGC-Aktivität durch das  $\text{O}_2^-$ -generierende System Xanthinoxidase/Hypoxanthin (XO/HX) ( $\text{IC}_{50}(\text{basal}) = 0,0031$  vs.  $\text{IC}_{50}(\text{YC-1}) = 0,022$  mU/ml). Die Aufhebung dieser Hemmung durch Superoxiddismutase (SOD, 100 U/ml) deutete auf eine spezifische und schnell-reversible Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\text{O}_2^-$  hin.

Die in-vitro gezeigte Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\text{O}_2^-$  konnte auch in-vivo nachgewiesen werden.

Die Produktion von  $\text{O}_2^-$  in kultivierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta (VSMC) konnte mit Elektronenspinresonanz (ESR) und Lucigenin-abhängiger Chemilumineszenz gezeigt werden. Dabei wurde mit ESR eine ca. 5-fache Steigerung der basalen  $\text{O}_2^-$ -Produktion mit dem intrazellulären Redoxcyclus Dimethoxynaphthochinon (DMNQ, 10  $\mu\text{M}$ ) beobachtet. Auch die Aktivierung membranständiger NADPH-Oxidasen durch die physiologischen Aktivatoren Angiotensin II (Ang II, 100 nM) und platelet-derived growth factor (PDGF, 50 ng/ml) führten zu einer ca. 2-fach gesteigerten  $\text{O}_2^-$ -Produktion.

## Zusammenfassung

---

Die Hemmung der cGMP-Produktion durch  $\cdot\text{O}_2^-$  in kultivierten VSMC konnte in-vivo mittels Enzym-Immuno-Assays (cGMP-EIA) [YC-1 (100 $\mu\text{M}$ ) = 100 % vs. YC-1 + DMNQ (10  $\mu\text{M}$ ) = 21 % vs. YC-1 + PDGF (50 ng/ml) = 76,6 %] nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Auswirkung von  $\cdot\text{O}_2^-$  auf die cGMP-abhängige Signaltransduktion mit Immunoblotting (Western-Blot) von phosphoryliertem Vasodilator-stimulierten Phosphoprotein (VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein) gezeigt. Intrazelluläre  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion durch Redoxcycling (DMNQ, 10  $\mu\text{M}$ ) reduzierte die YC-1-stimulierte Phosphorylierung von VASP um 44,4 %.

In weiteren Untersuchungen sollte der molekulare Mechanismus der schnell-reversiblen Hemmung der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  auf Ebene der sGC aufgeklärt werden. Dabei wies die direkte Detektion von Sulfinyl-Radikalen auf eine Oxidation von Proteinthiolen durch  $\cdot\text{O}_2^-$  hin. Der spezifische Austausch von Cysteinen der sGC mittels Punktmutation und die Expression der sGC-Mutanten in COS1-Zellen zeigte, dass Thiol-Gruppen der sGC mit  $\cdot\text{O}_2^-$  interagieren. Dabei stellte sich heraus, dass die sGC-Mutanten  $\alpha_1/\beta_1\text{C541S}$  und  $\alpha_1\text{C238S}/\beta_1$  viel sensitiver auf  $\cdot\text{O}_2^-$  (XO 3 mU/ml) reagieren als die Wildtyp-sGC ( $\text{WT}\alpha_1/\text{WT}\beta_1 = -62\%$  vs.  $\text{WT}\alpha_1\text{C238S}/\text{WT}\beta_1 = -93,7\%$  vs.  $\text{WT}\alpha_1/\beta_1\text{C541S} = -90,2\%$ ).

Um zu untersuchen, ob das Häm-Eisen der sGC an der Aktivitätshemmung durch  $\cdot\text{O}_2^-$  beteiligt ist, wurde einerseits das Häm entfernt (Tween 20), andererseits das Häm- $\text{Fe}^{2+}$  zum Häm- $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert (NS2028). Beide Behandlungen führten zu einer weitgehend YC-1-insensitiven sGC. Die mit Protoporphyrin IX (PIX) aktivierte Häm-freie sGC und die mit HMR3448 aktivierte Häm-oxidierte sGC wurden durch XO/HX wesentlich weniger potent gehemmt als die YC-1-sensitive sGC. Dieser Befund deutet auf eine Beteiligung des Häm-Eisens bei der Aktivitätshemmung der sGC durch  $\cdot\text{O}_2^-$  hin.

Die in dieser Arbeit gezeigte direkte und schnell-reversible Hemmung der sGC-Aktivität durch  $\cdot\text{O}_2^-$  weist der löslichen Guanylatzyklase eine neue biologische Funktion zu. Die sGC könnte als Rezeptor- und Effektorenzym die Signaltransduktion des Signalmoleküls  $\cdot\text{O}_2^-$  vermitteln.

### VI Literaturquellen

- Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale J P, Sorensen K E, Deanfield J E and Celermajer D S (1998) Smooth Muscle Dysfunction Occurs Independently of Impaired Endothelium-Dependent Dilation in Adults at Risk of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **32**: pp 123-127.
- Amersham Pharmacia Biotec (1999) cGMP enzyme immunoassay (EIA) system, in *Manual* pp 1-59.
- Andreadis AA, Hazen S L, Comhair S A and Erzurum S C (2003) Oxidative and Nitrosative Events in Asthma. *Free Radic Biol Med* **35**: pp 213-225.
- Arnold WP, Mittal C K, Katsuki S and Murad F (1977) Nitric Oxide Activates Guanylate Cyclase and Increases Guanosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Levels in Various Tissue Preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: pp 3203-3207.
- Ashman DF, Lipton R, Melicow M M and Price T D (1963) Isolation of Adenosine 3', 5'-Monophosphate and Guanosine 3', 5'-Monophosphate From Rat Urine. *Biochem Biophys Res Commun* **11:330-4.**: pp 330-334.
- Babior BM, Kipnes R S and Curnutte J T (1973) Biological Defense Mechanisms. The Production by Leukocytes of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent. *J Clin Invest* **52**: pp 741-744.
- Ballou DP, Zhao Y, Brandish P E and 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 U S A* **99**: pp 12097-12101.
- Barrett WC, DeGnore J P, Keng Y F, Zhang Z Y, Yim M B and Chock P B (1999) Roles of Superoxide Radical Anion in Signal Transduction Mediated by Reversible Regulation of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. *J Biol Chem* **274**: pp 34543-34546.
- Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A and Stasch J P (2001a) NO-Independent Regulatory Site of Direct SGC Stimulators Like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* **1**: pp 13.
- Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A and Stasch J P (2001b) NO-Independent Regulatory Site of Direct SGC Stimulators Like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* **1**: pp 13.
- Beckman JS and Koppenol W H (1996) Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: the Good, the Bad, and Ugly. *Am J Physiol* **271**: pp C1424-C1437.
- Bellamy TC, Wood J and Garthwaite J (2002) On the Activation of Soluble Guanylyl Cyclase by Nitric Oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: pp 507-510.
- Benon HJ, Bielski J, Cabelli D E, Ravindra L, Arudi L and Ross A B (1985) Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>- Radicals in Aqueous Solution. *J Phys Chem Ref Data* **14**: pp 1041-1100.
- Bhunja AK, Han H, Snowden A and Chatterjee S (1997) Redox-Regulated Signaling by Lactosylceramide in the Proliferation of Human Aortic Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* **272**: pp 15642-15649.
- Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E and Hofmann F (1999) Selective Loss of Cone Function in Mice Lacking the Cyclic Nucleotide-Gated Channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: pp 7553-7557.

## Literaturquellen

---

- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.: pp 248-254.
- Brandes RP (2003) Role of NADPH Oxidases in the Control of Vascular Gene Expression. *Antioxid Redox Signal* **5**: pp 803-811.
- Brandish PE, Buechler W and Marletta M A (1998) Regeneration of the Ferrous Heme of Soluble Guanylate Cyclase From the Nitric Oxide Complex: Acceleration by Thiols and Oxyhemoglobin. *Biochemistry* **37**: pp 16898-16907.
- Brüne B, Schmidt K U and Ullrich V (1990) Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Carbon Monoxide and Inhibition by Superoxide Anion. *Eur J Biochem* **192**: pp 683-688.
- Budworth J, Meillerais S, Charles I and Powell K (1999) Tissue Distribution of the Human Soluble Guanylate Cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: pp 696-701.
- Buechler WA, Ivanova K, Wolfram G, Drummer C, Heim J M and Gerzer R (1994) Soluble Guanylyl Cyclase and Platelet Function. *Ann N Y Acad Sci* **714**:151-7.: pp 151-157.
- Buechler WA, Nakane M and Murad F (1991) Expression of Soluble Guanylate Cyclase Activity Requires Both Enzyme Subunits. *Biochem Biophys Res Commun* **174**: pp 351-357.
- Burstyn JN, Yu A E, Dierks E A, Hawkins B K and Dawson J H (1995) Studies of the Heme Coordination and Ligand Binding Properties of Soluble Guanylyl Cyclase (SGC): Characterization of Fe(II)SGC and Fe(II)SGC(CO) by Electronic Absorption and Magnetic Circular Dichroism Spectroscopies and Failure of CO to Activate the Enzyme. *Biochemistry* **34**: pp 5896-5903.
- Cai H and Harrison D G (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: the Role of Oxidant Stress. *Circ Res* **87**: pp 840-844.
- Capers Q, Alexander R W, Lou P, De Leon H, Wilcox J N, Ishizaka N, Howard A B and Taylor W R (1997) Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Aortic Tissues of Hypertensive Rats. *Hypertension* **30**: pp 1397-1402.
- Ceriello A (2003) New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a "Causal" Antioxidant Therapy. *Diabetes Care* **26**: pp 1589-1596.
- Chen Z, Zhang J and Stamler J S (2002) Identification of the Enzymatic Mechanism of Nitroglycerin Bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: pp 8306-8311.
- Cherry PD, Omar H A, Farrell K A, Stuart J S and Wolin M S (1990a) Superoxide Anion Inhibits CGMP-Associated Bovine Pulmonary Arterial Relaxation. *Am J Physiol* **259**: pp H1056-H1062.
- Cherry PD, Omar H A, Farrell K A, Stuart J S and Wolin M S (1990b) Superoxide Anion Inhibits CGMP-Associated Bovine Pulmonary Arterial Relaxation. *Am J Physiol* **259**: pp H1056-H1062.
- Clay MD, Cospers C A, Jenney F E, Jr., Adams M W and Johnson M K (2003) Nitric Oxide Binding at the Mononuclear Active Site of Reduced *Pyrococcus furiosus* Superoxide Reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: pp 3796-3801.
- Cleveland DW and Rothstein J D (2001) From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering Selective Motor Neuron Death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**: pp 806-819.
- Collier J and Vallance P (1989) Second Messenger Role for NO Widens to Nervous and Immune Systems. *Trends Pharmacol Sci* **10**: pp 427-431.

## Literaturquellen

---

- De Keulenaer GW, Alexander R W, Ushio-Fukai M, Ishizaka N and Griendling K K (1998) Tumour Necrosis Factor Alpha Activates a P22phox-Based NADH Oxidase in Vascular Smooth Muscle. *Biochem J* **329**: pp 653-657.
- Degerman E, Belfrage P and Manganiello V C (1997) Structure, Localization, and Regulation of CGMP-Inhibited Phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* **272**: pp 6823-6826.
- Deinum G, Stone J R, Babcock G T and Marletta M A (1996) Binding of Nitric Oxide and Carbon Monoxide to Soluble Guanylate Cyclase As Observed With Resonance Raman Spectroscopy. *Biochemistry* **35**: pp 1540-1547.
- Denninger JW and Marletta M A (1999) Guanylate Cyclase and the .NO/CGMP Signaling Pathway. *Biochim Biophys Acta* **1411**: pp 334-350.
- DeRubertis FR, Craven P A, Melhem M F and Salah E M (2004) Attenuation of Renal Injury in Db/Db Mice Overexpressing Superoxide Dismutase: Evidence for Reduced Superoxide-Nitric Oxide Interaction. *Diabetes* **53**: pp 762-768.
- Dikalov S, Khramtsov V and Zimmer G (1996) Determination of Rate Constants of the Reactions of Thiols With Superoxide Radical by Electron Paramagnetic Resonance: Critical Remarks on Spectrophotometric Approaches. *Arch Biochem Biophys* **326**: pp 207-218.
- Draijer R, Vaandrager A B, Nolte C, De Jonge H R, Walter U and van Hinsbergh V W (1995) Expression of CGMP-Dependent Protein Kinase I and Phosphorylation of Its Substrate, Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein, in Human Endothelial Cells of Different Origin. *Circ Res* **77**: pp 897-905.
- Emerson JP, Coulter E D, Phillips R S and Kurtz D M, Jr. (2003) Kinetics of the Superoxide Reductase Catalytic Cycle. *J Biol Chem* **278**: pp 39662-39668.
- Fattman CL, Schaefer L M and Oury T D (2003) Extracellular Superoxide Dismutase in Biology and Medicine. *Free Radic Biol Med* **35**: pp 236-256.
- Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B and 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 Donor Bioactivation. *Mol Pharmacol* **56**: pp 243-253.
- Förstermann U, Schmidt H H, Pollock J S, Sheng H, Mitchell J A, Warner T D, Nakane M and Murad F (1991) Isoforms of Nitric Oxide Synthase. Characterization and Purification From Different Cell Types. *Biochem Pharmacol* **42**: pp 1849-1857.
- Fridovich I (1970) Quantitative Aspects of the Production of Superoxide Anion Radical by Milk Xanthine Oxidase. *J Biol Chem* **245**: pp 4053-4057.
- Friebe A and Koesling D (1998) Mechanism of YC-1-Induced Activation of Soluble Guanylyl Cyclase. *Mol Pharmacol* **53**: pp 123-127.
- Friebe A, Mullershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G and Koesling D (1998a) YC-1 Potentiates Nitric Oxide- and Carbon Monoxide-Induced Cyclic GMP Effects in Human Platelets. *Mol Pharmacol* **54**: pp 962-967.
- Friebe A, Russwurm M, Mergia E and Koesling D (1999) A Point-Mutated Guanylyl Cyclase With Features of the YC-1-Stimulated Enzyme: Implications for the YC-1 Binding Site? *Biochemistry* **38**: pp 15253-15257.
- Friebe A, Schultz G and Koesling D (1996) Sensitizing Soluble Guanylyl Cyclase to Become a Highly CO-Sensitive Enzyme. *EMBO J* **15**: pp 6863-6868.

## Literaturquellen

---

- Friebe A, Schultz G and Koesling D (1998b) Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase by Superoxide Dismutase Is Mediated by NO. *Biochem J* **335**: pp 527-531.
- Frings S (1997) Cyclic Nucleotide-Gated Channels and Calcium: an Intimate Relation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **31:75-82**.: pp 75-82.
- Fung HL (2004) Biochemical Mechanism of Nitroglycerin Action and Tolerance: Is This Old Mystery Solved? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44:67-85**.: pp 67-85.
- Furchgott RF and Zawadzki J V (1980) The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* **288**: pp 373-376.
- Galle J, Zabel U, Hubner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C and Schmidt H H (1999) Effects of the Soluble Guanylyl Cyclase Activator, YC-1, on Vascular Tone, Cyclic GMP Levels and Phosphodiesterase Activity. *Br J Pharmacol* **127**: pp 195-203.
- Garbers DL and Gray J P (1974) Guanylate Cyclase From Sperm of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus Purpuratus*. *Methods Enzymol* **38:196-9**.: pp 196-199.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton C L, Nielsen E B, Schmidt K and 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**: pp 184-188.
- Gerzer R, Bohme E, Hofmann F and Schultz G (1981) Soluble Guanylate Cyclase Purified From Bovine Lung Contains Heme and Copper. *FEBS Lett* **132**: pp 71-74.
- Ghofrani HA, Rose F, Schermuly R T, Olschewski H, Wiedemann R, Kreckel A, Weissmann N, Ghofrani S, Enke B, Seeger W and Grimminger F (2003) Oral Sildenafil As Long-Term Adjunct Therapy to Inhaled Iloprost in Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* **42**: pp 158-164.
- Gibson WH and Roughton F J (1957) The Kinetics and Equilibria of the Reactions of Nitric Oxide With Sheep Haemoglobin. *J Physiol* **136**: pp 507-524.
- Goldberg ND, Dietz S B and O'Toole A G (1969) Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate in Mammalian Tissues and Urine. *J Biol Chem* **244**: pp 4458-4466.
- Gordon, D., Mohai, L.G., Schwartz, S.M. (1986). Induction of polyploidy in cultures of neonatal rat aortic smooth muscle cells. *Circ.Res.* **59**, 633-644.
- Green LC, Ruiz d L, Wagner D A, Rand W, Istfan N, Young V R and Tannenbaum S R (1981) Nitrate Biosynthesis in Man. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: pp 7764-7768.
- Griendling KK, Minieri C A, Ollerenshaw J D and Alexander R W (1994) Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* **74**: pp 1141-1148.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B and Ushio-Fukai M (2000) Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: pp 2175-2183.
- Gryglewski RJ, Palmer R M and Moncada S (1986) Superoxide Anion Is Involved in the Breakdown of Endothelium-Derived Vascular Relaxing Factor. *Nature* **320**: pp 454-456.
- Halbrugge M and Walter U (1989) Purification of a Vasodilator-Regulated Phosphoprotein From Human Platelets. *Eur J Biochem* **20;185**: pp 41-50.

## Literaturquellen

---

- Hanafy KA, Krumenacker J S and Murad F (2001) NO, Nitrotyrosine, and Cyclic GMP in Signal Transduction. *Med Sci Monit* **7**: pp 801-819.
- Hardman JG and Sutherland E W (1969) Guanyl Cyclase, an Enzyme Catalyzing the Formation of Guanosine 3',5'-Monophosphate From Guanosine Triphosphate. *J Biol Chem* **244**: pp 6363-6370.
- Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G and Bohme E (1990) Expression of Soluble Guanylyl Cyclase. Catalytic Activity Requires Two Enzyme Subunits. *FEBS Lett* **272**: pp 221-223.
- Hasegawa T, Bando A, Tsuchiya K, Abe S, Okamoto M, Kirima K, Ueno S, Yoshizumi M, Houchi H and Tamaki T (2004) Enzymatic and Nonenzymatic Formation of Reactive Oxygen Species From 6-Anilino-5,8-Quinolinequinone. *Biochim Biophys Acta* **1670**: pp 19-27.
- Hauser W, Knobloch K P, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U and Zimmer M (1999) Megakaryocyte Hyperplasia and Enhanced Agonist-Induced Platelet Activation in Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Knockout Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: pp 8120-8125.
- Heikkila RE, Cabbat F S and Cohen G (1976) In Vivo Inhibition of Superoxide Dismutase in Mice by Diethyldithiocarbamate. *J Biol Chem* **251**: pp 2182-2185.
- Hevel JM, White K A and Marletta M A (1991) Purification of the Inducible Murine Macrophage Nitric Oxide Synthase. Identification As a Flavoprotein. *J Biol Chem* **266**: pp 22789-22791.
- Hishikawa K and Luscher T F (1997) Pulsatile Stretch Stimulates Superoxide Production in Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation* **96**: pp 3610-3616.
- Hoenicka M, Becker E M, Apeler H, Sirichoke T, Schroder H, Gerzer R and 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**: pp 14-23.
- Hofmann F, Ammendola A and Schlossmann J (2000) Rising Behind NO: CGMP-Dependent Protein Kinases. *J Cell Sci* **113**: pp 1671-1676.
- Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K and Walter U (1994) Phosphorylation of Focal Adhesion Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein at Ser157 in Intact Human Platelets Correlates With Fibrinogen Receptor Inhibition. *Eur J Biochem* **225**: pp 21-27.
- Houslay MD and Milligan G (1997) Tailoring CAMP-Signalling Responses Through Isoform Multiplicity. *Trends Biochem Sci* **22**: pp 217-224.
- Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch K D, Gausepohl H, Frank R, Schultz G and Bohme E (1990) Purification of Soluble Guanylyl Cyclase From Bovine Lung by a New Immunoaffinity Chromatographic Method. *Eur J Biochem* **20**;190: pp 273-278.
- Hurley JH (1998) The Adenylyl and Guanylyl Cyclase Superfamily. *Curr Opin Struct Biol* **8**: pp 770-777.
- Hwang J, Saha A, Boo Y C, Sorescu G P, McNally J S, Holland S M, Dikalov S, Giddens D P, Griendling K K, Harrison D G and Jo H (2003) Oscillatory Shear Stress Stimulates Endothelial Production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> From P47phox-Dependent NAD(P)H Oxidases, Leading to Monocyte Adhesion. *J Biol Chem* **278**: pp 47291-47298.
- Ibarra-Alvarado C, Galle J, Melichar V O, Mameghani A and Schmidt H H (2002) Phosphorylation of Blood Vessel Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein at Serine 239 As a Functional Biochemical Marker of Endothelial Nitric Oxide/Cyclic GMP Signaling. *Mol Pharmacol* **61**: pp 312-319.
- Ignarro LJ, Buga G M, Wood K S, Byrns R E and Chaudhuri G (1987) Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released From Artery and Vein Is Nitric Oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: pp 9265-9269.



## Literaturquellen

---

- Ignarro LJ, Wood K S and Wolin M S (1982) Activation of Purified Soluble Guanylate Cyclase by Protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: pp 2870-2873.
- Ishikawa E, Ishikawa S, Davis J W and Sutherland E W (1969) Determination of Guanosine 3',5'-Monophosphate in Tissues and of Guanyl Cyclase in Rat Intestine. *J Biol Chem* **244**: pp 6371-6376.
- Jaffrey SR and Snyder S H (1995) Nitric Oxide: a Neural Messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**:417-40.: pp 417-440.
- Jones CM, Lawrence A, Wardman P and Burkitt M J (2002) Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Investigation into the Kinetics of Glutathione Oxidation by the Superoxide Radical: Re-Evaluation of the Rate Constant. *Free Radic Biol Med* **32**: pp 982-990.
- Jones CM, Lawrence A, Wardman P and Burkitt M J (2003) Kinetics of Superoxide Scavenging by Glutathione: an Evaluation of Its Role in the Removal of Mitochondrial Superoxide. *Biochem Soc Trans* **31**: pp 1337-1339.
- Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri J A, Kuno T, Chang B Y, Waldman S A and Murad F (1986) Soluble Guanylate Cyclase From Rat Lung Exists As a Heterodimer. *J Biol Chem* **261**: pp 7236-7241.
- Kazerounian S, Pitari G M, Ruiz-Stewart I, Schulz S and Waldman S A (2002) Nitric Oxide Activation of Soluble Guanylyl Cyclase Reveals High and Low Affinity Sites That Mediate Allosteric Inhibition by Calcium. *Biochemistry* **41**: pp 3396-3404.
- Keele BB, Jr., McCord J M and Fridovich I (1970) Superoxide Dismutase From Escherichia Coli B. A New Manganese-Containing Enzyme. *J Biol Chem* **245**: pp 6176-6181.
- Kharitonov VG, Russwurm M, Magde D, Sharma V S and Koesling D (1997b) Dissociation of Nitric Oxide From Soluble Guanylate Cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: pp 284-286.
- Kharitonov VG, Sharma V S, Magde D and Koesling D (1997a) Kinetics of Nitric Oxide Dissociation From Five- and Six-Coordinate Nitrosyl Hemes and Heme Proteins, Including Soluble Guanylate Cyclase. *Biochemistry* **36**: pp 6814-6818.
- Kimura H, Mittal C K and Murad F (1976) Appearance of Magnesium Guanylate Cyclase Activity in Rat Liver With Sodium Azide Activation. *J Biol Chem* **251**: pp 7769-7773.
- Kimura H and Murad F (1974) Evidence for Two Different Forms of Guanylate Cyclase in Rat Heart. *J Biol Chem* **249**: pp 6910-6916.
- Knapp LT and Klann E (2000) Superoxide-Induced Stimulation of Protein Kinase C Via Thiol Modification and Modulation of Zinc Content. *J Biol Chem* **275**: pp 24136-24145.
- Knapp LT and Klann E (2002) Potentiation of Hippocampal Synaptic Transmission by Superoxide Requires the Oxidative Activation of Protein Kinase C. *J Neurosci* **22**: pp 674-683.
- Knowles RG and Moncada S (1994) Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem J* **298**: pp 249-258.
- Koesling D and Friebe A (1999) Soluble Guanylyl Cyclase: Structure and Regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**:41-65.: pp 41-65.
- Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch K D, Mulsch A, Bohme E, Schultz G and Frank R (1988) The Primary Structure of the 70 KDa Subunit of Bovine Soluble Guanylate Cyclase. *FEBS Lett* **239**: pp 29-34.

## Literaturquellen

---

- Kolberg M, Bleifuss G, Sjöberg B M, Graslund A, Lubitz W, Lendzian F and Lassmann G (2002) Generation and Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Detection of Thiyl Radicals in Model Proteins and in the R1 Subunit of Escherichia Coli Ribonucleotide Reductase. *Arch Biochem Biophys* **397**: pp 57-68.
- Koppenol WH (1998) The Basic Chemistry of Nitrogen Monoxide and Peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* **25**: pp 385-391.
- Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammel A, Meyer W, Mayer B, Weber M and Kojda G (2002) Effect of Hypercholesterolemia on Expression and Function of Vascular Soluble Guanylyl Cyclase. *Circulation* pp 855-860.
- Lämmler UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laight DW, Kaw A V, Carrier M J and Anggard E E (1998) Interaction Between Superoxide Anion and Nitric Oxide in the Regulation of Vascular Endothelial Function. *Br J Pharmacol* **124**: pp 238-244.
- Lamothe M, Chang F J, Balashova N, Shirokov R and Beuve A (2004) Functional Characterization of Nitric Oxide and YC-1 Activation of Soluble Guanylyl Cyclase: Structural Implication for the YC-1 Binding Site? *Biochemistry* **43**: pp 3039-3048.
- Lander HM, Hajjar D P, Hempstead B L, Mirza U A, Chait B T, Campbell S and Quilliam L A (1997) A Molecular Redox Switch on P21(Ras). Structural Basis for the Nitric Oxide-P21(Ras) Interaction. *J Biol Chem* **272**: pp 4323-4326.
- Lander HM, Ogiste J S, Pearce S F, Levi R and Novogrodsky A (1995) Nitric Oxide-Stimulated Guanine Nucleotide Exchange on P21ras. *J Biol Chem* **270**: pp 7017-7020.
- Lewis RS and Deen W M (1994) Kinetics of the Reaction of Nitric Oxide With Oxygen in Aqueous Solutions. *Chem Res Toxicol* **7**: pp 568-574.
- Li J, Billiar T R, Talanian R V and Kim Y M (1997) Nitric Oxide Reversibly Inhibits Seven Members of the Caspase Family Via S-Nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: pp 419-424.
- Li Y, Huang T T, Carlson E J, Melov S, Ursell P C, Olson J L, Noble L J, Yoshimura M P, Berger C, Chan P H and . (1995) Dilated Cardiomyopathy and Neonatal Lethality in Mutant Mice Lacking Manganese Superoxide Dismutase. *Nat Genet* **11**: pp 376-381.
- Liu J, Yang F, Yang X P, Jankowski M and Pagano P J (2003) NAD(P)H Oxidase Mediates Angiotensin II-Induced Vascular Macrophage Infiltration and Medial Hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: pp 776-782.
- Lohmann SM, Vaandrager A B, Smolenski A, Walter U and De Jonge H R (1997) Distinct and Specific Functions of CGMP-Dependent Protein Kinases. *Trends Biochem Sci* **22**: pp 307-312.
- Lucas KA, Pitari G M, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik K P and Waldman S A (2000) Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**: pp 375-414.
- Lynch RE and Fridovich I (1979) Autoinactivation of Xanthine Oxidase: the Role of Superoxide Radical and Hydrogen Peroxide. *Biochim Biophys Acta* **571**: pp 195-200.
- Markesbery WR (1997) Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med* **23**: pp 134-147.
- Marletta MA (1994) Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. *Cell* **78**: pp 927-930.

## Literaturquellen

---

- Marsh N and Marsh A (2000) A Short History of Nitroglycerine and Nitric Oxide in Pharmacology and Physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**: pp 313-319.
- Martin E, Lee Y C and Murad F (2001) YC-1 Activation of Human Soluble Guanylyl Cyclase Has Both Heme-Dependent and Heme-Independent Components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: pp 12938-12942.
- Marumo T, Schini-Kerth V B, Fisslthaler B and Busse R (1997a) Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Superoxide Anion Production Modulates Activation of Transcription Factor NF-KappaB and Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation* **96**: pp 2361-2367.
- Marumo T, Schini-Kerth V B, Fisslthaler B and Busse R (1997b) Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Superoxide Anion Production Modulates Activation of Transcription Factor NF-KappaB and Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation* **96**: pp 2361-2367.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley D G, Dunkerley H A, Netherton S J, Raymond D R, Elbatarny H S and Jimmo S L (2003) Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity, Expression, and Targeting in Cells of the Cardiovascular System. *Mol Pharmacol* **64**: pp 533-546.
- Mayer B, Brunner F and Schmidt K (1993) Novel Actions of Methylene Blue. *Eur Heart J* **14 Suppl I:22-6.**: pp 22-26.
- McCord JM and Fridovich I (1969a) Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *J Biol Chem* **244**: pp 6049-6055.
- McCord JM and Fridovich I (1969b) Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *J Biol Chem* **244**: pp 6049-6055.
- McCoy DE, Guggino S E and Stanton B A (1995) The Renal CGMP-Gated Cation Channel: Its Molecular Structure and Physiological Role. *Kidney Int* **48**: pp 1125-1133.
- McNally JS, Davis M E, Giddens D P, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H and Harrison D G (2003) Role of Xanthine Oxidoreductase and NAD(P)H Oxidase in Endothelial Superoxide Production in Response to Oscillatory Shear Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285** : pp H2290-H2297.
- Miki N, Kawabe Y and Kuriyama K (1977) Activation of Cerebral Guanylate Cyclase by Nitric Oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **75**: pp 851-856.
- Misaka T, Kusakabe Y, Emori Y, Gonoi T, Arai S and Abe K (1997) Taste Buds Have a Cyclic Nucleotide-Activated Channel, CNGgust. *J Biol Chem* **272**: pp 22623-22629.
- Misra HP (1974) Generation of Superoxide Free Radical During the Autoxidation of Thiols. *J Biol Chem* **249**: pp 2151-2155.
- Mohazzab KM, Kaminski P M and Wolin M S (1994) NADH Oxidoreductase Is a Major Source of Superoxide Anion in Bovine Coronary Artery Endothelium. *Am J Physiol* **266**: pp H2568-H2572.
- Moncada S and Higgs A (1993) The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* **329**: pp 2002-2012.
- Morel DW, DiCorleto P E and Chisolm G M (1984) Endothelial and Smooth Muscle Cells Alter Low Density Lipoprotein in Vitro by Free Radical Oxidation. *Arteriosclerosis* **4**: pp 357-364.
- Moro MA, Russel R J, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar V M, Radomski M W and Moncada S (1996) CGMP Mediates the Vascular and Platelet Actions of Nitric Oxide: Confirmation Using an Inhibitor of the Soluble Guanylyl Cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: pp 1480-1485.

## Literaturquellen

---

- Muller FL, Liu Y and Van Remmen H (2004) Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J Biol Chem* ..
- Mullershausen F, Russwurm M, Thompson W J, Liu L, Koesling D and Friebe A (2001) Rapid Nitric Oxide-Induced Desensitization of the CGMP Response Is Caused by Increased Activity of Phosphodiesterase Type 5 Paralleled by Phosphorylation of the Enzyme. *J Cell Biol* **155**: pp 271-278.
- Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch J P, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T and Munzel T (2001) Effects of in Vivo Nitroglycerin Treatment on Activity and Expression of the Guanylyl Cyclase and CGMP-Dependent Protein Kinase and Their Downstream Target Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein in Aorta. *Circulation* **103**: pp 2188-2194.
- Mülsch, ., Bauersachs J, Schafer A, Stasch J P, Kast R and Busse 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**: pp 681-689.
- Mülsch, A. Untersuchungen zur Regulation der löslichen Guanylat-Cyclase. 1986. Universität Heidelberg. Ref Type:Thesis/Dissertation
- Mülsch A, Busse R, Liebau S and Forstermann U (1988) LY 83583 Interferes With the Release of Endothelium-Derived Relaxing Factor and Inhibits Soluble Guanylate Cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* **247**: pp 283-288.
- Mülsch A, Luckhoff A, Pohl U, Busse R and Bassenge E (1989) LY 83583 (6-Anilino-5,8-Quinolinedione) Blocks Nitrovasodilator-Induced Cyclic GMP Increases and Inhibition of Platelet Activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **340**: pp 119-125.
- Münzel T, Sayegh H, Freeman B A, Tarpey M M and Harrison D G (1995) Evidence for Enhanced Vascular Superoxide Anion Production in Nitrate Tolerance. A Novel Mechanism Underlying Tolerance and Cross-Tolerance. *J Clin Invest* **95**: pp 187-194.
- Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W and Murad F (1990) Molecular Cloning and Expression of cDNAs Coding for Soluble Guanylate Cyclase From Rat Lung. *J Biol Chem* **265**: pp 16841-16845.
- Namgaladze D, Hofer H W and Ullrich V (2002) Redox Control of Calcineurin by Targeting the Binuclear Fe(2+)-Zn(2+) Center at the Enzyme Active Site. *J Biol Chem* **277**: pp 5962-5969.
- Nathan C and Xie Q W (1994) Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide. *J Biol Chem* **269**: pp 13725-13728.
- Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl U D, Walter U, Gertler F B, Wehland J and Chakraborty T (1997) A Novel Proline-Rich Motif Present in ActA of *Listeria monocytogenes* and Cytoskeletal Proteins Is the Ligand for the EVH1 Domain, a Protein Module Present in the Ena/VASP Family. *EMBO J* **16**: pp 5433-5444.
- Niroomand F, Rossle R, Mulsch A and Bohme E (1989) Under Anaerobic Conditions, Soluble Guanylate Cyclase Is Specifically Stimulated by Glutathione. *Biochem Biophys Res Commun* **161** : pp 75-80.
- Ohara Y, Peterson T E and Harrison D G (1993a) Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *J Clin Invest* **91**: pp 2546-2551.
- Ohara Y, Peterson T E and Harrison D G (1993b) Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *J Clin Invest* **91**: pp 2546-2551.
- Omar HA, Cherry P D, Mortelliti M P, Burke-Wolin T and Wolin M S (1991) Inhibition of Coronary Artery Superoxide Dismutase Attenuates Endothelium-Dependent and -Independent Nitrovasodilator Relaxation. *Circ Res* **69**: pp 601-608.

## Literaturquellen

---

Pagano PJ, Chanock S J, Siwik D A, Colucci W S and Clark J K (1998) Angiotensin II Induces P67phox mRNA Expression and NADPH Oxidase Superoxide Generation in Rabbit Aortic Adventitial Fibroblasts. *Hypertension* **32**: pp 331-337.

Palmer RM, Ferrige A G and Moncada S (1987a) Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* **327**: pp 524-526.

Palmer RM, Ferrige A G and Moncada S (1987b) Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* **327**: pp 524-526.

Parkinson SJ, Jovanovic A, Jovanovic S, Wagner F, Terzic A and Waldman S A (1999) Regulation of Nitric Oxide-Responsive Recombinant Soluble Guanylyl Cyclase by Calcium. *Biochemistry* **38**: pp 6441-6448.

Patterson C, Ruef J, Madamanchi N R, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger C A, Brasier A R, Bode C and Runge M S (1999) Stimulation of a Vascular Smooth Muscle Cell NAD(P)H Oxidase by Thrombin. Evidence That P47(Phox) May Participate in Forming This Oxidase in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* **274**: pp 19814-19822.

Rall TW and Sutherland E W (1958) Formation of a Cyclic Adenine Ribonucleotide by Tissue Particles. *J Biol Chem* **232**: pp 1065-1076.

Reaume AG, Elliott J L, Hoffman E K, Kowall N W, Ferrante R J, Siwek D F, Wilcox H M, Flood D G, Beal M F, Brown R H, Jr., Scott R W and Snider W D (1996) Motor Neurons in Cu/Zn Superoxide Dismutase-Deficient Mice Develop Normally but Exhibit Enhanced Cell Death After Axonal Injury. *Nat Genet* **13**: pp 43-47.

Reinhard M, Halbrugge M, Scheer U, Wiegand C, Jockusch B M and Walter U (1992) The 46/50 KDa Phosphoprotein VASP Purified From Human Platelets Is a Novel Protein Associated With Actin Filaments and Focal Contacts. *EMBO J* **11**: pp 2063-2070.

Robinson BF, Dobbs R J and Bayley S (1982) Response of Forearm Resistance Vessels to Verapamil and Sodium Nitroprusside in Normotensive and Hypertensive Men: Evidence for a Functional Abnormality of Vascular Smooth Muscle in Primary Hypertension. *Clin Sci (Lond)* **63**: pp 33-42.

Rueckschloss U, Duerschmidt N and Morawietz H (2003a) NADPH Oxidase in Endothelial Cells: Impact on Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **5**: pp 171-180.

Rueckschloss U, Duerschmidt N and Morawietz H (2003b) NADPH Oxidase in Endothelial Cells: Impact on Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **5**: pp 171-180.

Sabetkar M, Naseem K M, Tullett J M, Friebe A, Koesling D and Bruckdorfer K R (2001) Synergism Between Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in the Inhibition of Platelet Function: the Roles of Soluble Guanylyl Cyclase and Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein. *Nitric Oxide* **5**: pp 233-242.

Salvemini D and Cuzzocrea S (2002) Oxidative Stress in Septic Shock and Disseminated Intravascular Coagulation. *Free Radic Biol Med* **33**: pp 1173-1185.

Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D and Mayer B (1996a) 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**: pp 1-5.

Schrammel A, Koesling D, Gorren A C, Chevion M, Schmidt K and Mayer B (1996b) Inhibition of Purified Soluble Guanylyl Cyclase by Copper Ions. *Biochem Pharmacol* **52**: pp 1041-1045.

Schultz K, Schultz K and Schultz G (1977) Sodium Nitroprusside and Other Smooth Muscle-Relaxants Increase Cyclic GMP Levels in Rat Ductus Deferens. *Nature* **265**: pp 750-751.

## Literaturquellen

---

- Seshiah PN, Weber D S, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y and Griendling K K (2002) Angiotensin II Stimulation of NAD(P)H Oxidase Activity: Upstream Mediators. *Circ Res* **91**: pp 406-413.
- Sharma VS and Magde D (1999) Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Carbon Monoxide and Nitric Oxide: a Mechanistic Model. *Methods* **19**: pp 494-505.
- Sharma VS and Ranney H M (1978) The Dissociation of NO From Nitrosylhemoglobin. *J Biol Chem* **253**: pp 6467-6472.
- Shukla N, Thompson C C, Angelini G G, Mikhailidis D D and Jeremy J J (2004) Low Micromolar Concentrations of Copper Augment the Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation of Aortae From Diabetic Rabbits. *Metabolism* **53**: pp 1315-1321.
- Siwik DA, Pagano P J and Colucci W S (2001) Oxidative Stress Regulates Collagen Synthesis and Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: pp C53-C60.
- Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison D G, Sindermann I, Meinertz T and Munzel T (1999) Validation of Lucigenin As a Chemiluminescent Probe to Monitor Vascular Superoxide As Well As Basal Vascular Nitric Oxide Production. *Biochem Biophys Res Commun* **19**;254: pp 319-324.
- Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H and Walter U (1998) Analysis and Regulation of Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Serine 239 Phosphorylation in Vitro and in Intact Cells Using a Phosphospecific Monoclonal Antibody. *J Biol Chem* **273**: pp 20029-20035.
- Sorescu D, Somers M J, Lassegue B, Grant S, Harrison D G and Griendling K K (2001) Electron Spin Resonance Characterization of the NAD(P)H Oxidase in Vascular Smooth Muscle Cells. *Free Radic Biol Med* **30**: pp 603-612.
- Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schroeder H, Stahl E, Steinke W and Wunder F (2002) NO- and Haem-Independent Activation of Soluble Guanylyl Cyclase: Molecular Basis and Cardiovascular Implications of a New Pharmacological Principle. *Br J Pharmacol* **136**: pp 773-783.
- Stathopoulos PB, Rumfeldt J A, Scholz G A, Irani R A, Frey H E, Hallewell R A, Lepock J R and Meiering E M (2003) Cu/Zn Superoxide Dismutase Mutants Associated With Amyotrophic Lateral Sclerosis Show Enhanced Formation of Aggregates in Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: pp 7021-7026.
- Stone JR and Marletta M A (1994) Soluble Guanylate Cyclase From Bovine Lung: Activation With Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States. *Biochemistry* **33**: pp 5636-5640.
- Stone JR and Marletta M A (1995) Heme Stoichiometry of Heterodimeric Soluble Guanylate Cyclase. *Biochemistry* **34**: pp 14668-14674.
- Stone JR and Marletta M A (1998) Synergistic Activation of Soluble Guanylate Cyclase by YC-1 and Carbon Monoxide: Implications for the Role of Cleavage of the Iron-Histidine Bond During Activation by Nitric Oxide. *Chem Biol* **5**: pp 255-261.
- Sun Y (1990) Free Radicals, Antioxidant Enzymes, and Carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **8**: pp 583-599.
- Sunahara RK, Beuve A, Tesmer J J, Sprang S R, Garbers D L and Gilman A G (1998) Exchange of Substrate and Inhibitor Specificities Between Adenylyl and Guanylyl Cyclases. *J Biol Chem* **273**: pp 16332-16338.
- Sundaresan M, Yu Z X, Ferrans V J, Irani K and Finkel T (1995) Requirement for Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science* **270**: pp 296-299.

## Literaturquellen

---

Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mulsch A, Schulz E, Keaney J F, Jr., Stamler J S and Munzel T (2004) Central Role of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species in Nitroglycerin Tolerance and Cross-Tolerance. *J Clin Invest* **113**: pp 482-489.

Thannickal VJ and Fanburg B L (2000) Reactive Oxygen Species in Cell Signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: pp L1005-L1028.

Töpfer, A. Kontrolle der glattmuskulären GC-Aktivität via NO-Sensitivität, Häm-Redox-Status und Proteinexpression. 2001. Universität Gießen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Udilova, N. Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen. 1999. Humboldt Universität Berlin.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Ullrich V and Bachschmid M (2000) Superoxide As a Messenger of Endothelial Function. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: pp 1-8.

Ushio-Fukai M, Alexander R W, Akers M and Griendling K K (1998) P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Critical Component of the Redox-Sensitive Signaling Pathways Activated by Angiotensin II. Role in Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *J Biol Chem* **273**: pp 15022-15029.

Vasquez-Vivar J, Hogg N, Pritchard K A, Jr., Martasek P and Kalyanaraman B (1997) Superoxide Anion Formation From Lucigenin: an Electron Spin Resonance Spin-Trapping Study. *FEBS Lett* **403**: pp 127-130.

Wagner DA, Young V R and Tannenbaum S R (1983) Mammalian Nitrate Biosynthesis: Incorporation of  $^{15}\text{NH}_3$  into Nitrate Is Enhanced by Endotoxin Treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: pp 4518-4521.

Waldman SA and Murad F (1987) Cyclic GMP Synthesis and Function. *Pharmacol Rev* **39**: pp 163-196.

Waldmann R, Nieberding M and Walter U (1987) Vasodilator-Stimulated Protein Phosphorylation in Platelets Is Mediated by CAMP- and CGMP-Dependent Protein Kinases. *Eur J Biochem* **167**: pp 441-448.

Wambi-Kiesse CO and Katusic Z S (1999) Inhibition of Copper/Zinc Superoxide Dismutase Impairs NO.-Mediated Endothelium-Dependent Relaxations. *Am J Physiol* **276**: pp H1043-H1048.

Wang JP, Chang L C, Raung S L, Hsu M F, Huang L J and Kuo S C (2002) Inhibition of Superoxide Anion Generation by YC-1 in Rat Neutrophils Through Cyclic GMP-Dependent and -Independent Mechanisms. *Biochem Pharmacol* **63**: pp 577-585.

Wang X, Culotta V C and Klee C B (1996) Superoxide Dismutase Protects Calcineurin From Inactivation. *Nature* **383**: pp 434-437.

Warner TD, Mitchell J A, Sheng H and Murad F (1994) Effects of Cyclic GMP on Smooth Muscle Relaxation. *Adv Pharmacol* **26:171-94.**: pp 171-194.

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen J H, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch J P, Griendling K K, Harrison D G, Bohm M, Meinertz T and Munzel T (1999a) Increased NADH-Oxidase-Mediated Superoxide Production in the Early Stages of Atherosclerosis: Evidence for Involvement of the Renin-Angiotensin System. *Circulation* **20;99**: pp 2027-2033.

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen J H, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch J P, Griendling K K, Harrison D G, Bohm M, Meinertz T and Munzel T (1999b) Increased NADH-Oxidase-Mediated Superoxide Production in the Early Stages of Atherosclerosis: Evidence for Involvement of the Renin-Angiotensin System. *Circulation* **20;99**: pp 2027-2033.

## Literaturquellen

---

- Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G and Koesling D (1995) Functional Domains of Soluble Guanylyl Cyclase. *J Biol Chem* **270**: pp 24871-24875.
- Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G and Koesling 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 U S A* **91**: pp 2592-2596.
- Wegener JW and Nawrath H (1997) Differential Effects of Isoliquiritigenin and YC-1 in Rat Aortic Smooth Muscle. *Eur J Pharmacol* **323**: pp 89-91.
- Weissmann N, Voswinckel R, Tadic A, Hardebusch T, Ghofrani H A, Schermuly R T, Seeger W and Grimminger F (2000) Nitric Oxide (NO)-Dependent but Not NO-Independent Guanylate Cyclase Activation Attenuates Hypoxic Vasoconstriction in Rabbit Lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**: pp 222-227.
- Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt U N, Petersson A S and Waagstein F (1993) Metabolism and Excretion of Nitric Oxide in Humans. An Experimental and Clinical Study. *Circ Res* **73**: pp 1121-1127.
- Wink DA and Mitchell J B (1998) Chemical Biology of Nitric Oxide: Insights into Regulatory, Cytotoxic, and Cytoprotective Mechanisms of Nitric Oxide. *Free Radic Biol Med* **25**: pp 434-456.
- Winterbourn CC and Metodiewa D (1999) Reactivity of Biologically Important Thiol Compounds With Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Free Radic Biol Med* **27**: pp 322-328.
- Wolin MS (2000) Interactions of Oxidants With Vascular Signaling Systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: pp 1430-1442.
- Wolin MS and Burke T M (1987) Hydrogen Peroxide Elicits Activation of Bovine Pulmonary Arterial Soluble Guanylate Cyclase by a Mechanism Associated With Its Metabolism by Catalase. *Biochem Biophys Res Commun* **143**: pp 20-25.
- Wolin MS, Davidson C A, Kaminski P M, Fayngersh R P and Mohazzab H (1998) Oxidant--Nitric Oxide Signalling Mechanisms in Vascular Tissue. *Biochemistry (Mosc)* **63**: pp 810-816.
- Wu CC, Ko F N, Kuo S C, Lee F Y and Teng C M (1995) YC-1 Inhibited Human Platelet Aggregation Through NO-Independent Activation of Soluble Guanylate Cyclase. *Br J Pharmacol* **116**: pp 1973-1978.
- Wu L and de Champlain J (1999a) Effects of Superoxide on Signaling Pathways in Smooth Muscle Cells From Rats. *Hypertension* **34**: pp 1247-1253.
- Wu L and de Champlain J (1999b) Superoxide Anion-Induced Formation of Inositol Phosphates Involves Tyrosine Kinase Activation in Smooth Muscle Cells From Rat Mesenteric Artery. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: pp 239-243.
- Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer J E and Schmidt H H (2002) Calcium-Dependent Membrane Association Sensitizes Soluble Guanylyl Cyclase to Nitric Oxide. *Nat Cell Biol* **4**: pp 307-311.
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison D G, Taylor W R and Griendling K K (1998) Role of NADH/NADPH Oxidase-Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Angiotensin II-Induced Vascular Hypertrophy. *Hypertension* **32**: pp 488-495.
- Zagotta WN and Siegelbaum S A (1996) Structure and Function of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Annu Rev Neurosci* **19**:235-63.: pp 235-263.



## Literaturquellen

---

Zhang Y, Dawson V L and Dawson T M (2000) Oxidative Stress and Genetics in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Neurobiol Dis* **7**: pp 240-250.

Zhao Y, Brandish P E, Ballou D P and Marletta M A (1999) A Molecular Basis for Nitric Oxide Sensing by Soluble Guanylate Cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: pp 14753-14758.

Zhao Y, Brandish P E, DiValentin M, Schelvis J P, Babcock G T, Marletta M A, Olesen S P, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk J E, Busse R and Mulsch A (1998b) Inhibition of Soluble Guanylate Cyclase by ODQ

Zhao Y, Schelvis J P, Babcock G T and Marletta M A (1998a) Identification of Histidine 105 in the Beta1 Subunit of Soluble Guanylate Cyclase As the Heme Proximal Ligand. *Biochemistry* **37**: pp 4502-4509.

Zou M, Martin C and Ullrich V (1997) Tyrosine Nitration As a Mechanism of Selective Inactivation of Prostacyclin Synthase by Peroxynitrite. *Biol Chem* **378**: pp 707-713.

## VII Anhang

### 1 Verzeichnisse

#### 1.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MOLEKÜLORBITALSHEMA DES $\cdot\text{NO}$ .....	7
ABBILDUNG 2: METABOLISMUS VON $\cdot\text{NO}$ .....	8
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LÖSLICHEN GUANYLATZYKLASE.....	13
ABBILDUNG 4: BINDUNG VON $\cdot\text{NO}$ AN DAS HÄM-EISEN DER LÖSLICHEN GUANYLATZYKLASE (KOEHLING UND FRIEBE, 1999).....	14
ABBILDUNG 5: ZUSAMMENSTELLUNG HÄUFIG VERWENDETER $\cdot\text{NO}$ -DONOREN.....	17
ABBILDUNG 6: SYNTHETISCHE AKTIVATOREN UND INHIBITOREN DER SGC .....	19
ABBILDUNG 7: NO/CGMP-ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION .....	21
ABBILDUNG 8: MO-MODELL VON $\text{O}_2$ UND $\cdot\text{O}_2^-$ .....	22
ABBILDUNG 9: REAKTIONEN VON $\cdot\text{O}_2^-$ .....	23
ABBILDUNG 10: ROS-SCHEMA.....	25
ABBILDUNG 11: REAKTION VON CMH MIT $\cdot\text{O}_2^-$ .....	57
ABBILDUNG 12: AUFBAU DER ESR-MESSUNG .....	58
ABBILDUNG 13: LUCIGENIN-VERMITTELTE CHEMILUMINESZENZ (VASQUEZ-VIVAR <i>ET AL.</i> , 1997) .....	59
ABBILDUNG 14: (A) VERÄNDERUNG DES UV-VIS SPEKTRUM VON CYTOCHROM-C MIT XO (15 MU/ML) UND HYPOXANTHIN (0,2 mM) ÜBER DIE ZEIT; (B) ZEITVERLAUF DER EXTINKTIONS-ÄNDERUNG BEI 550 NM. ....	60
ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CGMP-EIA (AMERSHAM PHARMACIA BIOTEC, 1999).....	63
ABBILDUNG 16: (A) BASALE UND YC-1- (100 $\mu\text{M}$ ) STIMULIERTE SGC-AKTIVITÄT; (B) KWK MIT XO (0; 0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 1; 10 MU/ML) UND HYPOXANTHIN (0,2 mM).....	65
ABBILDUNG 17: MAXIMALE HEMMUNG DURCH XO.....	66
ABBILDUNG 18: BERECHNUNG DER $\text{IC}_{50}$ AUS ABBILDUNG 16 B. ....	66
ABBILDUNG 19: DIE AUFHEBUNG DER BASALEN (A) UND DER YC-1-STIMULIERTEN (B) SGC-AKTIVITÄTSHEMMUNG DURCH PRÄ-INKUBATION MIT SOD. ....	67
ABBILDUNG 20: REVERSIBLE HEMMUNG DER BASALEN (A) UND DER YC-1- (100 $\mu\text{M}$ ) STIMULIERTEN (B) SGC-AKTIVITÄT DURCH $\cdot\text{O}_2^-$ . ....	68
ABBILDUNG 21: BASALE UND YC-1- (100 $\mu\text{M}$ ) STIMULIERTE SGC-AKTIVITÄT MIT WASSERSTOFF-PEROXID ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 1, 10, 100 $\mu\text{M}$ ).....	68
ABBILDUNG 22: SGC-AKTIVITÄTSMESSUNGEN AN HOMOGENATEN VON VSMC UND PCA.....	69
ABBILDUNG 23: KURVENANGLEICHUNGEN DER EINGESETZTEN MENGE XO ( $\text{HX} = 0,2 \text{ mM}$ ) ZUR $\cdot\text{O}_2^-$ -BILDUNGSRATE.....	70
ABBILDUNG 24: SUPEROXID-MESSUNGEN MIT ESR-SPINTRAPPING. DMNQ PRODUZIERT DURCH INTRAZELLULÄRES REDOXYCLING $\cdot\text{O}_2^-$ (CMH = 2 mM). ....	72
ABBILDUNG 25: ESR-SPINTRAPPING VON $\cdot\text{O}_2^-$ ; PDGF AKTIVIERT MEMBRANSTÄNDIGE NADPH-OXIDASEN. ....	73

ABBILDUNG 26: SUPEROXID-MESSUNGEN MIT ESR-SPINTRAPPING; ANG II AKTIVIERT MEMBRANSTÄNDIGE NADPH-OXIDASEN.....	74
ABBILDUNG 27: LUCIGENIN-ABHÄNGIGE CHEMILUMINESZENZ-MESSUNG.....	75
ABBILDUNG 28: EXEMPLARISCHE cGMP-EICKURVE. KWK MIT cGMP-STANDARDS.....	76
ABBILDUNG 29: EINFLUSS VON DMNQ UND PDGF AUF DEN cGMP-GEHALT IN VSMC IN ANWESENHEIT VON YC-1 (100 $\mu$ M) UND SOD.....	77
ABBILDUNG 30: DIE PRODUKTION VON $\cdot\text{O}_2^-$ DURCH INTRAZELLULÄRES REDOXCYCLING (DMNQ, 10 $\mu$ M) REDUZIERT DIE YC-1- (100 $\mu$ M) STIMULIERTE VASP-PHOSPHORYLIERUNG IN ISOLIERTEN RATTENAORTEN.....	79
ABBILDUNG 31: KWK DER SUPEROXID-INDUZIERTEN HEMMUNG DER YC-1/CO- (10 $\mu$ M)/(1 mM) UND DER DEA-NO- (10 $\mu$ M) STIMULIERTEN SGC-AKTIVITÄT.....	80
ABBILDUNG 32: BERECHNUNG DER IC <sub>50</sub> AUS ABBILDUNG 31.....	80
ABBILDUNG 33: KWK MIT C-PTIO BEI BASALER, YC-1- (10 $\mu$ M), SNP- (10 $\mu$ M), GSNO <sub>2</sub> - (10 $\mu$ M) STIMULIERTER SGC-AKTIVITÄT. GEREINIGTE SGC WURDE 5 MIN MIT CARBOXY-PTIO (0/1/3/10/30 $\mu$ M) VORINKUBIERT.....	81
ABBILDUNG 34: KWK NACH VORINKUBATION MIT C-PTIO (10 $\mu$ M). ....	82
ABBILDUNG 35: BERECHNUNG DER IC <sub>50</sub> AUS ABBILDUNG 34:.....	82
ABBILDUNG 36: KWK MIT XO/HX DER HÄM-FREIEN UND DER HÄM-OXIDIERTEN SGC.....	84
ABBILDUNG 37: BERECHNUNG DER IC <sub>50</sub> AUS ABBILDUNG 36. ....	84
ABBILDUNG 38: $\cdot\text{O}_2^-$ -INDUZIERTER SULFINYL-RADIKAL-BILDUNG AM HÄMOGLOBIN.....	86
ABBILDUNG 39: (A) TRANSFEKTION VON WT $\alpha_1$ /WT $\beta_1$ , WT $\alpha_1$ / $\beta_1$ C541S UND $\alpha_1$ C238S/WT $\beta_1$ SGC IN COS1-ZELLEN UND BESTIMMUNG DER SGC-AKTIVITÄTEN DER HOMOGENATE. ....	88
ABBILDUNG 40: BASALE UND YC-1-STIMULIERTE SGC-AKTIVITÄT MIT DTT UND GSH.....	90
ABBILDUNG 41: HEMMUNG DER YC-1-STIMULIERTEN SGC-AKTIVITÄT DURCH CuSO <sub>4</sub> (3 $\mu$ M). ....	90
ABBILDUNG 42: KWK DER YC-1-STIMULIERTEN SGC-AKTIVITÄT MIT XO/HX NACH VORINKUBATION MIT CuSO <sub>4</sub> (1 $\mu$ M).....	91
ABBILDUNG 43: BERECHNUNG DER IC <sub>50</sub> AUS ABBILDUNG 42:.....	91
ABBILDUNG 44: STRUKTURFORMEL VON DMNQ.....	97
ABBILDUNG 45: SCHEMA DER OXIDATIVEN MODIFIKATION VON PROTEINTHIOLEN (THANNICKAL UND FANBURG, 2000). ....	105
ABBILDUNG 46: BASALER AKTIVITÄTSZUSTAND DER SGC. ....	107
ABBILDUNG 47: DIREKTE ( $\cdot\text{NO}$ ) UND INDIREKTE (YC-1) AKTIVIERUNG DER SGC.....	107
ABBILDUNG 48: DIE HEMMUNG DER BASALEN UND DER AKTIVIERTEN SGC DURCH $\cdot\text{O}_2^-$ . ....	108
ABBILDUNG 49: BILDUNG VON METALL-PEROXO-KOMPLEXE (ULLRICH UND BACHSCHMID, 2000). ....	110

### 1.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1:	ANTIKÖRPER.....	35
TABELLE 2:	ZELLEN.....	35
TABELLE 3:	PLASMIDE.....	36
TABELLE 4:	STAMMLÖSUNGEN.....	37
TABELLE 5:	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	38
TABELLE 6:	GERÄTE.....	39
TABELLE 7:	PUFFER FÜR ZELLEN UND GEWEBE.....	40
TABELLE 8:	HOMOGENISIERUNGSPUFFER ZUR BESTIMMUNG DER SGC-AKTIVITÄT.....	40
TABELLE 9:	PUFFER FÜR DAS IMMUNOBLOTTING.....	41
TABELLE 10:	PUFFER FÜR DIE PLASMID-PRÄPARATION.....	42
TABELLE 11:	SGC-AKTIVITÄTSPUFFER UND REAKTIONSKOMPONENTEN FÜR DIE BESTIMMUNG DER GUANYLATZYKLASE-AKTIVITÄT.....	48
TABELLE 12:	KOTRANSFEKTIONEN AUS $\alpha_1$ - UND $\beta_1$ -UNTEREINHEITEN DER SGC.....	55
TABELLE 13:	TRANSFEKTIONSMEDIUM.....	55
TABELLE 14:	$\cdot\text{O}_2^-$ -BILDNER UND -BLOCKER IM CGMP-EIA.....	62
TABELLE 15:	ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER $\text{IC}_{50}$ -WERTE UND DIE BERECHNUNG DER $\cdot\text{O}_2^-$ - BILDUNGSRATE MIT HILFE DER KURVENANGLEICHUNGEN.....	71
TABELLE 16:	TABELLARISCHE ZUSAMMENSTELLUNG VON ENZYMSYSTEMEN, DIE VON $\cdot\text{O}_2^-$ DIREKT REGULIERT WERDEN.....	102

### 1.3 Formelverzeichnis

FORMEL 1:	BERECHNUNG DER SGC-AKTIVITÄT.....	50
FORMEL 2:	RESONANZBEDINGUNG (ELEKTRONENSPINRESONANZ).....	56
FORMEL 3:	BESTIMMUNG DER $\cdot\text{O}_2^-$ -BILDUNGSRATE.....	60

### 2 **Abkürzungen**

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampere
AC	Adenylatzyklase (adenylyl cyclase)
Ang II	Angiotensin II
CAT	Katalase (catalase)
cGMP	Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate)
cGMP-EIA	cGMP-Enzym-Immuno-Assay
CO	Kohlenmonoxid
cpm	Counts per minute
Cu	Kupfer
Da	Dalton
DETC	Diethyldithiocarbamat (Chelator)
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon (intrazellulärer Redoxcycler)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat (Chelator)
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Effektkonzentration
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ESR	Elektronenspinresonanz
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
Fe	Eisen
g	(Erd-)gravitation
g	Gramm
G	Giga
G	Gauss
GSH	Glutathion (Thiol)

## Anhang

---

h	Stunde
HX	Hypoxanthin
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Inhibitionskonzentration
k	Kilo
KG	Körpergewicht
K <sub>m</sub>	Geschwindigkeitskonstante
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurven
l	Liter
L-NAG	N <sup>o</sup> -Nitro-L-Arginin, NO-Synthase-Inhibitor
log	Logarithmus
m	Meter
m	Milli
M	Molarität (Stoffmenge/Liter)
MEM	Minimum essential medium
min	Minute
mm	Millimeter
MW	Molekulargewicht
n	Nano
NADH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	optische Dichte (Absorption)
p	Piko
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Schweineaortenringe (porcine coronary artery)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived growth factor, Wachstumsfaktor aus Plättchen
pH	-log(H <sup>+</sup> )
PIX	Protoporphyrin IX
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPM	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur

## Anhang

---

s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sGC	soluble guanylyl cyclase, lösliche Guanylatzyklase
-SH	Thiol-Gruppe
SOD	Superoxiddismutase
U	Unit(s), Enzymeinheit
V	Volt
V	Volumen
v/v	Volumen-Volumen-Verhältnis (volume/volume)
VASP	Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein
V <sub>max</sub>	maximale Umsatzgeschwindigkeit
vs.	versus
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta
VSV	vesikuläre Stomatitis-Virus
W	Watt
w/v	Gewichts-Volumen-Verhältnis (weight/volume)
w/w	Gewichts-Gewichts-Verhältnis (weight/weight)
WT	Wildtyp
XO	Xanthinoxidase
YC-1	Indirekter NO-unabhängiger sGC-Aktivator (I2.2.5.2)

### 3 *Publikationen*

Teile dieser Arbeit wurden auf den folgenden Kongressen als Vortrag oder Posterpräsentation vorgestellt:

#### 3.1 **Posterpräsentationen**

Oliver Wingerter, Rashi Srivastava, Alexander Mülsch  
Inhibition of soluble Guanylyl Cyclase by Superoxide  
8. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, 2002, Frankfurt am Main

Oliver Wingerter, Rashi Srivastava, Alexander Mülsch  
Inhibition of soluble Guanylyl Cyclase by Superoxide  
1. Joint French-German NO Meeting, 9. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, 2003, Strasbourg, Frankreich

Oliver Wingerter, Rashi Srivastava, Alexander Mülsch  
Inhibition of soluble Guanylyl Cyclase by Superoxide  
9. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, 2004, Mainz, Deutschland

Oliver Wingerter, Rashi Srivastava, Alexander Mülsch  
Inhibition of soluble Guanylyl Cyclase by Superoxide  
44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 2003, Mainz, Deutschland

O. Wingerter, R. Srivastava and A. Mülsch  
Inhibition of soluble Guanylyl Cyclase by Superoxide  
4. International Conference on Peroxynitrite, 2004, Konstanz, Deutschland

#### 3.2 **Vorträge**

Oliver Wingerter, Rashi Srivastava, Alexander Mülsch  
Inhibition of soluble Guanylyl Cyclase by Superoxide  
Doktorandentagung der Deutschen pharmazeutischen Gesellschaft (DPHG), 2004, Freudenstadt-Lauterbad, Deutschland

Oliver Wingerter  
EPR detection of superoxide production in cell suspension using spin probe CMH  
International Workshop of EPR spin trapping in blood vessels, 2004, Mainz, Deutschland



### 4 *Lebenslauf*

#### Persönliche Daten

Name: Oliver Wingerter  
Anschrift: August-Keiler-Straße 10  
76726 Germersheim  
Geburtstag: 09.07.1974  
Geburtsort: Speyer  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Schule

1981 - 1985 Eduard-Orth-Grundschule Germersheim  
1985 – 1994 J. W.-Goethe Gymnasium Germersheim  
18.06.1994 Abitur am Johann Wolfgang Goethe Gymnasium Germersheim (2,2)

#### Studium

04/95 – 07/01 J. W.-Goethe Universität Frankfurt am Main, Pharmazie  
3. Staatsexamen, 2. Staatsexamen, 1. Staatsexamen  
17.07.2001 Approbation als Apotheker

#### Hochschulausbildung

08/01 – 08/04 Promotion am Institut für Kardiovaskuläre Physiologie der J. W.-  
Goethe Universität Frankfurt am Main, AG Prof. Mülsch  
Gutachter: Prof. Dr. Dr. E. Mutschler  
Prof. Dr. A. Mülsch  
09/04 – 12/04 wissenschaftlicher Angestellter am Klinikum der J.-Gutenberg  
Universität Mainz in der 2. Medizinischen Klinik

### 5 *Danksagung*

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2001 bis Juli 2004 am Zentrum der Physiologie des Universitätsklinikums Frankfurt/Main unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler und Herrn Prof. Dr. A. Mülsch durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler, der emeritierte Leiter des Instituts für Pharmakologie der Naturwissenschaften der J.-W. Goethe-Universität Frankfurt/Main, schulde ich großen Dank für die Förderung und für die Möglichkeit, diese Dissertation unter seiner Betreuung durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. A. Mülsch danke ich für die Vergabe des Themas, die Übernahme der Funktion des Zweitkorrektors, der Finanzierung dieser Arbeit und für seine große Offenheit und für sein Interesse in der wissenschaftlichen Diskussion.

Herrn Dr. Meik Helmut Behrens vom Pharmazentrum Frankfurt, meinen Kollegen Frau Birgit Fichtlscherer und Herrn Dr. Stephan Klöss danke ich für ihre stete Freundlichkeit und kompetente Beratung in allen technischen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Rashi Srivastava für ihre hervorragende Unterstützung bei der Ausführung der Zellkulturexperimente.

Natürlich danke ich auch allen meinen Kollegen im Institut für Kardiovaskuläre Physiologie

Und selbstverständlich schulde ich meinen Eltern großen Dank. Sie waren immer eine zuverlässige Unterstützung und ein Ruhepol in meinem Leben.