

Transkriptionelle Regulation der löslichen Guanylyl Zyklase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Meik Helmut Behrens
aus Wolfsburg

Frankfurt 2002
(DF1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. B. Streit

Gutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Prof. Dr. A. Mülsch

Datum der Disputation: 22. November 2002

Inhalt

I	<u>EINLEITUNG</u>	1
1	Die Guanylyl Zyklasen	1
1.1	Die löslichen Guanylyl Zyklasen	2
1.2	Die partikulären Guanylyl Zyklasen	9
2	Stickstoffmonoxid	10
3	Zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat	12
4	Angiotensin II	14
5	Endotheline	16
II	<u>AUFGABENSTELLUNG</u>	22
III	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	23
1	Material	23
1.1	Chemikalien	23
1.2	Zellkultur Medien	24
1.3	Verwendete Plasmide	25
1.4	Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme	26
1.5	Geräte	27
1.6	Lösungen und Puffer	27
1.7	Diverse Verbrauchsmaterialien	32
1.8	Computerprogramme	32
2	Methoden	33
2.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen (<i>E. coli</i>)	33
2.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i>	33
2.3	Plasmid DNA Präparation im großen Maßstab	33
2.4	Plasmid DNA Präparation zum Screening	34
2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	35
2.6	Restriktionsendonuklease-Spaltung von DNA	35
2.7	Gelelektrophorese von DNA	35
2.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	35
2.9	Ligation von DNA Fragmenten	36
2.10	Phosphatase Behandlung von gespaltener DNA	36
2.11	Präparation von Genomischer DNA	37
2.12	Gewinnung von gesamt RNA	37
2.13	PCR	38
2.14	Reverse Transkription	39
2.15	Real-Time RT-PCR (TaqMan TM)	39
2.16	Bestimmung des Transkriptionstarts	42
2.17	Klonierung von unbekanntem genomischen Bereichen	43
2.18	Sequenzierung von DNA	44
2.19	Tierspezies und Haltungsbedingungen	45
2.20	Isolation von Gefäßsegmenten der <i>A. thoracalis</i> der Ratte	45
2.21	Durchführung der Relaxationsversuche im Organbad	46

2.22	Präparation primärer glatter Muskelzellen aus Aorten	46
2.23	Kultivierung von Zellen	47
2.24	Transiente Transfektion von glatten Muskelzellen	48
2.25	Luziferase Aktivitätsbestimmung	48
2.26	Gesamtzellextrakt modifiziert nach Dignam (Dignam <i>et al.</i> , 1983)	49
2.27	Messung der Proteinmenge nach Bradford	49
2.28	sGC-Aktivitätstest	50
2.29	Primer Design	51
2.30	Statistik	51

IV ERGEBNISSE **52**

1	Bestimmung des Transkriptionstart für α_1 und β_1 sGC	52
1.1	Transkriptionstart der α_1 -Untereinheit	52
1.2	Transkriptionsstart der β_1 -Untereinheit	55
2	Genomische Sequenzen 5' der cDNA & in silico Analyse	56
2.1	Klonierung der 5' flankierenden Bereiche der α_1 sGC Untereinheit	56
2.2	Nukleotid-Sequenz & in silico Analyse des Promotors der α_1 sGC Untereinheit	62
2.3	Klonierung der 5' flankierenden Bereiche der β_1 sGC Untereinheit	69
2.4	Nukleotid Sequenz & in silico Analyse des β_1 sGC Untereinheit Promotors	71
3	Basal Aktivitäten der α_1 - und β_1 -Promotoren der Ratten-sGC	74
3.1	Basal Aktivitäten der α_1 Promotorfragmente	74
3.2	Basal Aktivitäten der β_1 Promotorfragmente	75
4	Wirkung von Endothelin-1 auf die Promotoraktivität der Ratten sGC α_1 und β_1 Untereinheiten	76
5	Einfluss extrazellulärer Signal auf die sGC-Expression	78
5.1	Wirkung von Angiotensin II	78
5.2	Wirkung von ET-1 auf die mRNA Expression der sGC Untereinheiten	79
6	Identifizierung des beteiligten ET-Rezeptors	80
7	Wirkung von ET-1 auf die NO induzierte Gefäß-Relaxation der Rattenaorta	82
7.1	SNP-induzierte Relaxation	82
7.2	Forskolin-induzierte Relaxation	83
7.3	8-Br-cGMP-induzierte Relaxation	84
8	Wirkung von ET-1 auf die NO-abhängige sGC-Aktivität	85

V DISKUSSION **88**

1	Klonierung der Promotoren und Bestimmung des Transkriptionsstarts	88
2	Identifizierung und in-silico Analyse der α_1 - und β_1 -Promotoren	89
3	Die Promotoren der α_1 - und β_1 -Untereinheit zeigen eine basale Aktivität	91
4	ET-1 erhöht die Aktivität der α_1 und β_1 Promotorkonstrukte der sGC	92
5	Die Peptidhormone Angiotensin II und Endothelin-1 erhöhen die Expression der sGC-Untereinheiten α_1 und β_1	93
6	Der ET _A -Rezeptor ist für die erhöhte Expression der sGC-Untereinheiten mRNA verantwortlich	93
7	ET-1 verstärkt die NO-induzierte Relaxation von Rattengefäßen	94
8	ET-1 erhöht die NO-induzierte cGMP-Produktion in verschiedenen Geweben	96
9	Zusammenfassung der Diskussion	96

VI LITERATURQUELLEN **99**

1	Plasmid Karten	124
2	Abbildungsverzeichnis	129
3	Tabellenverzeichnis	130
4	Abkürzungen	131
5	Lebenslauf	133
6	Publikationen	134
6.1	Vorträge	134
6.2	Posterpräsentationen	134
7	Danksagung	135

I Einleitung

Das Enzym lösliche Guanylyl Zyklase (sGC) nimmt eine Schlüsselrolle im sog. NO-/cGMP Signaltransduktionssystem in Eukaryonten ein. Im Nachfolgenden werden zunächst die molekularen Komponenten dieses Systems und ihre Funktion vorgestellt.

1 Die Guanylyl Zyklenen

Die Familie der Guanylyl Zyklenen (GC) wandelt Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches 3', 5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) um. Sie werden durch eine Vielzahl von Signalen aktiviert: z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Peptid-Liganden und Veränderungen der freien, intrazellulären Kalziumionen (Ca^{2+}) Konzentration.

cGMP beeinflusst die Zellfunktion, indem es Proteinkinasen aktiviert, Ionenkanäle modifiziert oder die Aktivität von Phosphodiesterasen verändert und somit die Konzentration von intrazellulären zyklischen Nukleotiden. cGMP ist also wie zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) ein wichtiger „second messenger“.

Nach der Entdeckung des cAMP als wichtiges Botenmolekül bei der Regulation vieler wichtiger Zellfunktionen (Rall and Sutherland, 1958), begann die Suche nach weiteren ähnlichen Botenstoffen, die zur Entdeckung von cGMP führte (Ashman *et al.*, 1963). 1969 wurde sowohl in der löslichen als auch der partikulären Fraktion von verschiedensten Zellextrakten GC-Aktivität gemessen (Schultz *et al.*, 1969; White and Aurbach, 1969; Hardman and Sutherland, 1969; Ishikawa *et al.*, 1969). Es wurde gezeigt, dass diese Aktivität auf unterschiedlich lokalisierte Enzyme zurückzuführen war (Garbers and Gray, 1974; Kimura and Murad, 1974; Kimura *et al.*, 1975). Nach ihrer subzellulären Verteilung teilte man die Enzyme in lösliche und partikuläre Guanylyl Zyklenen auf.

1.1 Die löslichen Guanylyl Zyklen

Die löslichen Guanylyl Zyklen (sGC) sind im Zytoplasma fast aller Säugetierzellen zu finden und medieren einen großen Bereich wichtiger physiologischer Prozesse, wie z.B.: die Inhibition der Plättchen Aggregation (Buechler *et al.*, 1994), die Relaxation der glatten Muskulatur (Warner *et al.*, 1994), die Vasodilatation, die neuronale Signaltransduktion und die Immunmodulation (Collier and Vallance, 1989).

Die Aufreinigung der Guanylyl Zyklen aus der löslichen Fraktion von Zellextrakten zeigte, dass die lösliche Isoform ein Heterodimer ist, bestehend aus einer α - und β - Untereinheit. Wobei die β -Untereinheit ein Molekulargewicht von ~70 kDa und die α -Untereinheit ein Gewicht von ~73 bis 82 kDa aufweist (Kamisaki *et al.*, 1986; Gerzer *et al.*, 1986). Es dauerte weitere vier Jahre, bis die sGC in reiner Form aus Rinder- bzw. Rattenlunge isoliert und ihre Primärsequenz aufgeklärt wurde (Nakane *et al.*, 1988; Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1990).

1.1.1 Isoformen und Gewebeexpression der sGC

Zur Zeit sind fünf verschiedene Untereinheiten der sGC bekannt: α_1 , α_2 , α_{2i} , β_1 und β_2 . Zur Übersicht der Gewebedistribution im Menschen und der chromosomalen Lokalisation siehe **Tabelle 1**. Für die Ratte sind bisher nur die Untereinheiten α_1 , α_2 , β_1 und β_2 beschrieben wurden. Dabei liegt die Similarität der Aminosäuren zwischen Mensch und Ratte für die α_1 -Untereinheit bei 84% (Chromosomale Lokalisation: 2q31-q33), für die α_2 bei 90%, für die β_1 -Untereinheit bei 99% (Chromosomale Lokalisation: 2q31-q33) und für die β_2 -Untereinheit bei 81% (Chromosomale Lokalisation: 5q36) (Denninger and Marletta, 1999)

Die am häufigsten exprimierten Untereinheiten sind α_1 und β_1 . Diese Untereinheiten waren es auch, die erstmals von Koesling und Nakane kloniert wurden (Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1990; Koesling *et al.*, 1990). Nur Heterodimere von α und β ergeben ein funktionelles Enzym (Harteneck *et al.*, 1991).

Tabelle 1: Gewebedistribution und Chromosomale Lokalisation der sGC Untereinheiten im Menschen.
 Modifiziert nach (Lucas *et al.*, 2000).

Untereinheit	Chromosomale Lokalisation	Gewebe Distribution
α_1 (α_3)	4q31.3-q33 (Giuli <i>et al.</i> , 1992)	Lunge (Koesling <i>et al.</i> , 1990), Cerebellum, Cerebrum, Herz, Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur (Nakane <i>et al.</i> , 1990), Niere (Ujii <i>et al.</i> , 1993)
α_2	11q21-q22 (Yu <i>et al.</i> , 1996)	Hirn, Retina (Harteneck <i>et al.</i> , 1991), Niere (Ujii <i>et al.</i> , 1993), Plazenta (Russwurm <i>et al.</i> , 1998)
α_{2i}	Spleißvariante α_2	Leber, Darm, Endothel (Behrends <i>et al.</i> , 1995)
β_1 (β_3)	4q31.3-q33 (Giuli <i>et al.</i> , 1992)	Lunge (Koesling <i>et al.</i> , 1988), Cerebellum, Cerebrum, Herz, Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur (Buechler <i>et al.</i> , 1990), Niere (Ujii <i>et al.</i> , 1993), Plazenta (Russwurm <i>et al.</i> , 1998)
β_2	13q14.3 (Behrends <i>et al.</i> , 1999)	Niere, Leber (Yuen <i>et al.</i> , 1990), Niere (Ujii <i>et al.</i> , 1993)

Die verschiedenen Untereinheiten werden Gewebe- und Entwicklungs-spezifisch exprimiert (Giuli *et al.*, 1992; Hobbs, 1997). Dadurch existieren mehrere Isoformen des heterodimeren katalytisch aktiven Holoenzym. Spezies-abhängig zeigen die α_1 -Untereinheiten Molekulargewichte von 70-82 kDa, die β_1 -Untereinheiten 70-73 kDa. Die seltenere Untereinheit α_2 (82 kDa) wurde nur in humanem fötalem Gehirn nachgewiesen (Harteneck *et al.*, 1991), während die β_2 -(sGC)-Untereinheit (76 kDa) vornehmlich in der Niere und Leber von Ratten exprimiert wird (Yuen *et al.*, 1990). Eine weitere, fünfte inhibitorische sGC-Untereinheit α_{2i} , konnte in verschiedenen humanen Zell- und Gewebeproben identifiziert werden (Behrends *et al.*, 1995). Diese dominant-negative Untereinheit besitzt aufgrund alternativen Spleißens innerhalb der humanen α_2 -mRNA ein Insert in der katalytischen Region (31 Aminosäuren), welches die Aktivität des Holoenzym blockiert (Behrends *et al.*, 1995). Durch Transfektion in COS Zellen konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um eine dominant-negative Mutation handelt, die zur Heterodimerbildung mit der β_1 -Untereinheit befähigt ist, aber kein katalytisch aktives Enzym bildet (Behrends *et al.*, 1995). Für die im Menschen beschriebene Untereinheiten α_3 und β_3 (Giuli *et al.*, 1992) wurde inzwischen gezeigt, dass diese der α_1 - bzw. β_1 -Untereinheit entsprechen (Zabel *et al.*, 1998).

1.1.2 Aktivierung durch Liganden

Jede Untereinheit der sGC kann in drei funktionelle Bereiche aufgeteilt werden: einen Häm-Bindungs-, einen Dimerisierungs- und einen katalytischen Bereich (s.a. **Abbildung 1**). Obwohl beide Untereinheiten eine katalytische Domäne besitzen, ist die Bildung eines Heterodimers in Kombination mit der Koordination der Häm-Gruppe nötig (Buechler *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1993; Nakane and Murad, 1994). Die Aktivierung scheint ein Dreischrittmechanismus zu sein. Ohne Ligand ist das Eisenatom in einem pentakoordinierten Komplex in der prosthetischen Häm-Gruppe mit vier Bindungen mit dem Porphyrin Ring und axial durch eine Bindung zur Imidazol-Gruppe des Histidin 105 der β_1 - Untereinheit verbunden (Stone and Marletta, 1994).

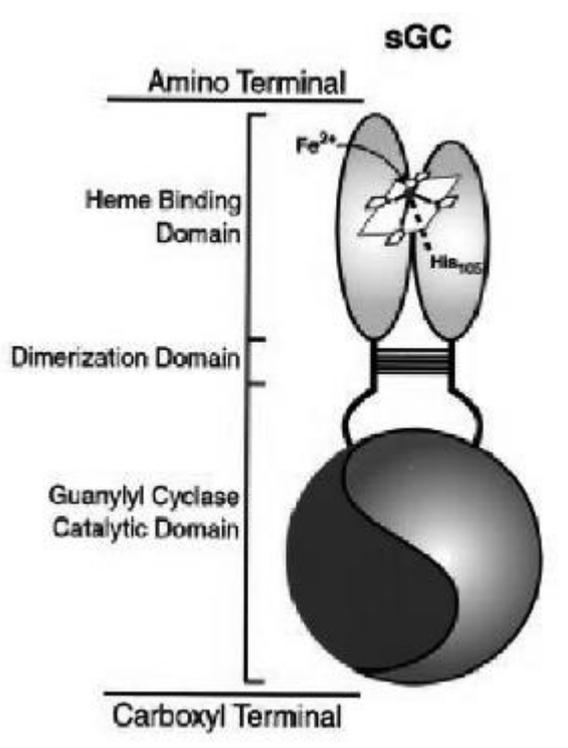


Abbildung 1: Schematische Darstellung des α_1/β_1 -Heterodimers.
Aus (Lucas *et al.*, 2000)

Bindet NO an das Eisenion, bildet sich ein Nitrosyl-Eisen-Komplex, und das Eisen wird in einen hexakoordinierten Zustand überführt. Dies ist mit einer vierfachen Stimulation der Enzymaktivität verbunden (Stone and Marletta, 1994). Kurz nach dem Binden von NO, löst sich die axiale Bindung zur Imidazol-Gruppe und das Eisenatom wird aus dem Porphyrin

Ring herausgezogen. Dies erzeugt eine weitere Steigerung der Aktivität um den Faktor 100. Insgesamt kommt es zu einer 400fachen Aktivitätssteigerung (Buechler *et al.*, 1990; Stone and Marletta, 1995). Die Lösung der Imidazolbindung scheint für eine effektive katalytische Aktivierung notwendig zu sein, denn wenn CO als Ligand bindet, kommt es zu einem hexakoordinierten Eisen-Komplex, ohne nachfolgende Trennung der axialen Koordination und zu einer maximal vierfachen Steigerung der Enzymaktivität (Brune *et al.*, 1990; Stone and Marletta, 1994).

1.1.3 Modulation der Enzymaktivität

Eine Möglichkeit der endogenen Regulation der sGC-Aktivität wäre die alternative Expression der verschiedenen Isoformen der sGC- Untereinheiten. Das Heterodimer α_1/β_1 besitzt die höchste Aktivität aller Kombinationen (Andreopoulos and Papapetropoulos, 2000). Andere Kombinationen z.B. die durch Transfektionen hergestellten α_1/β_2 und α_2/β_1 Heterodimere besitzen nur etwa ein Drittel dieser Aktivität (Andreopoulos *et al.*, 1997). Zusätzlich existiert eine Spleißvariante der humanen α_2 - Untereinheit, α_{2i} , die sich mit allen anderen β -Untereinheiten paaren kann und immer ein Heterodimer ohne Enzymaktivität erzeugt (Behrends *et al.*, 1999).

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 and Murad, 1987). Biologisch am wichtigsten ist das Metallion Magnesium²⁺ (Mg^{2+}) experimentell wird auch Mangan²⁺ (Mn^{2+}) eingesetzt. In Gegenwart von Mg^{2+} ist eine basale Aktivität der sGC messbar, die 400fach durch Ligandenbindung stimuliert werden kann. In Gegenwart von Mn^{2+} steigt die basale sGC-Aktivität stark an, gleichzeitig nimmt die Stimulierbarkeit durch Häm-Ligandenbindung stark ab (Hardman and Sutherland, 1969; Kimura *et al.*, 1976; Tsai *et al.*, 1978; Levine *et al.*, 1979; Garbers, 1979; Gerzer *et al.*, 1981; Zwiller *et al.*, 1981). Kalzium (Ca^{2+}) scheint sowohl die V_{max} als auch die K_m durch Interaktion mit den Produkten der Zyklaste, cGMP und Pyrophosphat, zu verringern, indem es die Abdissoziation aus der katalytischen Region verlangsamt (Parkinson *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren haben neben den oben erwähnten endogenen Regulatoren der sGC-Aktivität synthetische Substanzen als sGC-Aktivatoren und Inhibitoren pharmakologisches Interesse gefunden.

3-(5'-Hydroxylmethethyl-2'-Furyl)-1-Benzyl-Indazol (**YC-1**) bindet möglicherweise an zwei Cysteine (238 und 243) der α_1 -Untereinheit, aktiviert so die sGC direkt und erhöht zudem die Sensitivität gegenüber NO und CO (Friebe *et al.*, 1996; Mülsch *et al.*, 1997; Stasch *et al.*, 2001)

H-(1, 2, 4)-Oxadiazolo-(4, 3-a)-Quinoxalin-1 (**ODQ**) bewirkt eine Steigerung der K_m und eine Verringerung der V_{max} nach einem gemischten inhibitorischen Mechanismus. Momentane Hypothese ist, dass unterschiedliche zeitabhängige Wirkungsmechanismen existieren. Initial ist ODQ ein kompetitiver Inhibitor der NO-Bindung. Später, nach mehr als drei Minuten, setzt ein nicht kompetitiver Mechanismus ein, bei dem das Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert wird. Diese Oxidation ist nach 10 Minuten vollständig und irreversibel (Schrammel *et al.*, 1996). Auf einen ähnlichen Mechanismus beruht die Wirkung der Substanz **NS2028**, die die sGC inaktiviert, indem es ebenfalls das Eisen(2+) zu Eisen (3+) oxidiert (Olesen *et al.*, 1998).

Die neueste Substanz ist **BAY 41-2272**, ein Pyrazolopyridin, welches die sGC Häm-unabhängig stimuliert, indem es mit den Cysteinen 238 und 243 der α_1 Untereinheit interagiert (Stasch *et al.*, 2001).

1.1.4 Modulation in der Expression der sGC

Obwohl die sGC oft als ein konstitutiv exprimiertes Gen bezeichnet wurde, mehren sich in den letzten Jahren in der Literatur die Hinweise auch auf eine transkriptionelle oder postranskriptionelle Regulation der Zyklase. Allein die gewebespezifische Expression der Untereinheiten (Giuli *et al.*, 1992) deutet auf eine transkriptionelle Regulation hin. Ein weiterer Hinweis sind die Mengenverhältnissen der Untereinheiten in der Niere, in der veränderliche Verhältnisse zwischen α_1 und β_2 gefunden wurden (Ujji *et al.*, 1993).

Auch entwicklungsphysiologisch finden sich immer wieder Hinweise auf eine Regulation der sGC-Expression. Während in adulten Lungen von Ratten die sGC sich vor allen Dingen in der

glatten Muskulatur und Endothel findet, wird kurz vor der Geburt und bis zu einem Tag nach der Geburt ein starker Anstieg der sGC gefunden (Bloch *et al.*, 1997; Behrends *et al.*, 2001). Auch während der Hirnentwicklung wurde eine strenge räumliche und zeitliche Regulation der sGC-Untereinheiten beschrieben, wobei eine alleinige Expression der α_1 Untereinheit beschrieben wurde (Smigrodzki and Levitt, 1996). Nach Klonierung der ersten Promotoren im Medakafisch konnte mit Green Fluorescent Protein-Fusionkonstrukten eine transkriptionelle Regulation während der frühen Entwicklung der Fischembryonen nachgewiesen werden (Mikami *et al.*, 1999).

Tabelle 2: Übersicht über die Änderungen der sGC-Expression.

Regulation	Gewebe und Literaturstelle
$\uparrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	in der neonatalen Rattenlunge (Bloch <i>et al.</i> , 1997; Behrends <i>et al.</i> , 2001)
$\uparrow \alpha_1$ sGC	während der Hirnentwicklung der Ratte (Smigrodzki and Levitt, 1996)
$\uparrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	in der Aorta Nitrat-toleranter Ratten (Mülsch <i>et al.</i> , 2001)
$\uparrow \beta_1$ sGC	in den glatten Gefäßmuskelzellen von spontan hypertensiven Ratten (SHR) (Papapetropoulos <i>et al.</i> , 1994)
$\uparrow \beta_2 \downarrow \beta_1$	in der Niere von Salz-sensitiven Dahl Ratten (Andreopoulos <i>et al.</i> , 1997)
$\uparrow \beta_1$ sGC	während d. Schwangerschaft in ovinen Uterusgefäßen (Itoh <i>et al.</i> , 1998)
$\downarrow \beta_1$ sGC	in der Gefäßwand von stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) Ratten (Lopez-Farre <i>et al.</i> , 2002)
$\uparrow \beta_1$ sGC	nach Behandlung von SHRSP Ratten mit Doxazion (Lopez-Farre <i>et al.</i> , 2002)
$\uparrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	bei Hypoxie in Gefäßen der Rattenlunge (Li <i>et al.</i> , 1999)
$\uparrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	bei Hypercholesterolemie Kanninchenorta (Laber <i>et al.</i> , 2002)
$\downarrow \uparrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	während der Entwicklung des Medakafisch (Mikami <i>et al.</i> , 1999)
$\downarrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	in Aorten von SHR altersabhängig (Klöß <i>et al.</i> , 2000)
$\downarrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	nach $\text{IL-1-}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$ in der Pulmonalarterie d. Maus (Takata <i>et al.</i> , 2001)
$\downarrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	durch cAMP in fetalen Rattenlungen Fibroblasten (Shimouchi <i>et al.</i> , 1993)
$\downarrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	durch cAMP in kultivierten, glatten Muskelzellen der Rattenaorta (Papapetropoulos <i>et al.</i> , 1995)
$\downarrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	durch Nerve Growth Factor in PC12 Zellen (Liu <i>et al.</i> , 1997)
$\downarrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	durch cGMP in der glatten Gefäßmuskulatur der Ratten Pulmonalarterie (Filippov <i>et al.</i> , 1997)
$\downarrow \alpha_1/\beta_1$ sGC	durch Östrogen im Uterus von jungen Ratten (Krumenacker <i>et al.</i> , 2001)

Auch in einem Modell für Bluthochdruckerkrankungen, der spontan hypertensiven Ratte (SHR), wurde eine Verringerung der Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheiten der sGC und zudem eine Reduktion der mRNA Mengen der PKGI α in Aorten-Ringen, im Vergleich zum

normotensiven Kontroll-Rattenstamm Wistar-Kyoto gefunden. Jedoch war eine Störung der Endothel-unabhängigen Relaxation nur in älteren Tieren vorhanden (Ruetten *et al.*, 1999); (Klöß *et al.*, 2000). Zudem wurde eine Reduktion der NO (SNP) induzierten Relaxation in Verbindung mit dem Alter der Versuchstiere (Wistar-Kyoto) und Bluthochdrucktieren (SHR) bei gleichzeitiger verringerter Expression der β_1 -Untereinheit beschrieben. Auch waren beide Untereinheiten in alten Tieren in den SHR geringer exprimiert als in den Kontrolltieren, während es keinen signifikanten Unterschied bei jungen Tieren gab (Klöß *et al.*, 2000). Einen gegenteiligen Befund stellt die Beobachtung dar, dass kultivierte glatte Muskelzellen von SHR eine deutlich erhöhte SNP-induzierte cGMP Produktion und β_1 Expression im Vergleich zu Zellen von normotensiven Ratten zeigen (Papapetropoulos *et al.*, 1994).

Die sGC-Expression wurde in einem weiteren Tiermodell untersucht, den salz-sensitiven Dahl Ratten, welche bei salzreicher Diät einen Bluthochdruck entwickeln. In diesen Tieren konnte eine Hochregulation der β_2 -Untereinheit bei gleichzeitiger Reduzierung der β_1 -Untereinheit in der Niere gezeigt werden (Andreopoulos *et al.*, 1997).

Eine weitere pathophysiologische Situation, in der der NO/cGMP-Signalweg verändert ist, ist die Nitrat-Toleranz, eine Unempfindlichkeit gegenüber NO-freisetzenden Nitraten. In Untersuchungen konnte nach Nitroglycerin-induzierter Nitrat-Toleranz *in-vivo* sowohl eine erniedrigte cGMP-Akkumulation als auch eine abgeschwächte vasorelaxierende Potenz der organischen Nitrate gezeigt werden, bei gleichzeitiger verstärkter Expression der sGC-Untereinheiten (Mülsch *et al.*, 2001); (Molina *et al.*, 1987)

Zusätzlich zu den aufgezählten entwicklungsbiologischen und pathophysiologischen Veränderungen haben auch einige Substanzen Einfluss auf die Expression der sGC-Untereinheiten. Die Zytokine $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$, sowie cGMP-Analoga können die α_1 - und β_1 -Expression in Zellen der glatten Muskulatur der Pulmonalarterie der Maus reduzieren. Zum einen durch eine Aktivierung der NO-Synthase 2 (NOS2) und damit durch eine gesteigerte cGMP-Bildung, aber auch durch einen noch nicht geklärten NO-unabhängigen Weg, da auch Zellen aus NOS2-deletierten Tieren eine signifikante Verringerung der Expression zeigen (Takata *et al.*, 2001). Eine Behandlung mit der Substanz Forskolin, die die Adenylyl Zykase aktiviert, und somit den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht, verringern die mRNA- und Proteinexpression der sGC sowohl in kultivierten, fetalen Fibroblasten der Rattenlunge

(Shimouchi *et al.*, 1993), als auch in glatten Muskelzellen der Rattenaorta (Papapetropoulos *et al.*, 1995)

In Wistar-Kyoto Ratten wurde nachgewiesen, dass bei einer chronischen Herzinsuffizienz eine erhöhte sGC-Expression in der Aorta besteht, die sich durch Gabe von Vitamin E weiter steigern ließ, wobei gleichzeitig die Superoxidanionbildung reduziert wurde (Bauersachs *et al.*, 2001). Der gleiche Autor konnte in einer früheren Publikation zeigen, dass nach einem Myokardinfarkt die Expression der β_1 -Untereinheit der sGC und die NO-Synthase in Ratten erhöht ist (Bauersachs *et al.*, 1999).

Die Behandlung mit dem Hormon 17 β -Estradiol verringerte die α_1 und β_1 Expression auf mRNA- und Proteinebene im Uterusgewebe von jungen Mäusen (Krumenacker *et al.*, 2001).

In der Rattenzelllinie PC12, einer Pheochromocytoma Zelllinie, führte eine Exposition mit dem Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) zu einer verminderten mRNA- und Proteinexpression der α_1 - und β_1 - Untereinheiten, sowie zu einer verringerten NO-stimulierbaren sGC-Aktivität (Liu *et al.*, 1997)

1.2 Die partikulären Guanylyl Zyklenen

Insgesamt wurden sieben partikuläre Guanylyl Zyklenen (pGC) in Säugetieren beschrieben (s. **Tabelle 3**). Die pGC besitzen eine hochkonservierte Struktur, eine extrazelluläre Bindungsdomäne am N-Terminus, an die in einigen Fällen Liganden binden (GC-A, -B, -C), eine Transmembranregion, eine zytoplasmatische Membranregion, einen regulatorischen Bereich, welcher signifikante Homologie mit Proteinkinasen aufweist und C-terminal einen katalytischen Bereich. Aufgrund ihrer Ligandenspezifitäten wurden die pGC in folgenden Rezeptorklassen aufgeteilt: 1. naturetische Peptid Rezeptoren, 2. intestinale Peptid Rezeptoren und 3. sogenannte Orphan-Rezeptoren, d.h. Rezeptoren, für die noch kein Ligand gefunden wurde.

Tabelle 3: Die verschiedenen bekannten pGC's und deren Liganden, Kofaktoren, chromosomale Lokalisation und Expressionsmuster.

Nach (Lucas *et al.*, 2000)

Rezeptor	Ligand	Kofaktor	Chromosomen Lokalisation	Gewebeexpression
GC-A (NPR-A)	ANP, BNP	ATP	1q21-q22 (Lowe <i>et al.</i> , 1990)	Fettgewebe, Nebenniere, Ileum, Niere, Plazenta (Lowe <i>et al.</i> , 1989); Nebenniere, Cerebellum, Herz, Niere (Wilcox <i>et al.</i> , 1991); Lamina propria (Uhler, 1993); Cochlea (Furuta <i>et al.</i> , 1995); Thymus (Vollmar <i>et al.</i> , 1996); Ovarien (Jankowski <i>et al.</i> , 1997)
GC-B (NPR-B)	CNP	ATP	9p12-p21 (Lowe <i>et al.</i> , 1990)	Plazenta (Chang <i>et al.</i> , 1989); Nebenniere, Cerebellum, (Wilcox <i>et al.</i> , 1991); Nebenniere, Atrium, Cerebellum, Lunge, Verdauungstrakt, Testis, Ventrikel (Ohyama <i>et al.</i> , 1992); Uterus/Ovidukt (Chrisman <i>et al.</i> , 1993); Thymus (Vollmar <i>et al.</i> , 1996); Ovarium (Jankowski <i>et al.</i> , 1997)
GC-C	ST, Guanylin, Uroguanylin		12p12 (Mann <i>et al.</i> , 1996)	Mukosa (Li and Goy, 1993); regeneratives Lebergewebe (Laney, Jr. <i>et al.</i> , 1994)
GC-D	?		11p15,4 oder 11q13-q4,1 (Yang <i>et al.</i> , 1996)	Olfaktorisches Epithel (Fulle <i>et al.</i> , 1995)
GC-E (Ret GC-1)	?	GCAP 1,2,3	17p13,1 (Oliveira <i>et al.</i> , 1994)	Retina, Pineal Drüse (Yang <i>et al.</i> , 1995)
GC-F (Ret GC-2)	?	GCAP 2,3	Xq22 (Yang <i>et al.</i> , 1996)	Retina (Yang <i>et al.</i> , 1995)
GC-G	?		10q24-q26c (Schulz <i>et al.</i> , 1998)	Darm, Niere, Lunge, Skelettmuskel (Schulz <i>et al.</i> , 1998)

2 Stickstoffmonoxid

Schon 1977 wurde gezeigt, dass Stickstoffmonoxid (NO) als Gas, oder freigesetzt von Vasodilatoren wie Nitroglycerin und SNP, die sGC aktiviert (Schultz *et al.*, 1977; Arnold *et al.*, 1977; Miki *et al.*, 1977). Zu diesem Zeitpunkt gab es jedoch keine Hinweise auf eine endogene Produktion von NO in tierischen und menschlichen Geweben. Erst 1980 fand Furchgott, dass das Endothel eine Substanz produziert, die die Relaxation von Blutgefäßen

auslöst, der sogenannte endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980). Sechs Jahre später schlugen Furchgott und Ignarro unabhängig voneinander vor, dass es sich bei EDRF um NO handle (Moncada *et al.*, 1988). Schon ein Jahr später wurde dies bewiesen (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987). Wenig später wurde auch das Enzym entdeckt, welches NO synthetisiert, die NO Synthase (NOS) (Hevel *et al.*, 1991). Nun waren die Hauptbestandteile des Signalweges bekannt. Die NO-Synthase produziert NO, welches die sGC aktiviert und so zu einem Anstieg des cGMP führt.

Als wichtige Vorgänge, die vom NO/cGMP Signalweg beeinflusst werden, sind zu nennen: Die Relaxation der glatten Muskulatur und die Blutdruckregulation (Warner *et al.*, 1994), die Plättchen-Aggregation (Buechler *et al.*, 1994), die Neurotransmission in peripheren non-adrenergen und non-cholinergen Nerven (Jaffrey and Snyder, 1995) und als zentraler Modulator bei der Langzeit-Potentierung bzw. -Depression.

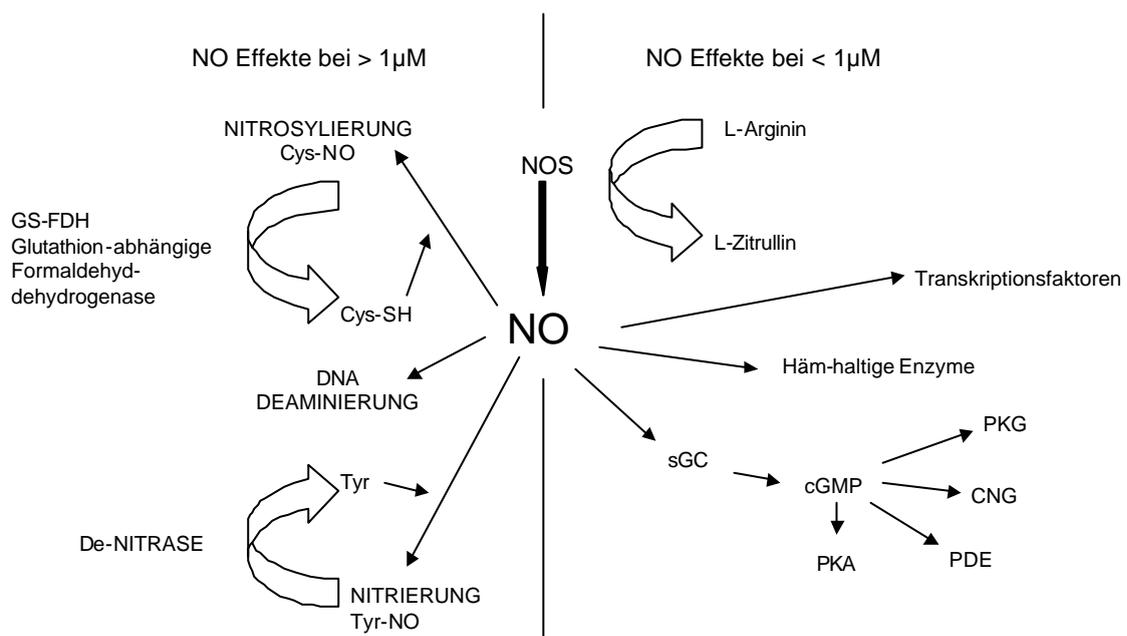


Abbildung 2: Übersicht der verschiedenen Wirkungsmechanismen von NO.

Abkürzungen: *CNG* zyklische Nukleotid regulierte Ionenkanäle, *Cys* Cystein, *PKG* cGMP-abhängige Proteinkinase, *PKA* cAMP-abhängige Proteinkinase, *PDE* Phosphodiesterase, *Tyr* Tyrosin. Nach (Hanafy *et al.*, 2001)

Neben der indirekten Wirkung über die Aktivierung der sGC kann NO auch über andere Mechanismen die Signalkaskaden der Zellen beeinflussen. So kann es direkt auf die Aktivität

von Enzymen und Transkriptionsfaktoren wirken, welche Metallionen beinhalten (Gunther *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 1998). In höheren Konzentrationen (>1 μM) kann es zu Nitrosylierungen von z.B. p21 ras (Lander *et al.*, 1995) kommen. Eine weitere Möglichkeit ist die Entstehung von Peroxinitrit (ONOO^-) durch die Reaktion von NO mit Superoxid Radikalen ($\text{O}_2^{\circ-}$), welches zu Nitrierungen führt, wie zum Beispiel der Prostazyklinsynthase (Zou *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1999). **Abbildung 2** gibt eine kurze Übersicht über die genannten Mechanismen.

3 Zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat

Wie schon erwähnt hat zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) vier Zielproteintypen, welche seine Effekte medieren: cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG), zyklische Nukleotid regulierte Ionenkanäle (CNG), cAMP-abhängige Proteinkinasen und Phosphodiesterasen (Lucas *et al.*, 2000).

Tabelle 4: Übersicht über Substrate der PKG I und die durch die Phosphorylierung hervorgerufene Effekte.

Frei nach (Hanafy *et al.*, 2001).

Substrat	Effekt der Phosphorylierung	Physiologischer Effekt
Inositol Triphosphat Rezeptor/Kanal (Raeymaekers <i>et al.</i> , 1990)	Inhibition	Verringerter zytosolischer Kalziumgehalt der zur Muskel Relaxation führt
IP3-Rezeptor-assoziiertes Protein (IRAG) (Schlossmann <i>et al.</i> , 2000)	Inhibition	Verringerter zytosolischer Kalziumgehalt der zur Muskel Relaxation führt
Phospholamban (Komalavilas and Lincoln, 1996)	Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase Aktivierung	s.o.
Vasodilator stimuliertes Protein in Plättchen (Pryzwansky <i>et al.</i> , 1995)	?	?
Vimentin in Neutrophilen (Aszodi <i>et al.</i> , 1999)	?	?
Thromboxan A2 Rezeptor in Plättchen (Wang <i>et al.</i> , 1998)	Inhibition	Verringerte Plättchenaggregation
cAMP Responce Element Binding Protein (Gudi <i>et al.</i> , 2000)	Aktivierung	Erhöhte Transkription des <i>fos</i> Genes
Myosin bindende Untereinheit der Myosin leichten Kette Phosphatase (Surks <i>et al.</i> , 1999)	Aktivierung	Erhöhte Myosin Dephosphorylierung führt zu Relaxation der glatten Muskulatur
Cystein-reiche Proteine (Huber <i>et al.</i> , 2000)	?	?

Die PKG sind Serin/Threonin Kinasen, die durch die Bindung von cGMP aktiviert werden. Es sind zwei Typen bekannt: PKG I und PKG II. Die PKG I ist ein zytosolisches 76 kDa Homodimer. Sie wird in den meisten Geweben exprimiert, besonders stark jedoch im Cerebellum, in den Blutplättchen und in der glatten Muskulatur. Zwei Isoformen der PKG I wurden beschrieben, PKG I α und PKG I β . Die meisten Gewebe, mit Ausnahme des Uterus, exprimieren beide Isoformen (Tamura *et al.*, 1996;Lohmann *et al.*, 1997). Eine Übersicht über die Wirkungen/Funktionen der PKG I ist in **Tabelle 4** gegeben. In Mäusen, in denen das Gen für die PKGI ausgeschaltet wurde, wurden vaskuläre, intestinale und erektile Dysfunktionen beschrieben (Pfeifer *et al.*, 1998;Hedlund *et al.*, 2000).

Die PKG II ist ein 86 kDa Protein, welches ebenfalls in einer großen Zahl von Geweben exprimiert wird, nicht aber im kardiovaskulären System (Uhler, 1993;Jarchau *et al.*, 1994;Lohmann *et al.*, 1997). Das einzige bekannte Zielmolekül der PKG II ist der Cystische Fibrose Transmembran Conductance Regulator (CFTR) (Vaandrager *et al.*, 1997). In Knockout-Studien in Mäusen wurden intestinale Sekretionsdefekte und Zwergwuchs beobachtet.

Die von zyklischen Nukleotiden abhängigen Ionenkanäle sind spannungsregulierte Kationen-Kanäle, die aus vier Untereinheiten bestehen, die eine spannungsmodulierende Pore in der Plasmamembran formen. Es sind fünf Isoformen der CNG bekannt (McCoy *et al.*, 1995;Frings, 1997;Misaka *et al.*, 1997;Biel *et al.*, 1999). Die Isoformen CNG 1 und CNG 3 sind an der retinalen Signalverarbeitung in den Stäbchen und Zäpfchen beteiligt.

Obwohl die cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA) nicht ein klassisches Ziel des cGMP sind, kann es diese aktivieren. Die für die Bindung der zyklischen Nukleotide verantwortlichen Regionen sind bei der PKG und der PKA sehr ähnlich. Dennoch ist die Aktivierung der PKA durch cGMP um den Faktor 50 weniger selektiv (Lohmann *et al.*, 1997;Pfeifer *et al.*, 1999).

Die Phosphodiesterasen (PDE) sind die letzte Gruppe der cGMP aktivierten Signalmoleküle. Diese Enzyme katalysieren die Umsetzung von cAMP oder cGMP zu 5'-AMP oder 5'-GMP, die keine biologische Aktivität besitzen. Insgesamt wurden fünf Familien von PDE's beschrieben: die Kalzium/Calmodulin-abhängigen (PDE I), die cGMP stimulierten (PDE II), die durch cGMP inhibierten (PDE III), die cAMP spezifischen (PDE IV) und die cGMP spezifischen (PDE V) (Schmidt *et al.*, 1993;Sonnenburg and Beavo, 1994;Pfeifer *et al.*,

1999). Besonders hervorzuheben ist die cGMP-spezifische PDE V, welche von zentraler Bedeutung für die Signalweitergabe in den Stäbchen und Zäpfchen ist.

4 Angiotensin II

Angiotensin II (AngII), ein Octapeptid, ist der Hauptmediator des Renin-Angiotensin Systems (RAS). Der Hauptsyntheseweg für AngII ist in **Abbildung 3** skizziert. Renin katalysiert die Umwandlung von Angiotensinogen zu dem Decapeptid Angiotensin I, welches anschließend vom Angiotensin konvertierenden Enzym (angiotensin converting enzyme, ACE) hydrolysiert und in AngII umwandelt wird. Weitere mögliche Synthesewege sind die direkte Umwandlung von Angiotensinogen in AngII durch den Gewebe Plasminogen Aktivator (tissue plasminogen activator), Cathepsin G und Tonin oder durch die Hydrolyse von AngI durch Chymase und Cathepsin G (Johnston and Risvanis, 1997).

Im humanen System wurden zwei Hauptrezeptortypen für AngII charakterisiert: der Angiotensin II-Rezeptor Typ1 (AT₁) und der Angiotensin II-Rezeptor Typ2 (AT₂). Beide Rezeptortypen sind an ein Guanosintriphosphat bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt (Timmermans *et al.*, 1993; de Gasparo *et al.*, 2000).

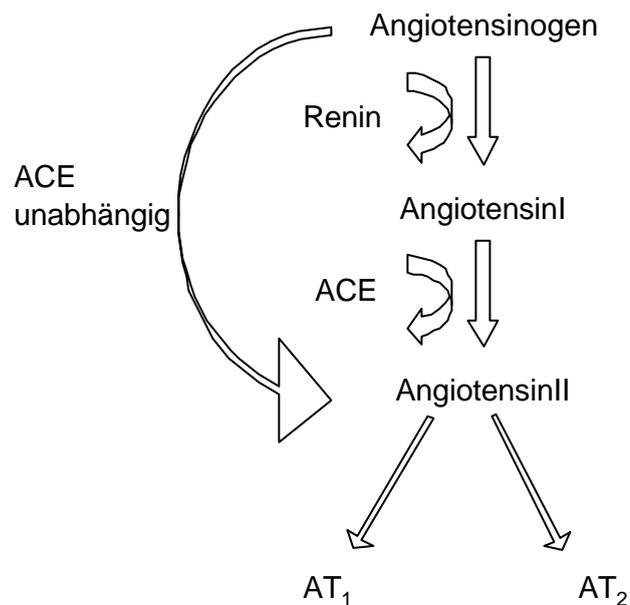


Abbildung 3: Synthesewege von Angiotensin II.

Abkürzungen: ACE Angiotensin converting enzyme, AT₁; AT₂ Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 bzw. Typ 2.

Der AT₂-Rezeptor scheint eine dem AT₁-Rezeptor entgegengesetzte Funktion zu haben. Seine Expression wird nach Herzversagen, bei der Regeneration nach Infarkt und bei Läsionen der Haut bzw. des Nervensystems deutlich erhöht (Nio *et al.*, 1995; Unger *et al.*, 1996; Lucius *et al.*, 1998; Lucius *et al.*, 1999). Der AT₂-Rezeptor ist somit in der Kontrolle der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Entwicklung, der Angiogenese, der Wundheilung, der Geweberegeneration und der Apoptose beteiligt (s.a. **Tabelle 5**). Dies sind biologische Prozesse, die den trophischen Effekten, die durch den AT₁-Rezeptor vermittelt werden, entgegenwirken (Kimura *et al.*, 1992; Stoll *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1995; Unger *et al.*, 1996; Unger *et al.*, 1998; de Gasparo *et al.*, 2000)

Tabelle 5: Übersicht der verschiedenen Wirkungen der AngII Rezeptortypen.
Nach (Unger, 2002).

AT ₁ -Rezeptor	AT ₂ -Rezeptor
Vasokonstriktion	Inhibition von Zellwachstum/ Proliferation
Aldesteron Synthese & Sekretion	Vasodilatation
Natrium Reabsorption	Modulation der extrazellulären Matrix
Erhöhte Vasopressin Sekretion	(neuronale) Regeneration
Verringerter Blutfluss in der Niere	Zelldifferenzierung
Herz Hypertrophie	Apoptose
Herz Kontraktilität	Fötale Gewebeentwicklung
Proliferation der vaskulären glatten Muskulatur	
Extrazelluläre Matrix Bildung	
Zentrale Osmokontrolle	
Verringerung der peripheren noradrenergen Aktivität	
Modulation der Aktivität des zentralen sympathischen Nervensystems	

AngII beeinflusst den Blutdruck, die Osmoregulation, die Natrium-Reabsorption in der Niere und die Sekretion von Aldesteron und Vasopressin (Unger, 2002). Darüber hinaus spielt AngII eine Rolle in der Regulation der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur (Carini *et al.*, 1988), Kardiomyozyten (Stoll *et al.*, 1990) und der koronaren Endothelzellen (Stoll *et al.*, 1995; Lucius *et al.*, 1999). AngII ist also ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von diversen Erkrankungen der Niere, des Hirn und des kardiovaskulären Systems. Dabei werden die oben genannten Effekte durch den AT₁-Rezeptor mediiert (s.a. **Tabelle 5**).

5 Endotheline

Endothelin (ET) wurde erstmals 1988 in kultivierten Schweineaortenendothelzellen isoliert (Yanagisawa *et al.*, 1988). Zuvor wurde schon ein aus dem Endothel stammender vasokonstriktiver Faktor postuliert (Hickey *et al.*, 1985). Endotheline sind Peptide aus 21 Aminosäure mit einem hydrophoben C-Terminus und 2 Cystein-Brücken am N-Terminus. Drei verwandte Peptide, die sich nur durch 2 bzw. 6 Aminosäuren unterscheiden sind ET-1, ET-2 und ET-3 (Inoue *et al.*, 1989). Alle drei Peptide leiten sich jeweils von zwei Vorläuferformen ab. Prepro-Endotheline, ca. 200 Aminosäuren lange Peptide, werden durch eine Furin ähnliche Protease geschnitten und so das zweite, biologisch inaktive Vorläufermolekül erzeugt, die großen Endotheline (big ET's) mit einer Länge von 37-41 Aminosäuren. Diese werden durch eine Gruppe von membran-gebundenen Zink Metalloproteasen, die der Neprilyn-Familie der Proteasen zugehörig sind, in die reifen, biologisch aktiven Peptide überführt (Inoue *et al.*, 1989). Diese Proteasen werden Endothelin konvertierendes Enzym (Endothelin converting enzyme, ECE) genannt. Neben den beschriebenen Enzymen ECE-1 und ECE-2 muss es noch eine weitere, dritte, noch unbekannte Protease geben, die bigET zu ET spalten kann, da in ECE-defizienten Mäusen eine ausreichende Menge von reifem ET gefunden wird (Yanagisawa *et al.*, 2000). Zur Übersicht siehe auch **Abbildung 4**.

In Säugetieren sind zwei Rezeptoren für Endotheline beschrieben worden: ET_A und ET_B (Yanagisawa *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). Beide sind „klassische“ G-Protein gekoppelte Rezeptoren, mit sieben transmembranären Domänen, die sich überlappende Typen von G-Proteinen aktivieren, wobei der ET_A-Rezeptor am häufigsten mit G_q, G_s und ET_B mit G_i, G_q gekoppelt ist (s.a. **Abbildung 4**). Der ET_A-Rezeptor besitzt eine subnanomolare Affinität für ET-1 und ET-2 und eine ca. 100fach geringere Affinität für ET-3. Der ET_B-Rezeptor hingegen besitzt für alle Endothelin Peptide eine ähnliche Affinität im subnanomolaren Bereich. Eine Besonderheit des ET_B-Rezeptors ist, dass vermutet wird, dass er als Clearance-Rezeptor fungiert. Nach Blockade des ET_B-Rezeptors mit dem spezifischen Antagonisten BQ788 wurde eine verringerte Aufnahme von radioaktivem, intravenös verabreichten ET-1 in Lunge und Niere und somit eine geringere Klärung vom kardiovaskulären System beobachtet (Fukuroda *et al.*, 1994).

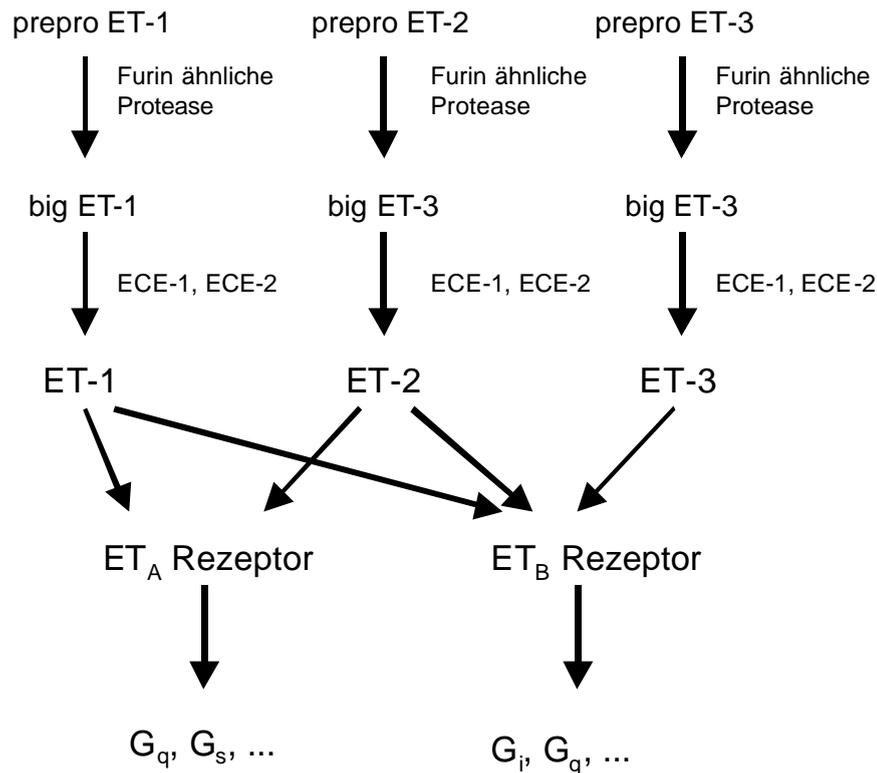


Abbildung 4: Schema der Endothelinsynthese und Rezeptorbindungen.

Abkürzungen: *ET-1* Endothelin-1, *ECE* Endothelin converting enzyme, *ET_A*, *ET_B* Endothelin-Rezeptor Typ A bzw. Typ B. Nach (Kedzierski and Yanagisawa, 2001).

In **Tabelle 6** ist eine Übersicht über die Expression der beiden Rezeptoren (*ET_A* und *ET_B*) und *ET-1* aufgeführt. Dabei sind die Endothelzellen *in-vivo* die hauptsächliche Quelle für *ET-1*. *ET-2* und *ET-3* werden von den Epithelzellen des Intestinaltraktes produziert und *ET-3* darüber hinaus von Neuronen und von den Epithelzellen der Nierentubuli.

Die Endotheline können nicht als zirkulierende Hormone bezeichnet werden, denn die Plasmakonzentrationen von z.B. *ET-1* liegen bei ca. 1 pM, einer Konzentration, die etwa ein Hundertstel unter der Konzentration liegt, die für eine pharmakologische Wirkung nötig ist. Die Mengen von zirkulierendem *ET-2* und *ET-3* sind noch deutlich geringer (Battistini *et al.*, 1993) . Endotheline sind also als autokrine und parakrine Faktoren zu betrachten.

Über die Regulation der Endotheline ist wenig bekannt. Da jedoch viele Endothelinproduzierende Zellen keine Vorratsvesikel oder regulierte Sekretionswege besitzen, findet die Regulation auf Ebene der Synthese statt (Kedzierski and Yanagisawa, 2001). In einer Vielzahl von Zellen wird die *ET-1* mRNA durch TGF- β , TNF- α , Interleukine, Insulin, Noradrenalin, Angiotensin II und Thrombin hochreguliert (Yanagisawa *et al.*, 1988;Kurihara *et al.*,

1989;Emori *et al.*, 1992). In den Endothelzellen des Gefäßsystems wirken Dehnung und Schubspannung biphasisch, die ET-1 mRNA wird zuerst induziert und anschließend reduziert. Ebenso reduzierend auf die ET-1 mRNA-Expression in den Endothelzellen wirken NO, Prostazykline und ANF (Boulanger and Luscher, 1990);(Kohno *et al.*, 1992); (Prins *et al.*, 1994).

Tabelle 6: Übersicht der Gewebeexpression von ET-1 und der beiden Rezeptortypen (ET_A und ET_B).
Nach (Kedzierski and Yanagisawa, 2001)

	ET-1	ET _A	ET _B
Endothelzellen	+	-	+
Glatte Muskelzellen	-	+	+
Kardiomyozyten	+	+	+
Hepatozyten	+	+	+
Sammelrohr der Niere	+	-	+
Neurone	+	+	+
Osteoblasten	-	+	+
Keratinocyten	+	+	+
Adipozyten	-	+	+

Im Gefäßsystem wird nur ET-1 produziert. Die lokale ET-1 Konzentration in den Gefäßwänden ist dabei mehr als 100fach höher als im Plasma (Yanagisawa *et al.*, 1988;Tonnessen *et al.*, 1998), da die Endothelzellen ca. 80% des ET-1 in Richtung der glatten Muskelzellen sezernieren (Wagner *et al.*, 1992;Howard *et al.*, 1992). Neben den Endothelzellen können auch Gefäßmuskelzellen während Entzündungsprozessen ET-1 erzeugen. Es interagiert mit dem ET_A-Rezeptor auf den glatten Muskelzellen und mit dem ET_B-Rezeptoren der Endothelzellen und einiger Muskelzellen (Yanagisawa *et al.*, 1990;Sakurai *et al.*, 1990;Batra *et al.*, 1993), wobei sich die Verteilung der Rezeptoren von Gefäß zu Gefäß unterscheidet. So ist das Verhältnis ET_A : ET_B in Venen geringer als in Arterien (Lipa *et al.*, 1999).

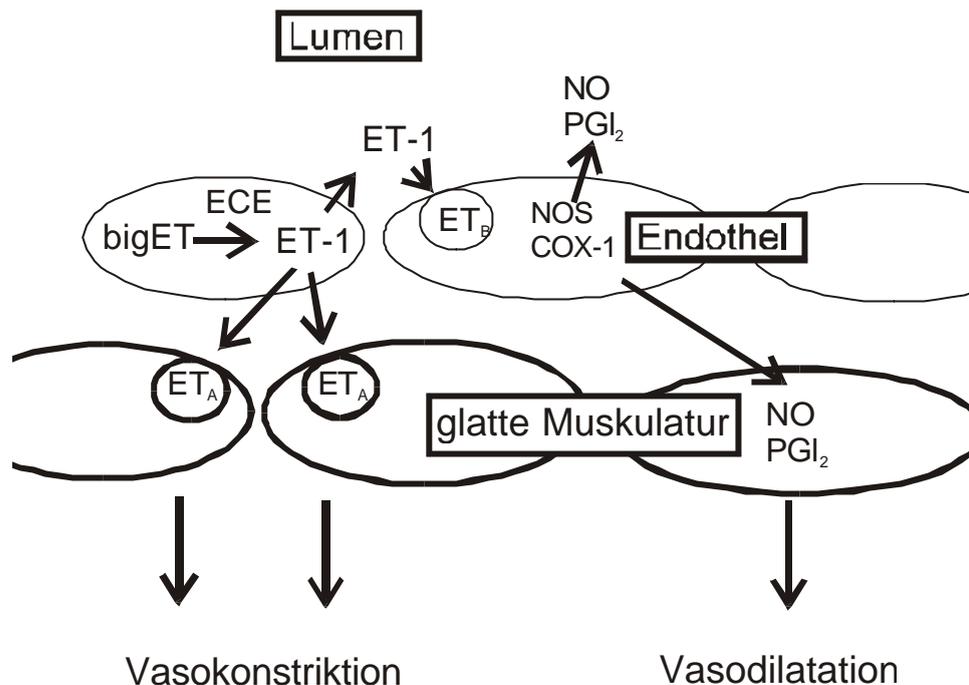


Abbildung 5: Übersicht über die Signalkaskaden ET-1 im Gefäßsystem.

Abkürzungen: *ET-1* Endothelin-1, *ECE* Endothelin converting enzyme, *ET_A*, *ET_B* Endothelin-Rezeptor Typ A bzw. Typ B, *NO* Stickstoffmonoxid, *NOS* NO-Synthase, *COX-1* Zyκλο-Oxygenase-1, *PGI₂* Prostazyklin.

Intravenöse Gabe von ET-1 führt zu einer kurzfristigen Erniedrigung des vaskulären Widerstandes (einige Minuten), anschließend folgt eine Vasokonstriktion, die bis zu einer Stunde anhalten kann (Wright and Fozard, 1988). Die Vasorelaxation wird indirekt über die ET_B-Rezeptoren der Endothelzellen vermittelt, die nach Bindung von ET-1 NO und Prostazyklin ausschütten (s.a. **Abbildung 5**).

Die Vasokonstriktion erfolgt über die Aktivierung des ET_A-Rezeptors der glatten Muskelzellen, wie durch die Gabe von spezifischen Antagonisten gezeigt wurde (Bird *et al.*, 1993; Haynes and Webb, 1994). Mäuse, in deren Endothelzellen spezifisch der ET_A-Rezeptor ausgeknockt wurde, zeigen einen um ca. 15 mm Hg reduzierten Blutdruck (Kisanuki *et al.*, 1999). Verwirrenderweise haben Bluthochdruck-Patienten keine pharmakologisch aktive Plasmakonzentration von ET-1 (Battistini *et al.*, 1993; Luscher *et al.*, 1993). Dies zusammen mit der Beobachtung, dass Patienten mit erhöhtem Blutdruck und Nierenversagen oder vaskulären Erkrankungen eine etwa 10fach erhöhte ET-1 Plasmakonzentration haben, deutet auf eine **lokal** gestörte Produktion und/oder Clearance von ET-1 hin (Battistini *et al.*, 1993).

Auch bei der Pathogenese der Atherosklerose spielt ET-1 eine Rolle. Hier sezernieren Endothelzellen und Makrophagen ET-1, welches ET_A-Rezeptoren auf Makrophagen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten aktiviert. Es hat mitogene Effekte auf die glatten Muskelzellen und Fibroblasten und stimuliert Entzündungsmediatoren in Makrophagen, sowie Fibronektin-Bildung in der glatten Muskulatur (MacNulty *et al.*, 1990;Hahn *et al.*, 1993;Fujitani *et al.*, 1995;MacNulty *et al.*, 1997).

Knockout-Experimente in Mäusen haben deutlich gezeigt, welche wichtige Rolle das Endothelinsystem in der Entwicklung spielt. ET-1, ET_A-Rezeptor und ECE-1 werden für die richtige Entwicklung und Musterbildung der craniofacialen Strukturen und der Herzgefäße benötigt (Kurihara *et al.*, 1994;Yanagisawa *et al.*, 1998;Clouthier *et al.*, 1998). ET-1 und ET_A-Rezeptor Knockout Mäuse sterben bei der Geburt durch mechanische Verletzungen, hervorgerufen von den schweren Missbildungen der Gesichts- und Halsstrukturen. Zu diesen Missbildungen kommen noch schwere Defekte in der Entwicklung der Arterien. So fehlt die rechte Arterie subclavia, es sind Unterbrechungen in der Aorta und im rechten Aortenbogen zu finden (Kurihara *et al.*, 1995;Yanagisawa *et al.*, 1998;Clouthier *et al.*, 1998). ET-3, ET_B und ECE-1 sind notwendig für die korrekte Entwicklung der aus dem Neuralrohr stammenden epidermalen Melanozyten und enterischen Neuronen (Baynash *et al.*, 1994;Hosoda *et al.*, 1994;Yanagisawa *et al.*, 1998). ECE-1 defiziente Tiere sterben schon pränatal, sie zeigen den Phänotyp der ET-1/ETA und ET-3/ETB defizienten Tiere. Neben einer Pigmentierungsstörung der Haut und des Fells führt der Verlust der enterischen Neuronen zu einer Dilatation des proximalen Darms und so zur intestinalen Dysfunktion und damit schließlich zum Tod (Baynash *et al.*, 1994;Hosoda *et al.*, 1994;Yanagisawa *et al.*, 1998). Im Menschen wird die Hirschsprung Erkrankung durch Mutationen in den Genen für den ET_B-Rezeptor und ET-3 hervorgerufen (Garipey, 2001) (Chakravarti, 1996;Edery *et al.*, 1996). Für eine Übersicht s. auch **Tabelle 8**.

Darüber hinaus beeinflussen Endotheline im Herz die Ionotropie, Chronotropie und medieren Umbauprozesse im Stauungs-Herzversagen. In den Lungen regulieren sie den Tonus der pulmonaren Luftwege und Gefäße. Auch sind sie an der Entwicklung des pulmonalen Bluthochdruck beteiligt. In der Niere kontrollieren sie die Exkretion von Wasser und Salz, das Säure-Base Gleichgewicht und sind an der Pathophysiologie des akuten und chronischen Nierenversagens beteiligt. Einen Überblick über die verschiedenen Endothelin-Wirkungen gibt **Tabelle 8**.

Tabelle 8: Übersicht der Funktionen des Endothelinsystems in verschiedenen Geweben.
 Nach (Kedzierski and Yanagisawa, 2001)

Funktion(en)	beteiligte Endothelin Komponenten
Positive Effekte	
in der embryonalen und neonatalen Entwicklung von:	
Hirn- und Herzvorläuferzellen	ET-1, ECE-1, ET _A
Enterischen Neuronen und Hautmelanozyten	ET-3, ECE-1, ET _B
Neonatalen Wachstum & intestinalen Funktionen	ET-2, ECE-1 (?), ET _A & ET _B (?)
in der renalen Homeostase	
Salz Haushalt	ET-1, ECE-1 (?), ET _B
Säure-Base Haushalt	ET-1, ECE-1 (?), ET _B
Regulation des basalen Gefäßtonus	ET-1, ECE1(?), meistens ET _A
Herz Gewebsregeneration nach akuter Ischämie	ET-1, ECE-1(?), meistens ET _A
Zentrale Atmungs-Regulation	meistens ET-1, ECE-1 & ECE-2(?), meistens ET _A
Negative Effekte	
Pathophysiologisch erhöhter Blutdruck	ET-1, meistens ECE-1, meistens ET _A
Chronische Geweschädigung- Umbau, Entzündungsantwort	ET-1, meistens ECE-1, ET _A & ET _B

II Aufgabenstellung

Die Erkrankungen des Herzkreislaufsystems sind eine der am häufigsten auftretenden Erkrankungen in den heutigen Industriestaaten. Zunehmend wird bei den Forschungen an den zugrundeliegenden biologischen Mechanismen neben den Dysfunktionen des Endothels auch die Dysfunktion der glatten Gefäßmuskulatur als wichtige Ursache oder Konsequenz dieser Erkrankungen gesehen.

Dabei ist der NO/cGMP Signalweg einer der vermutlich bedeutenden Mechanismen, die am Geschehen dieser Krankheiten beteiligt ist. Die lösliche Guanylyl Zykase (sGC) ist eines der zentralen Enzyme in dieser Signalkaskade, dennoch ist nicht viel über die Regulation dieses Proteins bekannt. Ziel dieser Arbeit soll es sein, den Einfluss von endogenen vasoaktiven Substanzen, die auch bei pathophysiologischen Situationen eine Rolle spielen, auf die Expression und NO-induzierte Aktivität der löslichen Guanylyl Zykase zu untersuchen.

Für die Untersuchungen der Expression auf Ebene der Transkription soll die mögliche Änderung des mRNA-Gehalts der α_1 - und β_1 - Untereinheiten, die im Kardiovaskulären System am wichtigsten Untereinheiten der heterodimeren sGC, mittels RT-PCR bestimmt werden. Darüber hinaus sollen die Promotoren der α_1 - und β_1 - Untereinheiten kloniert und deren basale Aktivität und Induzierbarkeit in kultivierten, glatten Muskelzellen der Ratte untersucht werden.

Für die Bestimmung der NO-stimulierbaren Enzymaktivität wird ein *in-vitro* Essay System verwendet, in dem neben kultivierten glatten Muskelzellen auch Rattenaorten und Koronargefäße des Schweins verwendet werden sollen, um ein mehr *in-vivo* nahes Modell-System zu verwenden.

In isometrischen Kontraktionsmessungen mit Segmenten der thorakalen Rattenaorta soll zudem untersucht werden, inwieweit sich Effekte auf die sGC Expression oder Enzymaktivität auf die NO-induzierte Relaxation von vorkontrahierten Gefäßen auswirken.

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, sofern sie hier nicht extra aufgeführt sind, wurden in p.a. Qualität von den Firmen: Sigma (Steinheim), Boehringer (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Aventis (Frankfurt a.M.) bezogen.

Die Bezugsquellen für die Substanzen waren:

Benzamidin, Bovines γ -Globulin, Diclofenac, Diethylenetriaminepentaacetic Acid, Dithiothreitol, Ethylen Glykol-bis (beta-Aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraacetic Acid, Gluthation, Guanosintriphsphat, zyklisches Guanosinmonophosphat, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin, Kreatin-Phosphat, Leupeptin, N-Nitro-L-Arginin Methyl Ester, N^G-Nitro-L-Arginin, Phenylephrin, Natriumnitroprussid, Sucrose von Sigma (Deisenhofen)

Calciumchlorid-Dihydrat, Ca-EDTA, Ca-Titriplex, Glucose, Kaliumchlorid, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumnitrit, Zinkacetat von Merck (Darmstadt)

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES), Tween 20 von Serva (Heidelberg)

Magnesium-Heptahydrat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Natriumchlorid von AppliChem (Darmstadt)

Glycopherol/Cremophor RH40, S973448 von Aventis (Frankfurt a.M.)

Ketamin (Exalgon 1000[®]) von Rhône Merieux (Laupheim)

Xylazin (Rompun TS[®]) von Bayer (Leverkusen)

Dimethylsulfoxid von Fluka (Neu-Ulm)

[α -³²P]-GTP von Dupont (Dreieich)

Heparin-Natrium (Liquemin N 25.000[®]) von Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen)

Kreatin-Phosphokinase von Boehringer (Mannheim)

Tris von United States Biochemical (Cleveland, Ohio, USA)

DNAzol[®], Molecular Research Center, Inc. (Cincinnati, Ohio, USA)

Effectene[™] von QIAGEN (Hilden)

1.2 Zellkultur Medien

Lösung	Firma
Minimal Essential Medium	Gibco BRL
Dulbecco's MEM	s.o.
Trypsin-EDTA	s.o.
Einfriermedium	s.o.
Pferdeserum	s.o.
Penicillin-Streptomycin	s.o.
PBS	s.o.
Fötales Kälberserum	PAN Systems

1.3 Verwendete Plasmide

Der Vektor **Bluescript[®] II SK⁺** (**pBSSK⁺**, von Stratagene) ist eine pBR322-Derivat und wurde durch Einbau der T3 und T7-Promotoren, welche die Herstellung von *in-vitro* Transkripten erlauben, in die pUC19-„Polylinker“-Region, sowie eine im Gegensatz zu pUC-Vektoren erweiterte multiple Klonierungsstelle erhalten. Ferner ermöglicht eine intragene M13-Sequenz die Isolierung einzelsträngiger DNA mit Hilfe eines Helferphagen. Der Leserahmen des β -Galaktosidase-Gens wurde bei der Konstruktion des Vektor erhalten, daher können nicht rekombinante von rekombinanten Klonen in Gegenwart von X-Gal und IPTG durch Blaufärbung unterschieden werden.

Der Vektor **pCRII** (von Invitrogen) dient der Klonierung und anschließender Sequenzierung von PCR-Produkten. Er besitzt Sp6- und T7-Promotoren, welche die Herstellung von *in-vitro* Transkripten erlauben und eine multiple Klonierungsstelle. Ferner dienen zwei M13-Sequenzen als Startstelle für die Sequenzierung. Der Leserahmen des β -Galaktosidase-Gens wurde bei der Konstruktion des Vektor erhalten, daher können nicht rekombinante von rekombinanten Klonen in Gegenwart von X-Gal und IPTG durch Blaufärbung unterschieden werden.

Der Vektor **pGL3-Basic** (Promega) ist ein Reporter-Vektor zur Expression eines Reporterproteins in eukaryontischen Zellen. Er besitzt neben den üblichen Eigenschaften eines Vektor (Ampicillin Resistenz, prokaryotischen Replikationsstart, multiple Klonierungsstelle) keine eukaryotischen Promotor und Enhancer Sequenzen. Zusätzlich besitzt er das Gen für die Firefly (*Photinus pyralis*) Luziferase (Reporter-Gen), davor ein künstliches Poly(A) Signal zur Reduktion eines möglichen Hintergrundrauschens und für die korrekte Translation das Poly(A)-Signal des *Simian Virus 40*. GeneBank[®]/EMBL Sequenz Zugangsnummer: U47295

Der Vektor **pRL-TK** (Promega) dient als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz. Er enthält das Luziferasegen des marinen Organismus *Renilla reniformis* unter Kontrolle des Herpes simplex Thymidin Kinase Promotors, welcher moderate, konstitutive Expression der Renilla Luziferase in eukaryotischen Zellen erzeugt. Zusätzlich enthält er eine Ampicillin Resistenz, prokaryotischen Replikationsstart, multiple Klonierungsstelle und für die korrekte

Translation des Poly(A)-Signal des SV40. GeneBank®/EMBL Sequenz Zugangsnummer: AF025846

1.4 Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Zur Klonierung und Amplifikation von DNA wurde folgender *Escherichia coli* Stamm verwendet:

DH5 α (*supE44 lacU169 [F80lacZM15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)
(Raleigh *et al.*, 1989)

Die Mutation im Gen *hsdR* verhindert Methylierungsreaktionen an Fremd-DNA. "Amber"-Mutationen werden durch den von *supE* kodierten Suppressor supprimiert. Dieser baut bei UAG Codons die Aminosäure Glutamin ein. Die Mutation *F80lacZM15* ermöglicht eine α -Komplementation mit dem Aminoterminus der β -Galactosidase. Das *endA*-Gen kodiert für die Endonuklease I, *gyrA* für eine Untereinheit der DNA-Gyrase. Die Mutation im *thi-1* Gen charakterisiert einen Defekt des Thiaminstoffwechsels und *relA* bezeichnet ein Gen der Regulation der RNA-Synthese. Eine Mutation im *recA*-Gen hat einen Ausfall der genetischen Rekombination zur Folge.

1.5 Geräte

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung	Firma
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge Fresco	Hereaus
Inkubator (Zellkultur)	CO ₂ Water Jacketed Incubator	Heraeus
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus
Autoklav	Varioklav	Varioklav
Wasserbad	-	Köttermann
Spektrometer	GeneQuant	
Transferkammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Transferkammer (Halbtrocken-System)	Trans-Blot SD	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Mini Protean II Cell	Bio-Rad
Orbital-Schüttler	Unimax 2010	Heidolph
Expositionskammer	Dr. Goose Suprema Universal 100	-
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Ind.
Luminometer	Autoluminat LB953	EG & G Berthold
Fluoreszenzmikroskop		Leitz
Homogenisator	Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik
Cycler	PE 9700	Perkin Elmer
Real-Time Cycler	ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Sequenzier	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Bakterien Inkubator	Function Line	Hereaus
Bakterienschüttler	Unitron	Infors
Geldokumentationanlage	GelDoc® 1000	BioRad

1.6 Lösungen und Puffer

1.6.1 Zellextrakte

Lysispuffer:	20 mM	Hepes KOH pH 7,5
(Gesamtzellextrakte)	350 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	EDTA pH 8,0
	0,1 mM	EGTA pH 8,0
	20 %	Glycerin
	1 %	NP40

Puffer D (Ausgleichspuffer):

20 mM	Hepes pH 7,9
20% (v/v)	Glycerin
0,2 mM	EDTA
0,25% (v/v)	Nonidet P40

Protease Hemmer: 1:500 DTT (1 M in DMSO),
 1:1000 Aprotinin (1 M in 0,01 M HEPES pH 8,0),
 1:2000 Leupeptin (1 M in Wasser), 1:500
 PMSF (gesättigte Lösung in Ethanol)

1.6.2 Guanylyl Zyklase Aktivitätstest

Lösungen zur Bestimmung der Guanylyl Zyklase-Aktivität

Homogenisations-Puffer :

20 mM	Tris-HCl (pH 7)
0,25 M	Sucrose
0,2 mM	EDTA
10 µg/ml	Leupeptin
2 mM	Benzamidin
10 mM	DTT

Arbeitspuffer:

30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
3 mM	MgCl ₂
100 µg/mL	γ-Globulin
5 mM	Kreatin-Phosphat
100 µg/mL	Kreatin-Phosphokinase
3 mM	Glutathion
0,3 mM	L-NNA
0,5 mM	IBMX
0,5 mM	DTPA

Substratlösung:

50 nM/3 x 10 ⁵ cpm	(α- ³² P)GTP; 0,2 µCi
200 µM	cGMP
50 µM	GTP

1.6.3 Bakterienmedien

Luria-Bertani Medium (LB):
 (per Liter) 10g Bacto-Trypton

1.6.5 Organbad

Hepes-Tyrode-Pufferlösung:	132,0 mM	NaCl
	9,4 mM	Hepes
	5,0 mM	Glucose x H ₂ O
	4,0 mM	KCl
	0,49 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	1,0 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O

Krebs-Henseleit-Pufferlösung:	119,0 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	1,6 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	1,2 mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	21,0 mM	NaHCO ₃
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	0,026 mM	Ca-EDTA
	12,0 mM	Glucose x H ₂ O
	0,02 mM	Diclofenac

Kaliumreiche Krebs-Henseleit-Pufferlösung:	80,0 mM	KCl
	45,0 mM	NaCl
	1,6 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	1,2 mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	21,0 mM	NaHCO ₃
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	0,026 mM	Ca-EDTA
	12,0 mM	Glucose x H ₂ O
	0,02 mM	Diclofenac

1.7 Diverse Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Liste diverser Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Gewebekulturschalen (94/16 mm)	Greiner Labortechnik
Gewebekulturschalen (6x Makroplatte TC)	Greiner Labortechnik
Gewebekulturschalen (60/15 mm)	Greiner Labortechnik
Kyroröhrchen	Nunc Inter Med
Zellschaber	Costar
Luminatöhrchen	Greiner Labortechnik
Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen
Röntgenfilm	Kodak
Proteingrößenmarker (Low Range)	BioRad
Proteingrößenmarker (High Range)	Sigma
DNAgrößenmarker (λ DNA HindIII verd.)	MBI Fermentas
DNAgrößenmarker GeneRuler 100 bp ladder	MBI Fermentas

1.8 Computerprogramme

Für die Analyse und Bearbeitung der DNA Sequenzen wurden Teile des DKFZ Service Softwarepaketes HUSAR verwendet.

Für die Erstellung von Diagrammen und Tabellen EXCEL2000 von Microsoft.

Für die Bearbeitung und Erstellung von Abbildungen wurde CorelDraw9 und CorelDraw9 Photoshop benutzt.

2 Methoden

2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen (*E. coli*)

Von einer *E. coli* DH5 α -Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 1500 g, 4°C). Anschließend konnten die Zellen in 20 ml RF1 Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MgCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 5,8) aufgenommen und 2 Stunden auf Eis inkubiert werden. Nach Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation wurden diese in 4 ml RF2 Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 6,8) aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Diese Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen wurde zur Lagerung bei -70°C in 500 μ l Aliquots aufgeteilt.

2.2 Transformation von kompetenten *E. coli*

Zu 50 μ l DH5 α Zellen wurden ca. 1 μ g Plasmid DNA (in TE Puffer) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte ein Hitze-Schock (37°C, 20 sec), danach wurden 450 μ l LB Medium hinzugegeben und für eine Stunde inkubiert (37°C, unter schütteln). Von dieser Zellsuspension wurden 100-150 μ l auf LB-amp Platten aufgetragen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Wurde ein Plasmid transformiert, das eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht, wurden die Platten vor dem Aufbringen der Zellen mit 30 μ l X-Gal (2% in Dimethylformamid) und 30 μ l IPTG (0,01 M in H₂O) bestrichen.

2.3 Plasmid DNA Präparation im großen Maßstab

Für die Gewinnung von Plasmid DNA wurden transformierte Bakterien Zellen des *Erischia coli* Stammes DH5 α verwendet. Von LB-Platten wurde eine einzelne Kolonie gepickt oder ein 50 μ l Aliquot von einem Glycerolstock entnommen und damit 5 ml LB-Medium angeimpft (Inkubation über Nacht, 37°C, 160 RPM). Von dieser Vorkultur wurden wiederum

100-150 μ l 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 6000xg, 30 min wurde unter Nutzung eines Qiagen-Midi Plasmid Purification Kits die Plasmid DNA eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert und abzentrifugiert (15000xg, 30 min, 4°C). Nach Lufttrocknen des Pellet wurde es in 450 μ l TE (10/1) 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, 12.000xg, 4°C), Waschen mit 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation (5 min, 12.000xg, 4°C) und Lufttrocknen des Pellet 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 ($OD_{260} = 1 \approx 50 \mu\text{g/ml}$). Zur Kontrolle auf Verunreinigungen wird der Quotient der OD_{260}/OD_{280} errechnet, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte (empirisch gefundener Wert).

Um die Korrektheit der Klonierung zu überprüfen wurde die gewonnene Plasmid-DNA einem analytischen Verdau unterworfen und in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt.

2.4 Plasmid DNA Präparation zum Screening

1 – 2 ml LB wurden mit einer Einzelkolonie de jeweiligen *E. coli* Klons beimpft und 8-16 h bei 37°C, 160 RPM inkubiert. Jeweils 1 ml der gewachsenen Kulturen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 30 sek., 10.000xg). Der Niederschlag wurde in 100 μ l TE(50/10) /RNaseA (10mg/ml in 50 mM Na-Acetat, pH 4,8, Hitzeinaktiviert) suspendiert und mit 200 μ l 0,2 M NaOH/1% SDS versetzt. Nun wurden 200 μ l 3 M K-Acetat (Fällung von chromosomaler DNA, Proteinen und Lipiden) hinzugegeben, geschüttelt und 5 min abzentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 10.000xg). Der Überstand wurde von den ausgefällten Proteinen abgenommen und nach Zugabe von 500 μ l Isopropanol 10 min bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 500 μ l 70% Ethanol für weitere 5 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend getrocknet und in 20-50 μ l TE(10/10) aufgenommen.

2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von reinen Nukleinsäurelösungen wurde spektrometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (E_{260}) bestimmt. Dabei gilt:

Konzentration von Plasmid- oder genomischer DNA: $= E_{260} \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$

Konzentration von einzelsträngiger DNA oder RNA: $= E_{260} \times 36 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$

2.6 Restriktionsendonuklease-Spaltung von DNA

Plasmid-DNA sowie Ratten gesamt-DNA wurden in der Regel mit 1-2 Einheiten Restriktionsendonuklease pro μg DNA für 1-12 h unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen inkubiert.

2.7 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA Proben wurden mit 1/6 vol DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in Horizontalgelen elektrophoretisch bei 40-120 V getrennt. Die Elektrophorese wurde im allgemeinen so lange durchgeführt bis die Bromphenolblau-Bande das untere Viertel des Gels erreicht hatte. Die Agarosekonzentration betrug je nach der Größe der zu trennenden Fragmente 0,8-2% (w/v). Als Elektrophoresepuffer wurde TAE 1x verwendet. Die Gele wurden anschließend in 0,1% EtBr-Lösung 5 min gefärbt und unter UV-Licht photographiert (GelDoc[®], Biorad).

2.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA Fragmente nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung aus Agarosegelen zu isolieren wurde das NucleoSpin[™] Kit von Machery & Nagel verwendet. Zuerst wurden die DNA-Banden aus dem Gel geschnitten, in sterile Eppendorfreaktionsgefäße überführt und gewogen. Die Gelstücke wurden mit der vom Hersteller angegebenen Menge Puffer versetzt

und bei 50°C gelöst. Die Trennung von gelöstem Gel und DNA erfolgte durch Ionentauschersäulen. Nach zwei Waschschrinen wurde die DNA von den Säulen mit 30 – 50 µl TE-Puffer eluiert. Die gereinigte DNA wurde sofort weiterverwendet oder bei –20°C gelagert.

2.9 Ligation von DNA Fragmenten

In einem Volumen von meist 10 µl wurden dem jeweiligen Experiment angepasste Mengen der zu ligierenden DNA-Fragment für 10 min auf 65°C erhitzt und langsam abgekühlt, um ein Anlagern der kohäsiven Enden zu ermöglichen. Nach Zugabe von 1/10 vol 10x Ligasepuffer und 1-2 Einheiten T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz 10-16 h bei 14°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 min Erhitzen auf 70°C beendet. Danach wurden die Proben sofort weiterverwendet oder bei –20°C zwischengelagert.

2.10 Phosphatase Behandlung von gespaltener DNA

Um die Religierung linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurden die 5'-Phosphat-Gruppen dieser DNA mit alkalischer Phosphatase entfernt. Dazu wurden 5 µg zuvor durch Restriktionsverdau vollständig linearisierter DNA in 50-300 µl H₂O und der entsprechenden Menge 10x Phosphatasepuffer und 1 Einheit alkalischer Phosphatase 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe 1/10 Vol 0,2 M EDTA und 10 min Erhitzen auf 70°C beendet. Anschließend wurde die Probe mit 1 Vol Wasser-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt und die DNA mit 1/10 Vol 3 M Na-Actetat pH 4,6 und 2,5 vol Ethanol bei –70°C ausgefällt. Der Niederschlag wurde nach Zentrifugation (100.000xg, 4°C) mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 µl TE (10/1) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

2.11 Präparation von Genomischer DNA

Um hochmolekulare Genomische DNA aus glatten Muskelzellen der Ratten (Wistar-Kyoto) zu präparieren wurden die Zellen bis zu Konfluenz kultiviert, anschließend mit PBS gespült und mit DNAzol[®] (1ml/10⁷ Zellen) versetzt. Das entstandene Lysat wurde von den Kulturschalen gekratzt und mehrfach mit einer Pipette resuspendiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 10.000xg, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol/1ml DNAzol[®] präzipitiert. Die DNA wurde mit einer sterilen Glaspasteurpipette in neue Reaktionsgefäße überführt und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 4°C, 1000xg für 3 min wurde der Alkohol entfernt und die DNA in H₂O unter Zugabe von 8 mM NaOH gelöst. Die DNA wurde entweder direkt verwendet oder bei 4°C gelagert.

2.12 Gewinnung von gesamt RNA

Zur Gewinnung von RNA aus Rattenaorten und Zellen wurde nach einer modifizierten Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) extrahiert. Hierbei wurden zuvor inkubierte Rattenaorten im flüssigen N₂ mit einem Pistill fein gemörsert und anschließend 50 - 100 mg in 1 ml TriReagenz[®] (Sigma) (enthält Guanidinthiozyanat und Phenol) gelöst. Zellen wurden nach erfolgter Stimulation zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit TriReagenz[®] lysiert (1 ml/100 mm Kulturschale). Nach einer 10 minütigen Inkubation, bei der die Nukleo-Protein-Komplexe dissoziieren, wurden die Ansätze mit 1/5 vol Chloroform vermischt und zur vollständigen Phasentrennung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 12000xg und 4°C abzentrifugiert. Danach wurde die wässrige RNA-haltige Phase (ca. 60% des Gesamtvolumens) vorsichtig abgenommen und die gereinigten Nukleinsäuren durch Zugabe von ½ Vol eiskaltem 96 %igem Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation (12000xg, 15 min, 4°C) sedimentiert, mit 75%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach Aufnahme und Auflösen des Pellet in 30 µl DEPC-H₂O konnte die RNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt werden. Außerdem wurde die RNA-Reinheit aus dem Quotienten der gemessenen Extinktionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt.

2.13 PCR

Die PCR-Methode diente der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Strängen hybridisiert waren (Sambrook *et al.*, 1989).

Hierbei wurden folgende publizierte Sequenzen (Papapetropoulos *et al.*, 1995) zur Synthese von Oligonukleotid-Primern zur Amplifikation der α_1 - bzw. β_1 -(sGC)-cDNA, sowie des Elongationsfaktors II (EloII, Kontrolle), verwendet:

Tabelle 11: Liste der für die RT-PCR verwendeten Primer

Name	5'----3' Sequenz	Position
α_1 -sGC Forward	GAAATCTTCAAGGGTTATG	1527 – 1545*
α_1 -sGC Reverse	CACAAAGCCAGGACAGTC	2352 – 2335*
β_1 -sGC Forward	GGTTTGCCAGAACCCTTGTATCCACC	1491 – 1515 ⁺
β_1 -sGC Reverse	GAGTTTCTGGGGACATGAGACACC	1775 – 1750 ⁺
eloII- Forward	GACATCACCAAGGGTGTGCAG	2039 - 2059 [†]
eloII- Reverse	GCAGTCAGCACACTGGCATA	2257 - 2256 [†]

* GenBank®/EMBL Zugangsnummer: M57405

+ GenBank®/EMBL Zugangsnummer: M22562

† GenBank®/EMBL Zugangsnummer: NM017245

Für die PCR-Reaktion wurden 50 – 100 ng Matrizen-DNA (ca. 1 - 3 μ l des jeweiligen RT-Ansatzes), je 10 pmol Primer, 10x Amplifikationspuffer (von Hersteller geliefert) und 10x Nukleotidmix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ad 50 μ l Gesamtvolumen mit $H_2O_{dest.}$ in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt. Nach Zugabe von 1 U thermostabiler Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) wurden die Reaktionsansätze kurz gemischt und abzentrifugiert (10000xg, 30 sek). Zur vollständigen Denaturierung der Doppelstränge mussten die Ansätze vor dem ersten Zyklus 5 min bei 95°C denaturiert werden. Die Polymerasen-Kettenreaktion wurde in einem Thermocycler (PE 9700, Applied Biosystems) mit eingebauter, oberer Heizplatte (Schutz vor Verdunstung während der Reaktion) mit 25 Reaktionszyklen zur Amplifikation für *elo* II, 26 Zyklen für β_1 -sGC und 32 Zyklen für α_1 -sGC durchgeführt. Ein Reaktionszyklus bestand aus folgenden Einzelschritten:

- | | | | | |
|----|-----|-----|-----------|--|
| 1) | 0,5 | min | 96°C | (Denaturierung der doppelsträngigen DNA) |
| 2) | 0,5 | min | 54 - 58°C | (Primer-Hybridisierung) |
| 3) | 1,5 | min | 72°C | (Polymerase-Reaktion) |

Nach dem letzten Reaktionszyklus wurde zusätzlich eine Polymerase-Reaktionszeit für 7 min zur vollständigen Auffüllung jeglicher amplifizierten Fragmente durchgeführt. Ein Teil der synthetisierten DNA wurde nach Beendigung der Reaktion zur Kontrolle auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Hierbei diente zur Bestimmung der Fragmentgrößen eine mit *HindIII* geschnittene *I*-DNA von Pharmacia Biotech als Standard. Die DNA-Banden wurden dann durch Inkubation mit Ethidiumbromid (10 µg/ml, ca. 10 min, RT) und durch einen UV-Transilluminator (GelDoc[®], BioRad) visualisiert.

2.14 Reverse Transkription

Um die RNA für weitere Analysemethoden (z.B.: RT-PCR) zugänglich zu machen muss diese zuerst in DNA (complementary DNA, cDNA) transkribiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von viralen Reversen Transkriptasen. Verwendet wurde hier das kommerzielle Enzym SuperscriptII, ein modifiziertes Moloney Murine Leukemia Virus Protein, von Invitrogen. Im Regelfall wurden 1 µg gesamt RNA mit 10 pmol eines OligodTTP Primer (15mer) für 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend wie vom Hersteller angegeben, Reaktionspuffer, DTT, dNTP und Enzym hinzugefügt und 60 min bei 42°C inkubiert. Abschließend erfolgt eine Denaturierung des Enzyms bei 95°C für 5 min. Bei Verwendung von Random Hexamer Primer entfiel der Annealingschritt bei 70°C. Die erhaltene cDNA wurde entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.15 Real-Time RT-PCR (TaqMan™)

Das ABI PRISM 7700 TaqMan™ Sequence Detection System PCR System ermöglicht die Anwesenheit einer bestimmten Sequenz während einer PCR-Reaktion zu beobachten und zu quantifizieren. Dies geschieht durch die Messung der Fluoreszenzzunahme einer

Farbstoffmarkierten DNA-Sonde. Dabei wird die 5'-3' Nuklease Aktivität von Taq-Polymerasen (hier AmpliTaq® Gold) (Lawyer *et al.*, 1989) genutzt.

Die DNA-Sonde besteht aus einem Oligonukleotide mit 5' ständigem Reporter Farbstoff und einem 3' ständigem Quencher Farbstoff. Ein Reporter Farbstoff, wie FAM (6-Carboxyfluorescein) ist kovalent an das 5' Ende des Oligonukleotids gebunden. Dieser Reporter wird durch den Farbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) am 3' Ende supprimiert. Ist die Sonde intakt, führt die Nähe von Reporter und Quencher Farbstoff zu einer Suppression der Reporter Fluoreszenz, primär durch den Förster Energie Transfer (Förster, 1948); (Lakowicz, 1983). Ist während der PCR die Matrize vorhanden lagert sich die Sonde zwischen Sense- und Antisenseprimer an die Vorlage. Die 5'-3' Nukleaseaktivität der DNA Polymerase schneidet die Sonde, wenn sie an die Matrize hybridisiert hat, so dass Reporter- und Quencher-Farbstoff von einander getrennt werden, freie Sonde wird nicht verdaut. Anschließend dissoziiert die Sonde von der Vorlage und die Amplifikation wird fortgesetzt. Dieser Vorgang wiederholt sich mit jedem Zyklus, stört jedoch nicht die exponentielle Produkt-Akkumulation. Die Trennung des Reporter- und Quencher-Farbstoffs resultiert in einem Anstieg des Reportersignals. Dieser Anstieg wird gemessen und ist direkt proportional der Amplifikation.

Das Reportersignal wird gegen die Emission eines passiven Referenz-Farbstoffes (ROX) normalisiert. Um den normalisierten Reporter (R_n) für eine einzelne Reaktion zu berechnen wird das Signal des Reporters durch das Signal der passiven Referenz dividiert. Um die Größe des während der PCR generierten Signals zu berechnen gilt:

$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$$

wo,

$$R_n^+ = \frac{\text{Emissionsintensität Reporter}}{\text{Emissionsintensität passive Referenz}} \quad \text{PCR ohne Matrize}$$

$$R_n^- = \frac{\text{Emissionsintensität Reporter}}{\text{Emissionsintensität passive Referenz}} \quad \text{PCR mit Matrize}$$

Für quantitativen Vergleich verschiedener Proben wird der sogenannte Cycle of threshold (C_T) genutzt. Das ist der Zyklus an dem ΔR_n signifikant über R_n^- liegt. An diesem Punkt beginnt die reguläre exponentielle Phase der PCR. Verschiedenen Proben müssen während dieser Phase der PCR verglichen werden, da ansonsten bei Erreichen eines Plateaus sich die Unterschiede in den Matrizenausgangsmengen nivellieren.

Um relativ (im Vergleich zu einem Kalibratorwert z.B.: Kontrolle) zu quantifizieren erstellt man eine Standardkurve in Form einer seriellen Verdünnung der Matrizen Menge. Anhand einer Regressionsgeraden können nun die fiktiven Mengen der Matrize berechnet werden. Um eventuelle Unterschiede in der zuvor durchgeführten Reversen Transkription zwischen den einzelnen Proben zu berücksichtigen, wird zusätzlich eine PCR mit sogenannten Haushaltsgenen durchgeführt. Wie für das Zielgen wird auch hier eine Standardkurve erstellt. Es wird die Ratio zwischen Zielgen und Haushaltsgen gebildet. Bei dieser Division erhält man einen dimensionslosen Wert. Nun werden alle Werte auf einen Kalibrator (meist die Kontrolle des jeweiligen Versuches) normiert und man erhält die Vielfachen dieses Wertes.

In dieser Arbeit wurden folgende Oligonukleotide verwendet, nach (Krumenacker *et al.*, 2001):

Tabelle 12: Liste der für die Real-time PCR verwendeten Primer.

Name	Sequenz 5'----- 3'	Position
α_1 TaqMan Rev	ACACAATATGCATCTCCGATGG	2055-2033*
α_1 TaqMan For	GCTCTCTATACTCGCTTTGACCAA	1975-1998*
α_1 TaqMan Sonde	CCACCTTGTTAGACATCCAGCTCTCCACA	2029-2002*
β_1 TaqMan Rev	CCCGTGGAAGACTGATGTCAA	842-823†
β_1 TaqMan For	CGGGACCTAGTAGTCACGCA	714-733†
β_1 TaqMan Sonde	ACAGAGTGCTCCCCCAGCTCCAG	751-773†

*GenBank®/EMBL Zugangsnummer: M57405

†GenBank®/EMBL Zugangsnummer: M22562

Es wurde der TaqMan® Universal PCR Mastermix verwendet. Die Primer/Sonden Konzentrationen waren jeweils 900 nM bzw. 500 nM. Wie vom Hersteller vorgeschrieben wurden 40 Zyklen gefahren. Ein Reaktionszyklus bestand aus folgenden Schritten:

- 1) 15 sek 95°C Denaturierung
- 2) 1 min 60°C Annealing und Elongation

Vor dem ersten Zyklus erfolgte noch ein 2 min Schritt bei 50°C, während dieser Phase ist das Enzym AmpErase[®] aktiv, zerstört eventuell schon vorhandene PCR-Produkte und unterdrückt so PCR-Kontaminationen. Während der 10 min 95°C wird die AmpliTaq Gold[®] Polymerase aktiviert.

2.16 Bestimmung des Transkriptionstarts

Die Bestimmung des Transkriptionstartes der Gene der α_1 als auch der β_1 sGC Untereinheiten erfolgte mit Hilfe einer PCR basierendem Methode (CapSite[™] Kit, Eurogentec). RNA wurde präpariert wie unter III.2.12 beschrieben und mit einer Phosphatase behandelt, da intakte mRNA normalerweise mit einer Guanosin-Kappe versehen ist trifft dieser Schritt nur degradierte, ribosomale oder transfer RNA. Anschließend wurden die Guanosin-Kappen durch eine Behandlung mit einer viralen Pyrophosphatase entfernt. An die nun freien phosphorylierten Enden wurde ein synthetisches RNA Oligonukleotid unter Verwendung einer RNA-T4 Ligase gekoppelt. Diese Konstrukte wurden nun mit einer Reversen Transkriptase unter Verwendung von Random Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben. Die Oligonukleotid Sequenz diente nun als Anker, um mit Anker-spezifischen Primern und Genspezifischen Primern eine PCR durchzuführen. Diese cDNA-„Bank“ wurde von Eurogentec zusammen mit den für die Ankersequenz passenden Primern geliefert. Die PCR wurde wie von Eurogentec vorgeschrieben durchgeführt. Die entstandenen Produkte wurden in einem 1,8% Agarosegel aufgetrennt und begutachtet. Anschließend wurden sie mit Hilfe des TOPO-TA Klonierungssystems kloniert und sequenziert.

Tabelle 13: Liste der für die Transkriptionsstartbestimmung verwendeten Oligonukleotide.

Name	5'----3' Sequenz	Position
α_1 b	ACCTGCCGCAATTGCTTCTTC	831 - 811 [*]
α_1 cap	GTGACTCCCTTCTGCATTCTC	630 - 610 [*]
α_1 h	GGCTTGTCTTTCTTTGGGGG	650 - 631 [*]
β_1 cap Extern	CTCGCAGCAGCCACCAAGTC	208 - 189 [†]
β_1 cap Intern	GGAATGATCGTAGATTATTCTC	179 - 158 [†]
1RC	CAAGGTACGCCACAGCGTATG	Linkerbereich
2RC	GTACGCCACAGCGTATGATGC	Linkerbereich

^{*} GenBank[®]/EMBL Zugangsnummer: M57405

[†] GenBank[®]/EMBL Zugangsnummer: M22562

Da das Anker-Oligonukleotid an der Position der Guanosin-Kappe beginnt, also am Beginn der ehemaligen mRNA, stellt der Übergang von Ankersequenz zu mRNA-Sequenz den Beginn der mRNA da. Im Vergleich mit der genomischen Sequenz kann nun der Transkriptionstart bestimmt werden.

2.17 Klonierung von unbekanntem genomischen Bereichen

Um genomische DNA 5' von den kodierenden Bereichen der α_1 und β_1 Untereinheiten zu klonieren wurde das GenomeWalker™ Kit von Clontech verwendet. Bei diesem Kit handelt es sich um eine Anker PCR Methode. Genomische DNA (von *Sprague-Dawley* Ratten) wird mit einem blinde Enden erzeugenden Enzym geschnitten und an die Enden ein sog. Anker Oligonukleotid ligiert. Mit einem Primer aus dem kodierenden Bereich und einem Primer aus der Ankersequenz kann nun eine PCR durchgeführt werden. Bei allen Schritten wurde exakt nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

Tabelle 14: Liste der für die Promotorklonierungen verwendeten Primer.

Name	5'----3' Sequenz	Position
α_1 GWK3 extern	GTGCAGGTGTCTTCGCTTCGAGGACT	319 bis 319*
α_1 GWK3 intern	CTGAGCACTGCATGCTCCTTCGCCTT	287 bis 262*
α_1 GWK4 extern	CTCTCCTCCCTTGGCTTTGGTGGCCTG	-262 bis -287 [§]
α_1 GWK4 intern	GCTTTGAGGCTAATCTACTCTGTTCTGAAG	-296 bis -324 [§]
α_1 2,5 kb extern	CAATTATATGGGATCCATATAGGCATTA	-2830 bis -2803 [§]
α_1 2,5 kb intern	CTTCATCTGCATCCTCTGCTCCCTTTC	-2793 bis -2768 [§]
α_1 1,0 kb extern	CTGATGGTGGCTCCTTTTCACCATGAG	-1133 bis -1107 [§]
α_1 1,0 kb intern	CCTTCTGGGTCTTATGTTTCATGGTCTG	-1092 bis -1066 [§]
α_1 3 kb distal	CAGATCTCTTCATCTGCATCCTCTGCTC	-2793 bis -2762 [§]
α_1 3 kb proximal	CAAGCTTCTGAGCACTGCATGCTCCTT	62 bis 81
α_1 1 kb distal	CAGATCTCCTTCTGGGTCTTATGTTTCATG	-1092 bis -1070 [§]
β_1 GWK extern	GACCGTAATTGCGGATCACCAGCAGCT	96 bis 70 [†]
β_1 GWK intern	TTCACAAAACCGTACATGGTGTCCGCTC	58 bis 31 [†]
Beta/ <i>Hind</i> III	GCTTGAGCCTGGGAGGCAGCC	27 bis 11 [†]
Beta593/ <i>Xho</i> I	GCTCGAGCTGTGATGACACAGT	-564 bis -550 [§]
Beta341/ <i>Xho</i> I	GCTCGAGGCGCTCGCAGGCAGA	-312 bis -297 [§]

* GenBank®/EMBL Zugangsnummer: M57405, † GenBank®/EMBL Zugangsnummer: M22562

[§] Abbildung 14, [§] Abbildung 17, Basen zur Einführung von Schnittstellen sind grau unterlegt.

Die erhaltene PCR-Produkte wurden entweder in einen *Eco*RV geschnittenen pBluescript®II SK⁺ (Stratagene), pGEM®-T EASY (Promega) oder mit Hilfe des TA-Topo cloning Kit kloniert und anschließend sequenziert. Verwendete Oligonukleotide

2.18 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Sanger-Methode. Verwendet wurde das Dye Terminator Cycle Sequencing Kit™ und das automatische Sequenziergerät ABI PRISM® 310 von Applied Biosystems. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

Tabelle 15: Liste der verwendeten Sequenzierprimer.

Name	5'---- 3' Sequenz	Position
M13(+)	GTAAAACGACGGCCAG	Vektor
M13(-)	CAGGAAACAGCTATGAC	Vektor
β 19a	ACTTACAGGAGCAGGGATG	-1287 bis -1269*
β 19b	ATGTCCTGTGAAGTTCACAGA	-940 bis -919*
β 19c	ACCACAGGTGAAAATGAATTC	-643 bis -613*
β 19d	AATAACCCCGTCCATGTTG	-292 bis -274*
β 19Ra	CGACTACAGCGGCGACAGCGC	+5 bis -15*
β 19Rb	ATTCTGCCTGCGAGCGCGC	-295 bis -313*
β 19Rb2	TCCAACATGGACGGGGTTA	-272 bis -290*
β 19Rc	GAATTCATTTTCACCTGTGGT	-613 bis -633*
β 19 Rd	GTGAACTTCACAGGACATGCT	-923 bis -943*
α ₁ GWK4 Rev1	CACTCTATTCCTATTTTGAAAAGG	-2768 bis -2745†
α ₁ GWK4 Rev2	GATTTGGGAGTAAGAGAAGTTTAT	-1019 bis -995†
α ₁ GWK4 For1	CTATCCTCAGACCATGAACATAAG	-1059 bis -1082†
α ₁ GWK4 For2	CCAGTTACTCCTGGTATCTTTTCA	-539 bis -563†
α ₁ GWK4 2,5 Rev7	GGCCAAAGGTCATCACCATGA	-1866 bis -1846†
α ₁ GWK4 2,5 For7	GTTACAGTTTACACTGGCTA	-1807 bis -1827†
α ₁ GWK4 Rev4	GTAGGCAACATTGGAAGAAACATG	-689 bis -665†
α ₁ GWK4 For3	CTGTGCCGTGGGTTCTATAG	-1403 bis -1423†
α ₁ GWK4 Rev3	TGCAGAACACTGCCAAGGCAG	-2570 bis -2550†
α ₁ GWK4 For4	GCCAAGAAAGCCAGCTACAGG	-882 bis -903†
α ₁ GWK4 Rev5	CCATTAGCCAATCTGTTGAGAATG	-2256 bis -2233†
α ₁ GWK4 For5	GGCTTTCCAGTAGTGAGGAT	-1509 bis -1529†
α ₁ GWK3 Rev2	CTCAGCTCCTGAGAACGGAGT	-56 bis -36†
α ₁ GWK3 For1	CTACAGTTGGTCTGCACCAGC	-220 bis -200†

* entsprechend der **Abbildung 17** in Abschnitt Ergebnisse.

† entsprechend der **Abbildung 14** in Abschnitt Ergebnisse.

Da die durchschnittliche Leseweite etwa 500 Basen beträgt, musste bei größeren Fragmenten überlappend sequenziert werden, d.h. nach jeder Sequenzierung wurden neue Primer zur Verlängerung generiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend per Hand oder mit Hilfe des Husar Software Paketes zusammengefügt. Alle Promotorsequenzen wurden Doppelsträngig sequenziert. Für die verwendeten Oligonukleotide siehe **Tabelle 15**.

2.19 Tierspezies und Haltungsbedingungen

Es wurden männliche Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borken), verwendet. Die Tiere wurden auf staubfreiem Holzgranulat (Altrominfaser, Altromin, Lage) in 550x330x200 mm großen Makrolon-Käfigen (Erich Becker, Castrop-Rauxel) gehalten. Die Fütterung erfolgte mit der Altromin-Standard-Diät Nr. 1320 (Altromin, Lage) und Leitungswasser *ad libitum*. Die Raumtemperatur des Tierstalls betrug zwischen 21° - 25° C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 - 65 %. Der Raum wurde in einem zirkadianen hell-dunkel Lichtrhythmus im Verhältnis 10:14 (7.00 - 17.00 Uhr) mit Neonlampen beleuchtet.

2.20 Isolation von Gefäßsegmenten der *A. 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 1.000 IE Heparin in die *V. cava caudalis* wurden die Tiere mittels Durchtrennung der *A. abdominalis* entblutet. Die *A. thoracalis* wurde unter Vermeidung von Zug und Druck entnommen und in einer mit HEPES-Tyrode-Lösung gefüllten, eisgekühlten Petrischale von umgebenden Fett- und Bindegewebe gelöst. Das Gefäßlumen wurde mit HEPES-Tyrode-Lösung durchspült. Anschließend wurde die Aorta in 2 - 3 mm lange Ringe geschnitten. Bei einem Teil der Ringe wurde das Endothel mechanisch entfernt, indem die Gefäßringe mit Hilfe einer ins Gefäßlumen eingeführten Pinzette auf einer angefeuchteten Unterlage vorsichtig gerollt wurden. Anschließend wurden die Aortensegmente zur isometrischen Kontraktionsmessung zwischen einem fixierten Haken am Boden des Organbades (Typ Eigenbau) sowie einem Kraftaufnehmer (Isometrischer Transducer GM2, FMI GmbH) eingespannt. Die mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Reaktionsgefäße wurden mit einer Thermostabilisierungseinheit auf 37° C temperiert und mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) begast. Die mit dem Kraftaufnehmer registrierten Tonusänderungen wurden durch einen Verstärker (Typ Eigenbau) verstärkt und mit einem Vier-Kanal-Schreiber (Linseis L 2200) bei einer Papiergeschwindigkeit von 10 – 50 cm/h aufgezeichnet. Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung mit Eichgewichten (Typ Eigenbau).

2.21 Durchführung der Relaxationsversuche im Organbad

Die Relaxationsversuche im Organbad wurden - soweit nicht anders vermerkt - nach folgenden Versuchsprotokollen durchgeführt:

Nach dem Einbringen in das Organbad wurden die Gefäßringe schrittweise auf 2 g vorgedehnt, um eine für die maximale Kontraktion optimale Vorspannung zu erhalten. Dies erfolgte über einen Zeitraum von 50 - 60 min. Nach Erreichen des stabilen Ausgangsniveaus wurde mit den Kontraktionsversuchen begonnen. Die Kontraktilität aller Gefäße wurde mit kaliumreicher Krebs-Henseleit-Lösung (40 mM K⁺) getestet. Hierfür wurde die Organbadlösung vollständig ausgetauscht. Alle Versuche fanden in Gegenwart von Diclofenac (0,02 mM in der Krebs-Henseleit-Lösung) statt, um die Prostaglandinsynthese zu hemmen, und N^G-Nitro-L-Arginin (300 µM jeweils für 30 min), um den Einfluß einer möglicherweise während des Versuchsablaufs induzierten NO-Synthase (NOS) auszuschalten. Nach anschließendem dreimaligen Austausch der Badflüssigkeit mit Krebs-Henseleit-Puffer und einer Aquilibrationsphase von 10 - 20 min, bei der die Gefäßringe wieder ihren Ausgangstonus erreichten, erfolgte die Kontraktion mit dem α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin [300 nM]. Nach dem Erreichen eines stabilen Tonus wurden kumulative Konzentrations-Relaxations-Kurven bis zur maximal erreichbaren Gefäßrelaxation durch die Zugabe der entsprechenden Vasodilatoren aufgenommen. Wurden verschiedene Vasodilatoren verwendet, erfolgte nach mehrmaligem Waschen der Gefäße und einer Ruhephase von 10 - 15 min eine erneute Kontraktion mit Phenylephrin (300 nM) mit anschließender Aufnahme der Dosis-Wirkungs-Kurve für die zu untersuchende Substanz. Die Zugabe der nächst höheren Konzentration erfolgte sofort nach Erreichen eines stabilen Gefäßtonus.

2.22 Präparation primärer glatter Muskelzellen aus Aorten

Männliche *Wistar*-Ratten wurden durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital-Natrium (Nembutal, 50 mg/kg) betäubt, der thorakale Abschnitt der Aorta entnommen und in eine Petrischale mit Serum-freiem Kulturmedium (MEM) überführt. Das Medium enthielt zusätzlich 50 U/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin und 0,1% Rinder-Serumalbumin (BSA).

Die Aortensegmente wurden von Fett- und Bindegewebe gesäubert und das Endothel mechanisch entfernt. Anschließend wurden die endothel-freien Aorten-Segmente in Kulturmedium mit 3 mg/ml Kollagenase (Typ I) für 30 min bei 37°C im Brutschrank behandelt. Danach konnte durch kleine Pinzetten die Adventitia entfernt, das restliche Gefäß longitudinal aufgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt werden. 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 (VSMC) dissoziierten. Nach Zentrifugation (100xg, 5 min) wurden die Zellen in Serum-haltigen MEM (10 % FKS) aufgenommen und in Petrischalen angezogen. Die Charakterisierung erfolgte immunzytochemisch mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen α -Aktin des glatten Gefäßmuskels (Gordon *et al.*, 1986). Im konfluenten Zustand wurden die Zellen dann unter der Verwendung von 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) passagiert. Alle Experimente wurden mit Zellen der 5. - 20. Passage durchgeführt.

2.23 Kultivierung von Zellen

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 Gammabestrahlung). Sämtliche Zell-Linien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und min 90% Luftfeuchtigkeit und Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) kultiviert. Das Medium wurde supplementiert mit 2-20% Fötalem Kälberserum (FKS), 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin. Im Falle des Hungermediums wurde DMEM mit 50 µg/ml BSA (Cohn Fraktion V) und der genannten Menge Penicillin und Streptomycin versetzt.

Um konfluent gewordene Zellen zu verdünnen, wurden sie einmal mit PBS gewaschen und dann mit ca. 3 ml Trypsin-Lösung versetzt. Sobald die Zellen begannen sich abzulösen, wurde frisches Medium hinzugegeben, um den tryptischen Verdau zu unterbrechen. Die Zellen wurden dann von der Platte abgespült und zur Weiterzucht auf neue Platten verteilt.

Zur Aufbewahrung von Zellen wurden diese, nach Ablösung, bei 800xg für 5 min sedimentiert, einmal mit PBS gewaschen dann in Einfriermedium (10% DMSO, 90% FKS) 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.

2.24 Transiente Transfektion von glatten Muskelzellen

Für die transiente Transfektion von Plasmid DNA in glatte Muskelzellen wurde die Effectene™ Methode der Firma Qiagen verwendet. Diese Methode basiert auf der Bildung von Mycellen, die die Plasmid DNA in sich aufnehmen und anschließend mit der Zellmembran fusionieren. In dieser Arbeit wurden 0,4 µg Plasmid DNA des Reporterkonstrukts (Leuchtkäfer Luziferase) verwendet. Zur Kontrolle der Effizienz der Transfektion wurden 0,1 µg eines Plasmids, das für Renilla Luziferase (pTK Renilla) kodiert und unter Kontrolle des Herpesvirus Promotor steht, eingesetzt.

400.000 Zellen pro Well eines Six-Wells wurden ausgesät und am nächsten Tag gemäss den Angaben des Herstellers transfiziert. Nach ca. 16 h wurden die Zellen gewaschen und für weitere 24 h, vor Stimulation, gehungert. Alle Bedingungen wurden im Triplet transfiziert.

2.25 Luziferase Aktivitätsbestimmung

Bei Verwendung der Leuchtkäfer (*Photocis pyralis*) Luziferase als Reporter gen macht man sich die enzymatische Umsetzung der Substrate Luziferin und ATP unter Emission von Licht zunutze.



Die Lichtemission erreicht ihre höchste Intensität nach ca. 0,3 sec und klingt danach innerhalb weniger Sekunden vollständig ab. Es ist daher notwendig ein Luminometer zu benutzen, das den Reaktionsmix mit hoher Geschwindigkeit zum Zellextrakt hinzufügt und den entstehenden Lichtblitz quantitativ erfassen kann.

Bei der Durchführung der Luziferin Tests wurden 15-50 μ l Zellextrakt in ein Luminatröhrchen und dieses in das Luminometer gegeben. Darauf hin erfolgte das Einspritzen der Luziferase-Reaktionslösung und die Messung der Lichtemission (relative light units (RLU)) durch das Luminometer. War die Lichtemission außerhalb des linearen Messbereiches wurden die Messungen mit weniger Zellysat wiederholt.

Um die Aktivität der *Renilla reniformis* Luziferase zu quantifizieren wurde die Substratlösung ausgewechselt. Die verwendete Lösung enthielt die erforderlichen Bestandteile für die Renilla-Luziferase und blockierte gleichzeitig die Aktivität der Leuchtkäferluziferase. Diese Lösung wurde dann zu den schon gemessenen Proben eingespritzt und die RLU bestimmt.

2.26 Gesamtzellextrakt modifiziert nach Dignam (Dignam *et al.*, 1983)

Die Zellen wurden auf Zellkulturpetrischalen ausgesät. Bei Erreichen der gewünschten Dichte bzw. nach erfolgter Stimulierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von dem Schalenboden gelöst und in 4 ml PBS aufgenommen. Nun erfolgte für 5 min eine Zentrifugation bei 4°C und 230xg, der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgezogen und verworfen. Das Pellet wurde im Verhältnis 1:2 bis 1:4 in Lysispuffer resuspendiert. Nach 5 min und dann weiteren 10 min wurde wiederholt mit PMSF resuspendiert, dann erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 12.000xg. Der Überstand wurde abgezogen und mit dem gleichen Volumen Ausgleichspuffer gemischt. Für die Bestimmung des Gesamtproteins wurde ein Aliquot entnommen, der restliche Zellextrakt mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C eingelagert.

2.27 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. Benutzt wurde ein Kit von Bio-Rad. Die Bradford-Lösung wurde 1:5 mit Wasser verdünnt, je 1 ml in Küvetten gefüllt, je zweimal 1 μ l bis 6 μ l Zellextrakt hinzugefügt, die Lösung durch zweimaliges Invertieren

gemischt und photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte gegen den Leerwert von 1 ml Bradfordlösung. Die Eichkurve wurde mit Rinderserum-Albumin für die Konzentrationen 1 bis 12 µg/ml erstellt.

2.28 sGC-Aktivitätstest

Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff im Dismembrator (Braun, Melsungen) homogenisiert, in ein gekühltes Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Je nach Probengewicht wurde die fünffache Menge des Homogenisations-Puffers hinzugefügt und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die aufgeschlossenen Proben bei 16000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, in neue Gefäße aliquotiert und nach Bradford (Bradford, 1976) der Gesamtproteingehalt ermittelt.

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Guanylyl Zyklase wurde die Bildung von (^{32}P)cGMP aus (α - ^{32}P)GTP gemessen. Hierzu wurden 30 µl (10 µg) des zu untersuchenden Proteins mit 30 µl Arbeitspuffer und 30 µl Zusätzen wie Natriumnitroprussid pipettiert (je nach Fragestellung) und die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 10 µl (α - ^{32}P)GTP-Substratlösung gestartet. Der Arbeitspuffer enthielt neben Tris-HCl (pH 7,4) folgende Substanzen: Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl_2) als Kofaktor der GC, γ -Globulin als Proteincarrier, Kreatinphosphokinase und Kreatinphosphat zur Phosphorylierung von eventuell entstandenem 5'-GDP zu GTP, Glutathion (GSH) diente als Oxidationsschutz, N^{G} -Nitro-L-Arginine (L-NNA) wurde zur Hemmung der endothelialen NO-Synthase und 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX) zur Hemmung der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen benötigt. Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) wurde als Chelator zum Abfangen von Metallionen verwendet. Nach 10 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurde die Reaktion mit 0,4 ml Zinkacetat (120 mM) sowie 0,5 ml Natriumcarbonat (120 mM) gestoppt und das nicht umgesetzte GTP in Zinkcarbonat ausgefällt (Schultz and Böhme, 1984). Nach Zentrifugation (10 min, 4000xg, 4°C) wurde das entstandene (α - ^{32}P)cGMP mit Hilfe einer Säulenchromatographie aus dem Überstand isoliert, indem dieser mit 2 ml 1 N Perchlorsäure auf die Aluminiumoxid-Säulen gegeben wurde. Hierdurch wird das (^{32}P)cGMP an das saure Aluminiumoxid gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml H_2O erfolgte die Elution des Produkts (^{32}P)cGMP mit 5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) in ein Sintillationsgefäß. Danach erfolgte die Aktivitätsmessung im Counter (Packard Dicarb 1900). Die Aktivierung der GC

wurde auf die Basalaktivität des Enzyms bezogen und als spezifische GC-Aktivität nach folgender Formel [$\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$] berechnet:

$$\frac{(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Blank}}) \times \text{mol GTP} \times f \times 1 \text{ ml} / \text{Ansatzvolumen [ml]}}{\text{cpm}_{(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}} \times \text{CA} \times t \times \text{GC [mg/ml]}}$$

(cpm = counts per minute, Blank = Radioaktivitätsleerwert, f = Verdünnungsfaktor für die GC, CA = Chromatographieausbeute = 50 %, t = Inkubationszeit) (Schultz and Böhme, 1984)

2.29 Primer Design

Die Oligonukleotid Primer wurden entsprechend dem Verwendungszwecks aus den bekannten Sequenzen ausgesucht. Die Schmelztemperatur wurde näherungsweise durch die AT+GC Regel berechnet. Dabei werden für Adenosin und Tyrosin jeweils 2°C und für Guanosin und Cytosin jeweils 4°C veranschlagt.

Die letztlich verwendete Schmelztemperatur in der PCR wurde empirisch optimiert.

2.30 Statistik

Die Ergebnisse der der Luziferase-Assays, sowie die Resultate aus den RT-PCR- und Enzymkinetik-Untersuchungen sind jeweils als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) oder Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von n verschiedenen Experimenten angegeben. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurde bei gepaarten Daten der Student's t-Test und beim Vergleich zweier Behandlungen eine Varianzanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der Real-Time PCR Versuche wurden als Mediane angegeben. Die Statistische Signifikanz wurde hier mit Hilfe des nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Test und anschließenden multiplen Tukey-Vergleichstest ermittelt (Zar, 1996) berechnet.

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

IV Ergebnisse

1 Bestimmung des Transkriptionstart für α_1 und β_1 sGC

Zu Beginn dieser Arbeit waren von *Rattus Norvegicus* die cDNA Sequenzen sowohl der α_1 als auch der β_1 Untereinheit der sGC kloniert und sequenziert (Nakane *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1990). In beiden Arbeiten wurde keine Bestimmung des Transkriptionsstarts durchgeführt. Jedoch war es für die Klonierung 5'-flankierender, regulativer Regionen notwendig den Beginn der Transkription zu kennen, um später definierte Promotor-Reporter-Gen Fusionen herstellen zu können. Zur Bestimmung des Startpunkts der Transkription wurde das CapSite™ Kit von Eurogentec wie unter **III.2.16** beschrieben benutzt. Dabei wurden für beide Untereinheiten Primer genutzt, die in den jeweiligen kodierenden Bereichen in der 5'-Region der mRNA liegen (s. **Tabelle 13**). Die erhaltenen PCR Produkte wurden in den Klonierungsvektor pCRII gebracht und mit M13-Primern beidseitig sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen und die cDNA wurden mit Hilfe des Programms Clustal des Husar Programmpakets übereinandergelegt.

1.1 Transkriptionstart der α_1 -Untereinheit

Anhand der publizierten mRNA-Sequenz (Nakane *et al.*, 1990) wurden die Primer α_1b (bp 831 - 811) $\alpha_1 cap$ (630 - 610) und α_1h (bp 650 - 631) (Diese Basenpositionen und die im folgenden genannten entsprechen denen der publizierten Sequenz) ausgewählt und die Bestimmung des Startpunkts der Transkription mit dem CapSite™ Kit durchgeführt. Für die Primersequenzen und Einzelheiten über den verwendeten Kit s. Material und Methoden. Für die Kombinationen α_1b/α_1h (Klon α_1TS2) und α_1b/α_1cap (Klon α_1TS1) wurden ca. 400 bp große Fragmente erhalten, die jeweils kloniert und sequenziert wurden. Beide Sequenzen sind auszugsweise im Vergleich zu der publizierten cDNA (Nakane *et al.*, 1990) in **Abbildung 6** dargestellt.

Die ersten 214 bp der publizierten Sequenz sind in beiden Klonen nicht wiederzufinden. Somit ist dieser Abschnitt nicht Bestandteil der α_1 sGC mRNA. Weitere Unterschiede zwischen den hier klonierten und den veröffentlichten Sequenzen wurden gefunden: Die

Basen 1-4 stellen vermutlich eine Vektorkontamination (*EcoRI* Schnittstelle) da. Eine 4 bp große Insertion liegt zwischen Nukleotid 234 und 235. An den Positionen 237 fanden sich Basenaustäusche (T gegen C), 238 (C gegen T) und 239 (T gegen C) und an Position 266 ein Austausch von G gegen A. Als ein Sequenzierfehler in der cDNA ist die Insertion eines C zw. Nukleotid 258 und 259 zu betrachten. Gleiches gilt für den Austausch eines A gegen ein G bei 305. Die Insertionen eines Thymin in Klon TS1 zw. Position 434 und 435 und eines Cytosin zw. 489 und 490 sind vermutlich auf PCR Mutationen zurückzuführen. Der neu bestimmte Transkriptionsstart liegt nun bei bp 214 (bezogen auf die publizierte Sequenz).

		1				50	
	cDNA	GAAT	TCCGGA	TTACAGACAC	GTATGTCATA	TGGATGTTGG	AGATTTGAAC
	Alpha1 TS1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	Alpha1 TS2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
		51					100
	cDNA	TCAGGTCCTC	ATGTTTGGGT	GGTAAGTGGT	TCTAACCCTC	GAGCTGTCTC	
	Alpha1 TS1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
	Alpha1 TS2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
		101					150
	cDNA	ACCAGTCTCA	GTGGGGTACC	CACACTGACC	ACTCTCCGCC	CACTCCTGAA	
	Alpha1 TS1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
	Alpha1 TS2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
		151					200
	cDNA	ATGCCCTTTG	TTCTCCCCTC	CCCTACGCTA	TCTCTGAGAG	CTCACCCCCA	
	Alpha1 TS1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
	Alpha1 TS2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
		201					250
	cDNA	TACCCTTCTG	TTCTCACACA	CAGCCTTCCA	GGCG...TC	TCTCAGTGCC	
	Alpha1 TS1	~~~~~	~~~ACACACA	CAGCCTTCCA	GGCGGTCTC	CTCCAGTGCC	
	Alpha1 TS2	~~~~~	~~~ACACACA	CAGCCTTCCA	GGCGGTCTT	CTCCAGTGCC	
		251					300
	cDNA	TGCCAGCC.G	ACCCCAAGGC	GAAGGAGCAT	GCAGTGCTCA	GCCCGGGGAG	
	Alpha1 TS1	TGCCAGCCCG	ACCCCAAGGC	GAAGAAGCA.	GCAGTGCTCA	GCCCGGGGAG	
	Alpha1 TS2	TGCCAGCCCG	ACCCCAAGGC	GAAGA.GCA.	GCAGTGCTCA	GCCCGGGGAG	
		301					350
	cDNA	TCCTCGAAGC	GAAGACACCT	GCACCCGGATG	CCCCTGGCCT	CCCCTGACCG	
	Alpha1 TS1	TCCTCGAAGC	GAAGACACCT	GCGCCGGATG	CCCCTGGCCT	CCCCTGACCG	
	Alpha1 TS2	TCCTCGAAGC	GAAGACACCT	GCGCCGGATG	CCCCTGGCCT	CCCCTGACCG	
		351					400
	cDNA	CATCATGATG	CTGGGCCACT	CGTGTCTTTG	AGTCAGTAGA	AGCAGATCTT	
	Alpha1 TS1	CATCATGATG	CTGGGCCACT	CGTGTCTTTG	AGTCAGTAGA	AGCAGATCTT	
	Alpha1 TS2	CATCATGATG	CTGGGCCACT	CGTGTCTTTG	AGTCAGTAGA	AGCAGATCTT	
		401					450
	cDNA	CATCAGTCCA	CATCAACACC	GGCTAATAAG	GAGGAAACCA	CT.GCCAAGC	
	Alpha1 TS1	CATCAGTCCA	CATCAACACC	GGCTAATAAG	GAGGAAACCA	CTTGCCAAGC	
	Alpha1 TS2	CATCAGTCCA	CATCAACACC	GGCTAATAAG	GAGGAAACCA	CT.GCCAAGC	
		451					500
	cDNA	TCCAGGAACA	CCATGTTCTG	CAGGAAGTTC	AAAGATCTCA	AGATCAC.GG	
	Alpha1 TS1	TCCAGGAACA	CCATGTTCTG	CAGGAAGTTC	AAAGATCTTA	AGATCACCGG	
	Alpha1 TS2	TCCAGGAACA	CCATGTTCTA	CAGGAAGTTC	AAAGATCTCA	AGATCAC.GG	

Abbildung 6: Vergleich der Sequenzen der α_1 sGC mRNA und der Klone α_1 TS1 und α_1 TS2.

Klone wurden durch die CapSite™-Methode erhalten unter Nutzung des Primerpaares 1RC/2RC und der genspezifischen Primerkombinationen: α_{1b}/α_{1h} (TS1) und $\alpha_{1b}/\alpha_{1cap}$ (TS2). Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCRII (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Übereinanderlegen der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Clustal (HUSAR Programmpaket). Hellgrau unterlegt: Similarität zwischen zwei Sequenzen, dunkelgrau unterlegt: Similarität zwischen drei Sequenzen, mit Rahmen Reste des von Nakane verwendeten Vektors (*EcoRI*-Schnittstelle).

1.2 Transkriptionsstart der β_1 -Untereinheit

Anhand der publizierten mRNA-Sequenz (Nakane *et al.*, 1988) wurden die Primer β_1 cap Extern (bp 831 - 811) β_1 cap Intern (bp 630 - 610) für die Bestimmung des Startpunkts der Transkription ausgewählt und diese mit dem CapSite™ Kit durchgeführt. Für die Kombination β_1 cap Extern/ β_1 cap Intern wurden zwei Klone (β_1 TS1 und β_1 TS2) sequenziert. Beide Sequenzen sind teilweise im Vergleich zu der publizierten cDNA (Nakane *et al.*, 1988) in **Abbildung 7** dargestellt. Der Transkriptionsstart wurde bei 30 bp stromaufwärts des 5'-Endes der publizierten Sequenz bestimmt. Zusätzlich zu dieser Verlängerung der cDNA-Sequenz, zeigt der Klon β_1 TS1 eine Insertion eines Thymin an Position 114 (Abb.) bzw. zwischen Position 62 und 63 der publizierten Sequenz und einen Basenaustausch bei Position 190 bzw. Nukleotid 138 der publizierten Sequenz.

		1								50
	cDNA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	Beta1 TS1	~~~~~	~~~~~	~AGTCGCTGT	CTGGGTCCCT	TCCGCGGTAC				
	Beta1 TS2	~~~~~	~~~~~	~AGTCGCTGT	CTGGGTCCCT	TCCGCGGTAC				
		51								100
	cDNA	~CTTGCCTGG	AGGCTGCCTC	CCAGGCTCCG	GGAGCGGACA	CCATGTACGG				
	Beta1 TS1	TCTTGCCTGG	AGGCTGCCTC	CCAGGCTCCG	GGAGCGGACA	CCATGTACGG				
	Beta1 TS1	TCTTGCCTGG	AGGCTGCCTC	CCAGGCTCCG	GGAGCGGACA	CCATGTACGG				
		101								150
	cDNA	TTTTGTGAAC	CAT.GCCCTG	GAGCTGCTGG	TGATCCGCAA	TTACGGTCCC				
	Beta1 TS1	TTTTGTGAAC	CATTGCCCTG	GAGCTGCTGG	TGATCCGCAA	TTACGGTCCC				
	Beta1 TS1	TTTTGTGAAC	CAT.GCCCTG	GAGCTGCTGG	TGATCCGCAA	TTACGGTCCC				
		151								200
	cDNA	GAGGTGTGGG	AAGACATCAA	AAAAGAGGCG	CAGCTGGATC	AAGAAGGCCA				
	Beta1 TS1	GAGGTGTGGG	AAGACATCAA	AAAAGAGGCG	CAGCTGGATG	AAGAAGGCCA				
	Beta1 TS2	GAGGTGTGGG	AAGACATCAA	AAAAGAGGCG	CAGCTGGATG	AAGAAGGCCA				

Abbildung 7: Vergleich der Sequenzen der β_1 sGC mRNA und der Klone β_1 TS1 und β_1 TS2.

Klone wurden über die CapSite™-Methode erhalten unter Nutzung des Primerpaares 1RC/2RC und der genspezifischen Primerkombination: β_1 cap Extern/ β_1 cap Intern. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCRII (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Das Übereinanderlegen der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Clustal (HUSAR Programmpaket). Hellgrau unterlegt: Similarität zwischen zwei Sequenzen, dunkelgrau unterlegt: Similarität zwischen drei Sequenzen und mit Rahmen ATG.

2 Genomische Sequenzen 5' der cDNA & in silico Analyse

Um die 5'-flankierenden Sequenzen der beiden Untereinheiten zu analysieren wurden diese mit Hilfe einer PCR Technik kloniert. Die genauen Strategien und Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

2.1 Klonierung der 5'flankierenden Bereiche der α_1 sGC Untereinheit

Nachdem der Transkriptionstart der α_1 Untereinheit neu bestimmt wurde, konnte nun der 5' flankierende Bereich des Gens kloniert werden. Dazu wurde die im Abschnitt Methoden beschriebene Technik des GenomeWalker™ Kits (Clontech™) benutzt. In Bereich des neu definierten 5' UTR (Untranslatierte Region) wurden folgende Primer ausgewählt: GWK3 α_1 Extern (319-319 bp entsprechend cDNA) und GWK3 α_1 Intern (287-262 bp entsprechend cDNA). Den Angaben des Herstellers folgend wurden nun zwei aufeinander folgende PCR Reaktionen durchgeführt (nested PCR). Das Produkt der 1. Reaktion, welches mit den externen Primern erhalten wurde, dient als Matrize der 2. Reaktion, die mit den internen Primern ausgeführt wurde. Aliquots der Amplifikate wurden durch eine Elektrophorese überprüft. (s. **Abbildung 8 A**). Es waren sowohl bei allen gelieferten Banken (genomische DNA von *Sprague-Dawley* Ratten verdaut mit verschiedenen Endonukleasen) als auch der Positivkontrolle nach der ersten Reaktion keinerlei Amplifikate zu detektieren. Dennoch wurde mit 1:50 verdünnten Reaktionen als Matrize mit dem 2. PCR-Schritt fortgefahren. Erneut wurden Aliquots der Reaktionen auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Nun ließen sich bei der Bank RDL-4 (*PvuII* verdaut) ein ~200 bp und bei RDL-5 (*SspI* verdaut) ein ~ 350 bp großes Fragment detektieren (s. **Abbildung 8 B**).

Beide gefunden Produkte wurden wie im Abschnitt Methoden beschrieben in den *EcoRV* geschnittenen Vektor pBluescript®II SK⁺ kloniert und das Konstrukt präpariert und anschließend sequenziert. Eine Übersichtskarte des Vektors und die Übergänge von Vektor zur Insertion beider Klone sind in **Abbildung 9** gezeigt. Die genaue Fragment-Längen betragen: 466 bp bzw. 318 bp, inklusive der Adaptersequenz. Beide Klone besitzen das gleiche 3'-Ende (Sequenz des Primers GWK3 α_1 Intern) und 100% Similarität mit dem 5' UTR der α_1 Untereinheit.

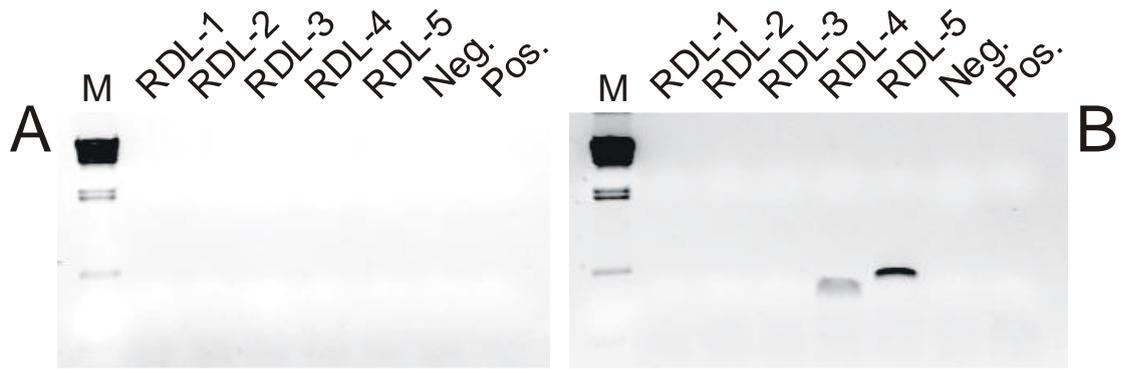
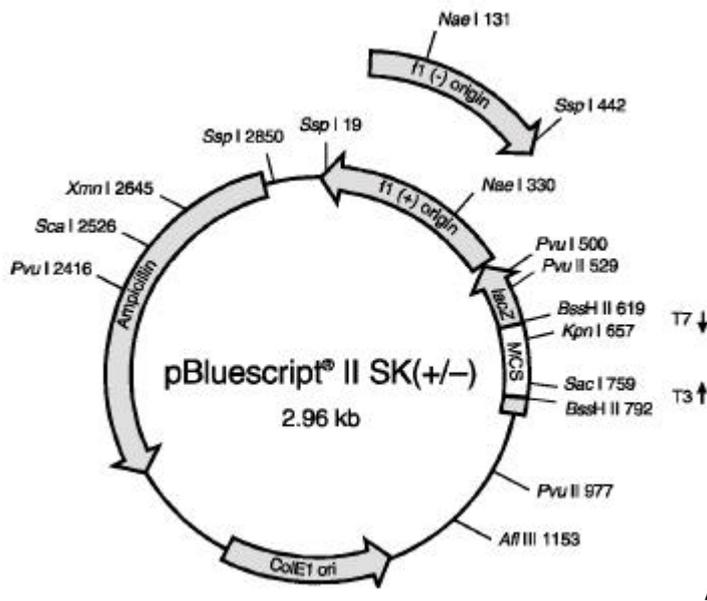
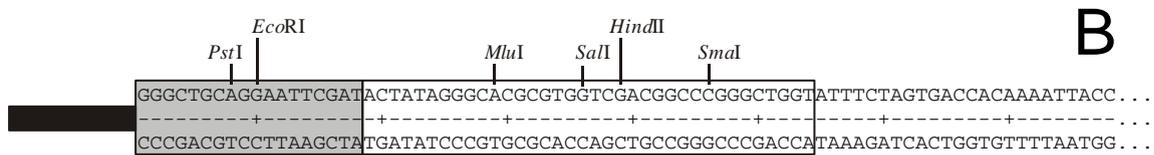


Abbildung 8: GenomeWalker™ PCR. Erhaltene Fragmente für die α_1 Untereinheit.

(A) zeigt ein 1% Agarosegel mit Produkten der ersten Amplifikationsrunde mit den Primern GWK3 α_1 Extern und ADP1. In (B) ein 1% Agarosegel mit den Produkten aus der zweiten Runde, Primer GWK3 α_1 Intern und ADP2. Abkürzungen: RDL-1: *EcoRV* geschnittene genomische Ratten DNA (*Sprague-Dawley*), RDL-2: *ScaI*, RDL-3: *DraI*, RDL-4: *PvuII* und RDL-5: *SspI*, Neg.: Negativ-Kontrolle, Pos.: Positiv-Kontrolle.

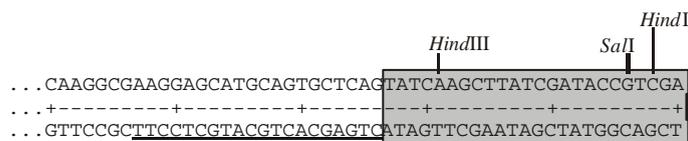


A



Vektor T7 Seite

Adaptorsequenz



Vektor T3 Seite

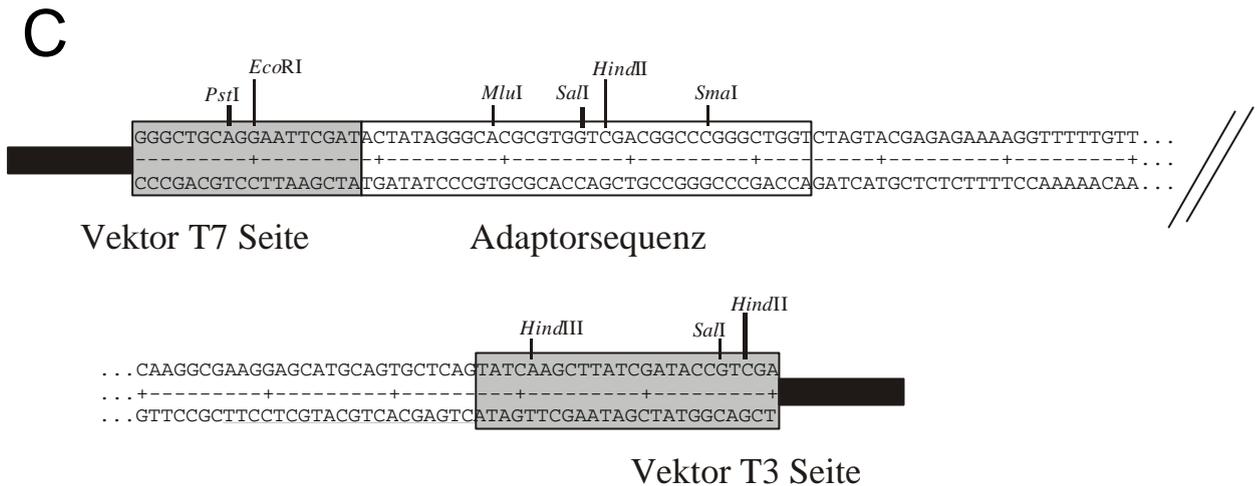


Abbildung 9: Übersichtskarte der klonierten α_1 Promotoren.

(A) Plasmid-Karte des verwendeten Klonierungsvektor pBluescript[®] II SK⁺, mit *EcoRV* geschnitten. (B) Zeigt schematisch die Übergänge von Vektor zu Insertion für den 466 bp langen Klon, das gleiche zeigt Figur (C) für den 318 bp langen Klon. Grau und Schwarz unterlegt: die Vektorsequenzen. Die Primersequenz sind unterstrichen. Mit Rahmen dargestellt die Adaptersequenz des GenomeWalker[™] Kits. Ohne Markierung die Sequenz der Insertion.

Um längere Teile des α_1 Promotors zu erhalten, wurde ausgehend von dem 466 bp langen Klon erneut eine GenomeWalker[™] PCR durchgeführt. Verwendet wurden die Primer GWK4 α_1 Extern (-262 bis -287 bp entsprechend **Abbildung 14**) und GWK4 α_1 Intern (-296 bis -324 bp entsprechend **Abbildung 14**), die beide im Bereich des 5' Endes des Klons liegen. Die Durchführung erfolgte wie oben und im Abschnitt Methoden beschrieben. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 10** dargestellt. Im ersten Durchlauf wurde ein deutliches Signal mit der Bank RDL-3 in einer Größe von ca. 1000 bp, mit RDL-4 ein Produkt von 2500 bp erhalten, sowie ein gut sichtbares Amplifikat in der Positivkontrolle. Im zweiten Durchlauf, mit den verdünnten Reaktionen als Matrize, wurden die Signale stärker, zusätzlich erschienen noch undeutliche Banden bei RDL-1 im Bereich von ~700-1800 bp. Die Amplifikate der Banken RDL-3 und RDL-4 wurden wie oben und im Methodenteil beschrieben in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert, die DNA präpariert und sequenziert.

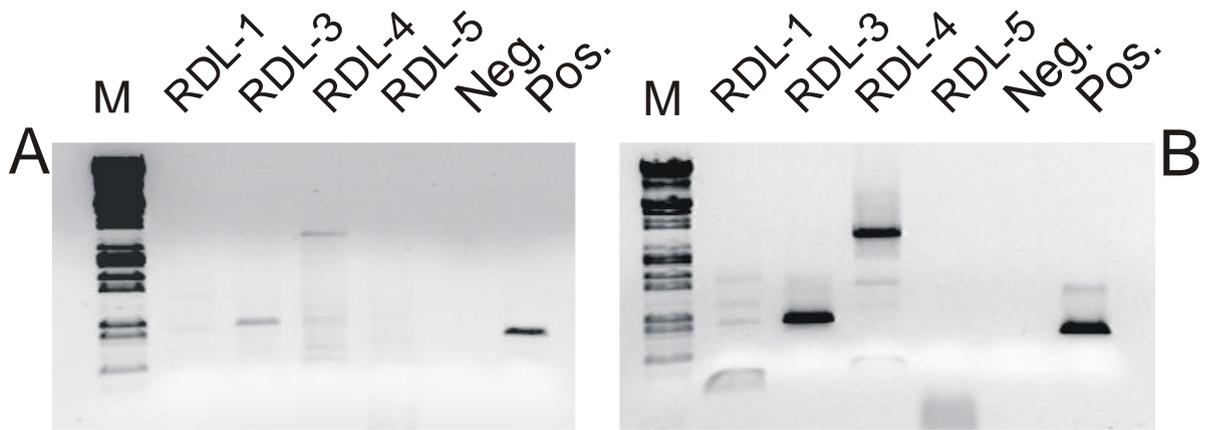
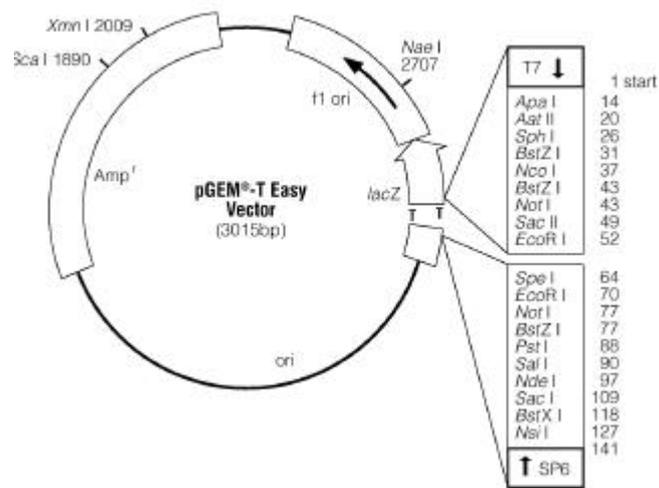


Abbildung 10: GenomeWalker™ PCR zur Verlängerung der schon erhaltenen Fragmente für die α_1 Untereinheit.

In **(A)** ist ein 1% Agarosegel mit den Produkten der ersten Amplifikationsrunde mit den Primern GWK4 α_1 Extern und ADP1 gezeigt. **(B)** zeigt ein 1% Agarosegel mit den Produkten aus der zweiten Runde mit den Primern GWK4 α_1 Intern und ADP2. Abkürzungen: RDL-1: *EcoRV* geschnittene genomische Ratten DNA, RDL-3: *DraI*, RDL-4: *PvuII* und RDL-5: *SspI*, Neg.: Negativ-Kontrolle, Pos.: Positiv-Kontrolle.

Eine Übersichtskarte des Vektors und die Übergänge Vektor zur Insertion sind in **Abbildung 11** gezeigt. Die genaue Fragment-Längen betragen: 874 bp bzw. 2629 bp, inklusive der Adaptersequenz. Beide Klone sind am 3'-Ende (Sequenz des Primers GWK4 α_1 Intern) identisch und zeigen eine 100% Similarität mit 5' Ende des Ausgangsklons.



A

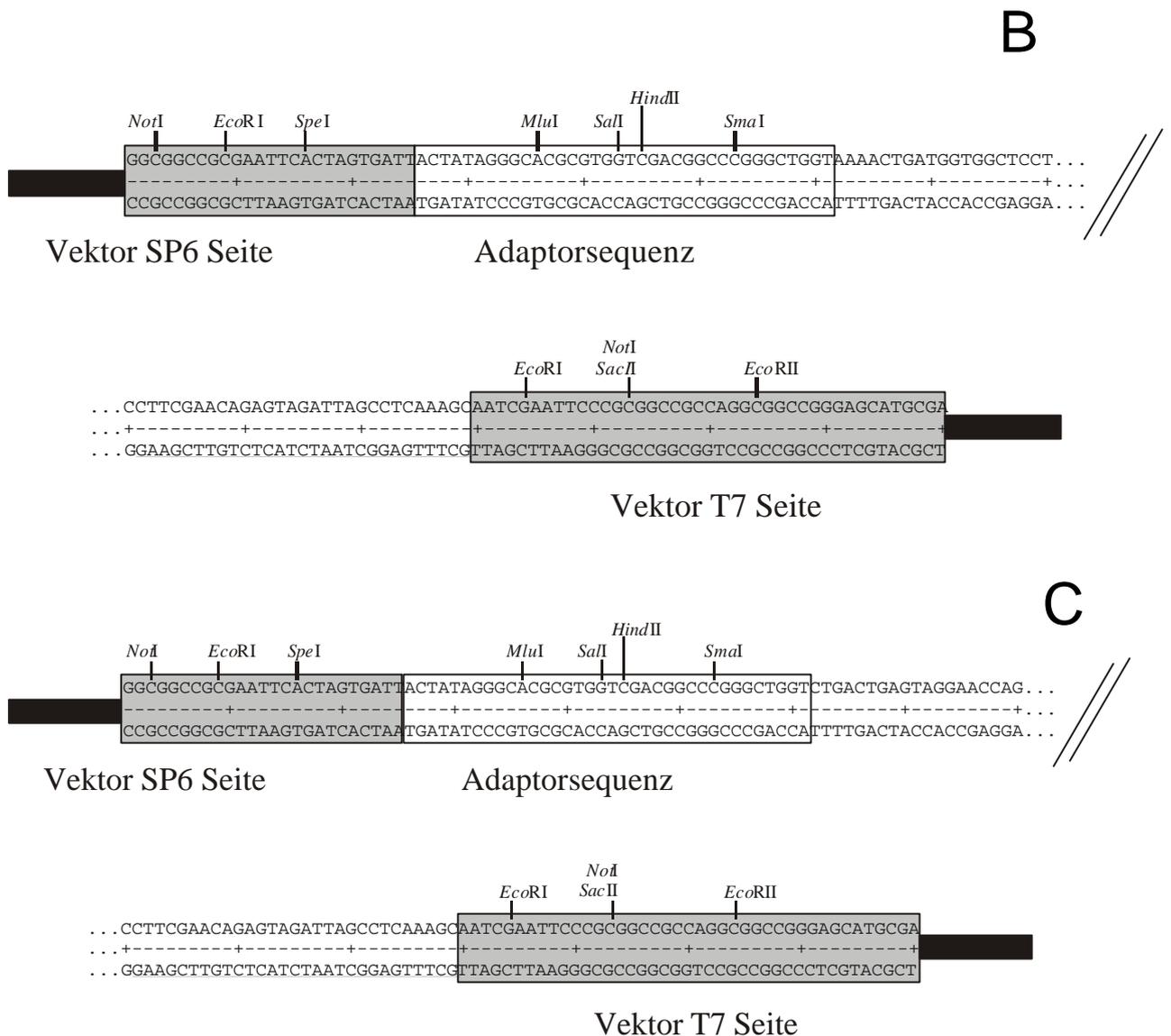


Abbildung 11: Übersichtskarte der α_1 Promotorverlängerungen.

(A) Karte des verwendeten Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy, der mit *EcoRV* geöffnet wurde. Figuren (B)/(C) zeigen jeweils eine schematische Darstellung der Übergänge von Vektor zu Insertion für den 874 bp bzw. 2629 bp langen Klon. Mit Grau und Schwarz markiert die Vektorsequenzen. Die Primer Sequenzen sind unterstrichen. Mit Rahmen gezeichnet, die Adaptersequenz des GenomeWalker[™] Kits. Ohne Markierung die Sequenz der Insertion. Die Insertion erfolgte an der *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors wie vom Hersteller vorgesehen.

Da die erhaltenen Verlängerungen nicht das 3' Ende, die ersten 300 bp des Ausgangsklons, enthalten, wurden Fusionen der beiden Klone α_1 800 und α_1 2500 mit α_1 350 konstruiert. Dazu wurde eine PCR mit genomischer DNA von *Wistar-Kyoto* Ratten als Matrize und den Primern GWK3 α_1 extern/intern (3' Ende des α_1 350 Klons) und α_1 2,5 kb extern/intern (5' Ende des α_1 2500 Klons) bzw. α_1 1,0 kb extern/intern (5' Ende des α_1 800 Klons) verwendet. Es wurden für beide Ansätze eindeutige Amplifikate gewonnen. Die DNA-Fragmente wurden

in den pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) kloniert und anschließend die Nukleotidabfolge und ihre Identität überprüft. Eine Übersicht über den verwendeten Vektor und der Übergänge Insertion zu Vektor ist in **Abbildung 12** gezeigt.

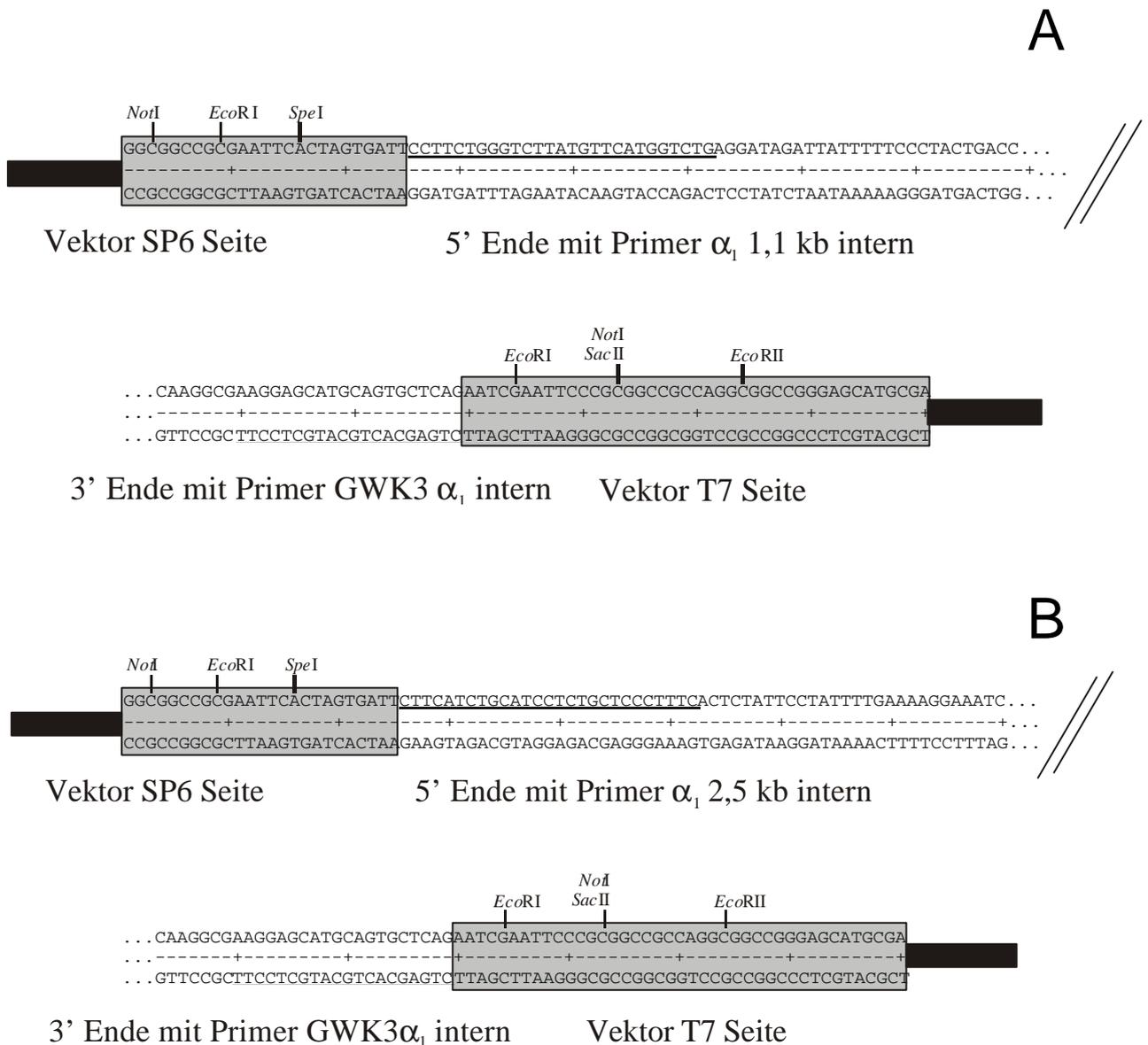


Abbildung 12: Übersichtskarte der α_1 Promotorfragment Fusionen.

(A) Darstellung der Übergänge von Vektor (pGEM[®]-T Easy) zu Insert für den 1173 bp langen Klon. (B) Darstellung der Übergänge von Vektor zu Insert für den 2848 bp langen Klon. Grau und Schwarz Vektorsequenzen, Primer Sequenz unterstrichen. Ohne Markierung die Sequenz

Insgesamt wurden sechs Klone für den α_1 Promotor erzeugt, eine Übersicht aller Klone in ihrer Lage zueinander ist in **Abbildung 13** gezeigt

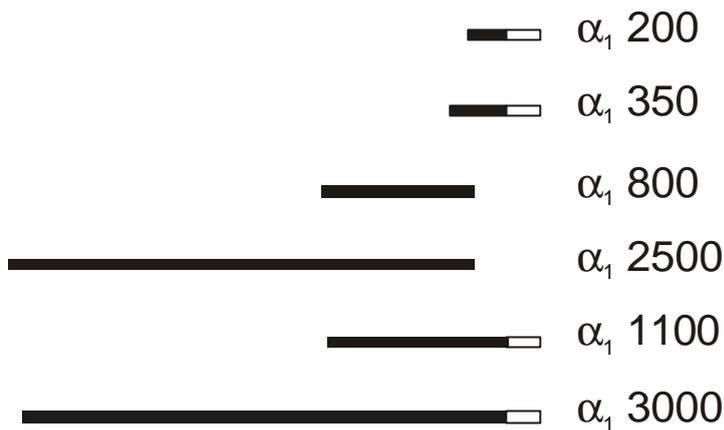


Abbildung 13: Übersicht über die in dieser Arbeit erhaltenen Klone des Promotors der α_1 Untereinheit der sGC und ihrer Lage zueinander.

Mit offenen Balken sind die Bereiche der cDNA (5'UTR) gezeigt. Die geschlossenen Balken zeigen die genomischen 5'-flankierenden Bereiche.

2.2 Nukleotid-Sequenz & *in silico* Analyse des Promotors der α_1 sGC Untereinheit

Der längste Klon der im vorherigem Abschnitt erhaltenen Promotorfragmente wurde komplett beidsträngig sequenziert. Die dafür verwendeten Primer sind in **Tabelle 15** im Abschnitt Material & Methoden aufgeführt. Bei jeder Sequenzierreaktion konnten ca. 300 bis 400 Basen gelesen werden. Ausgehend von diesen Stücken wurde dann die nächste Reaktion durchgeführt. Die erhaltenen Teilsequenzen wurden mit Hilfe des Programms CAP (contig alignment programm, HUSAR Programmpaket, DKFZ Heidelberg) aneinandergesetzt. Befreit von der Adaptersequenz des GenomeWalker™ Kits wurden 2964 Basen kloniert und sequenziert. Der Transkriptionsstart liegt bei 2884, die Sequenz von +1 bis +81 stellt das 5' Ende des α_1 5' UTR da (entspricht 213 – 287 der publizierten α_1 sGC cDNA Sequenz). Insgesamt konnten also 2864 Basen des α_1 sGC Promotors kloniert werden.

Die komplette, zusammengesetzte Sequenz wurde anschließend mit dem Programm Transfac (HUSAR, DKFZ Heidelberg) nach Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren durchsucht. Die bestimmte Sequenz des α_1 Promotors und die gefundenen Konsensussequenzen für mögliche Bindestellen von Transkriptionsfaktoren sind in **Abbildung 14** gezeigt. Die mit Hilfe der Transfac Datenbank gefundenen Homologien mit Sequenzmotiven, die putative Transkriptionsfaktoren-Bindestellen sind, sind sehr zahlreich. Insgesamt wurden 42 verschiedene Motive identifiziert (s. **Tabelle 16**). Dabei gilt es zu

beachten, dass eine beliebige Sequenz von 4 Basen statistisch alle 256 (4^4) bp vorkommt, also allein in der vorliegenden Sequenz mehr als 11 mal. Zudem lässt das angewendete Programm sogenannte „Wobble“-Basen, d.h. verschiedene Basen sind an einer Stelle des Sequenzmotivs möglich, zu. Um eine übersichtliche Darstellung der Sequenz zu ermöglichen wurden nur ausgewählte Konsensussequenzen in der **Abbildung 14** markiert. Alle gefundenen Motive auch die nicht hervorgehobenen sind der Vollständigkeit halber in der **Tabelle 17** mit Bezeichnung, Konsensussequenz, Position in der Sequenz und Literaturangabe aufgelistet.

Bei Abgleich der hier gezeigten Sequenz mit allen in der „GENBANK®/EMBL“-Datenbank gespeicherten Sequenzen wurde eine hohe Homologie mit einem bis zu 82 bp langen Element, dem sogenannten Rat Brain Identifier gefunden. Dieses Element kommt im Ratten Genom mit einer Kopienzahl von $1,5 \times 10^5$ vor. Außer in 5`Genbereichen wurde es auch in Introns intakter Gene gefunden (Schuler *et al.*, 1983) und in durch Insertion des Elements zu Pseudogenen gewordenen Genombereichen (Lemischka and Sharp, 1982). Es handelt sich um ein mobiles genetisches Element (Retroposon), das eine Rolle bei der Regulation von Genen, die ausschließlich im neuronalen Gewebe exprimiert werden, spielt (Sutcliffe *et al.*, 1982; Milner *et al.*, 1984). Die Tatsache, dass dieses Element durch reverse Transkription entstanden ist, wird durch seinen in unterschiedlichen Ratten DNA-Abschnitten mehr oder weniger erhaltenen poly(A)-Anteil dokumentiert.

Zudem wurden repetitive Sequenzmotive im Bereich von -2507 bis -2456, $(GAGA)_{13}$ und im Bereich -537 bis -494, $(GTGT)_{11}$, gefunden.

MYC CF1
 -423 ACCCACGTGTATTAACAGCATATAGGGCTGAGTGTAGTGAACCAAAATGGAAGCAAGACCT -364

5' Ende α_1 350
 -363 TACACAAAAGAAATAAT **A**TTCTCTGTGACCACAAAATTACCTTCGAACAGAGTAGATTAGC -304
GAAGCTTGTCTCATCTAATCG

3' Ende α_1 800 und α_1 2500
 -303 CTCAAAG **C**TAAAAGCCAGGCCACCAAAGCCAAGGGAGGAGAGAAAAACCTCCCCACCACG -244
GAGTTTCG GWK4 α_1 Intern
NFIL6/PEA3 E2A 5' Ende α_1 200
 -243 GTTTGAGTTTCAAATTAAGGAAGCTACAGTTGGTCTGCACCAG **C**TAGTACGAGAGAAAAG -184

SEF3 SEF3
 -183 GTTTTTGTTTTTAACGTGCCAACTTTTCTAGAGTCTCTCCTTTGTTTTCTCTTCCTTGT -124

CEBP SP1
 -123 CCCCTTCCCTGCTGTGTGTGTGTCTGGCTTTGGTGGTTGGAGGACAGCG **A**TTG **GGCGGG** -64
TAAC

LYF1
 -63 GAGCAGGACTCCGTTCTCAGGAGCTGAGCCTGGGAGGAGTGGGAGGGACTCGGAGCAGCG -4

+1
 -3 GGG **T**TCTCACACACAGCCTTCCAGGCGGTCTCTCCAGTGCCTGCCAGCCCCGACCCCAA +57

 +58 GGCGAAGGAGCATGCAGTGCTCAG +81
TTCTTCGTACGTCACGAGTC GWK3 α_1 Intern

Abbildung 14: Sequenz und *in-silico* Analyse des α_1 -Promotors.

Kognate Sequenzen sind unterstrichen, mit Kästen die Basen der Fragmentenden, fett gedruckt wurden die Primersequenzen

Tabelle 16: Liste der *in-silico* gefundenen Bindungsregionen verschiedener Transkriptionsfaktoren
 Die Angaben der Positionen beziehen sich auf die erste Base des jeweiligen Bindemotivs und die **Abbildung 14**.

Transkriptionsfaktor	Bindestelle
ABAA	-1254
ADR1	-655; -86; -68; -14; -6
AP1	-623
AP2	-1598; -1597; -1414; -734; -723; +52
AP3	-2804
BRN2	-2661; -2605; -1933; -1780; -492
BZIP910	-1648
CEBP	-1761; -91
CEBP	-1835
CF1	-2825; -2363; -380
CP2	-1831
CTCF	-1999; -1249; -1168
E2A	-1433; -218
ELK1	-2750; -2118
ETS1	-618
FLI1	-618
FREAC7	-2665; -2451; -2048
HAPF1	-1519
HNF5	-1943; -1674
ISL1	-2515
IUF1	-2255; -2032; -1856
LYF1	-2686; -35
MBFI	-1607; -430
MEF2	-2666
MNB1A, DOF2, DOF3 & PBF	-2749; -2411; -2317; -2277; -2122; -2065; -2007; -1862; -1720; -1514; -1505; -1497; -1235; -953; -918; -600; -560; -442; -357; -300; -293; -279; -187
MTF1	-1607; -430
MYB	-708
MYC	-420
NFIL6	-2357-1835; -1198; -229
NPTCII	-2007; -918
PEA3	-2747; -2630; -2355; -2232; -2115; -617; -226
PPAR	-1860; -719
SEF3	-2669; -1102; -183; -177
SP1	-71
TBP	-2053; -2044
TCF1	-2750; -2695; -2580; -2412; -2278; -2214; -2182; -2123; -2118; -1863; -1721; -1503; -1498; -1461; -1434; -1407; -1179; -954; -919; -601; -561; -443; -438; -410; -358; - 319; -301; -294; -280; -188; +8
TCF2ALPHA	-618
YI	-1168
YY1	-1347

Tabelle 17: Liste der *in-silico* gefundenen, möglicherweise bindender Transkriptionsfaktoren.

Mit Angabe der vom Programm verwendeten Konsensussequenzen und Literaturstelle (vgl. Anhang). K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = C/G, W = A/T, Y = C/T.

Akronym	Konsensussequenz	Literaturstelle für die verwendete Konsensussequenz
ABAA	CATTCY	(Andrianopoulos and Timberlake, 1994)
ADR1	KYGGRG	(Cheng <i>et al.</i> , 1994)
AP1	TGASTMA	(Piette <i>et al.</i> , 1988)
AP2	CCCMNSSS	(Winning <i>et al.</i> , 1991)
	TCCCCMNSSS	(Imagawa <i>et al.</i> , 1987)
AP3	TGTGGWWW	(Mitchell <i>et al.</i> , 1987)
BRN2	MATWAAT	(Li <i>et al.</i> , 1993)
BZIP910	TGACGT	N.N.
CEBP	ATTGC	(Pei and Shih, 1990)
	TKNNGYAAK	(Ryden and Beemon, 1989)
CF1	ANATGG	(Riggs <i>et al.</i> , 1991)
CP2	GCNMNANCMAG	(Kim <i>et al.</i> , 1990)
CTCF	CCCTC	(Lobanenkov <i>et al.</i> , 1990)
DOF2	AAAG	N.N.
DOF3	AAAG	N.N.
E2A	RCAGNTG	(Kamps <i>et al.</i> , 1991)
ELK1	MRMMGGAWRY	(Treisman <i>et al.</i> , 1992)
ETS1	SMGGAWGY	(Ho <i>et al.</i> , 1990)
FLI1	CMGGAAGT	(Zhang <i>et al.</i> , 1993)
FREAC7	WNNANATAAAYA	N.N.
HAPF1	CTGGRAA	(Majello <i>et al.</i> , 1990)
HNF5	TRTTTGY	(Grange <i>et al.</i> , 1991)
ISL1	CTAATG	(Karlsson <i>et al.</i> , 1990)
IUF1	CATYAS	(Shelton <i>et al.</i> , 1992)
LYF1	YYTGGGAGR	(Lo <i>et al.</i> , 1991)
MBF1	TGCRRC	(Imbert <i>et al.</i> , 1989)
MEF2	YTWAAATAR	(Yu <i>et al.</i> , 1992)
MNB1A	AAAG	N.N.
MTF1	TGCRNC	(Mueller <i>et al.</i> , 1988)
MYB	YAACKG	(Ness <i>et al.</i> , 1989)
MYC	CACGTG	(Prendergast <i>et al.</i> , 1991)
NFIL6	TKNNGNAAK	(Poli <i>et al.</i> , 1990)
NPTCII	ANANTTTCC	(Lattion <i>et al.</i> , 1992)
PBF	AAAG	N.N.
PEA3	AGGAAR	(Wasylyk <i>et al.</i> , 1989)
PPAR	AGGTCA	(Issemann and Green, 1990)
SEF3	RTTTTTTR	(Lessard <i>et al.</i> , 1991)
SP1	KRGGCKRRK	(Jackson <i>et al.</i> , 1990)
TBP	TATAAA	(Greenblatt, 1991)
TCF1	MAMAG	(van de <i>et al.</i> , 1991)
TCF2ALPHA	SAGGAAGY	(Waterman <i>et al.</i> , 1991)
YI	CCNCNNNCT	(Dou <i>et al.</i> , 1991)
YY1	CCWTNTTNNNW	(Shrivastava and Calame, 1994)

2.3 Klonierung der 5' flankierenden Bereiche der β_1 sGC Untereinheit

Nachdem der Transkriptionstart der β_1 Untereinheit neu bestimmt wurde. Wurde nun auf ähnliche Weise, wie für die α_1 Untereinheit beschrieben der 5' flankierende Bereich des Genes der β_1 Untereinheit kloniert. In Bereich des neu definierten 5' UTR (Untranslatierte Region) wurden folgende Primer ausgewählt: GWK β_1 Extern (96-70 bp/cDNA) und GWK β_1 Intern (58-31 bp/cDNA). Wie zuvor für die α_1 Untereinheit wurden nun zwei aufeinander folgende PCR Reaktionen durchgeführt. Aliquots der Amplifikate der 1. Reaktion wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und begutachtet (s. **Abbildung 15**). Es waren lediglich bei der Bank RDL-3 Amplifikate zu detektieren. Dennoch wurde mit 1:50 verdünnten Reaktionen als Matrize für alle Ansätze mit dem 2. PCR-Schritt fortgefahren. Erneut wurden Aliquots der Reaktionen auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Nun ließen sich bei der Bank RDL-2 (*DraI* verdaut) ein ~1500 bp und bei RDL-5 (*SspI* verdaut) ein ~ 500 bp großes Fragment detektieren, jedoch nicht bei RDL-3.

Das größere der beiden gefundenen Produkte wurde wie im Abschnitt Methoden beschrieben in einen *EcoRV* geschnittenen Vektor pBluescript[®]II SK⁺ kloniert und das Konstrukt präpariert und anschließend sequenziert. Eine Übersichtskarte des Vektor und die Übergänge von Vektor zu Insert des Klons sind in **Abbildung 16** gezeigt. Die genaue Fragment-Länge beträgt: 1354 bp inklusive der Adaptersequenz. Der 3' Bereich des Klons weist eine 100% Similarität mit dem 5' UTR der β_1 Untereinheit auf.

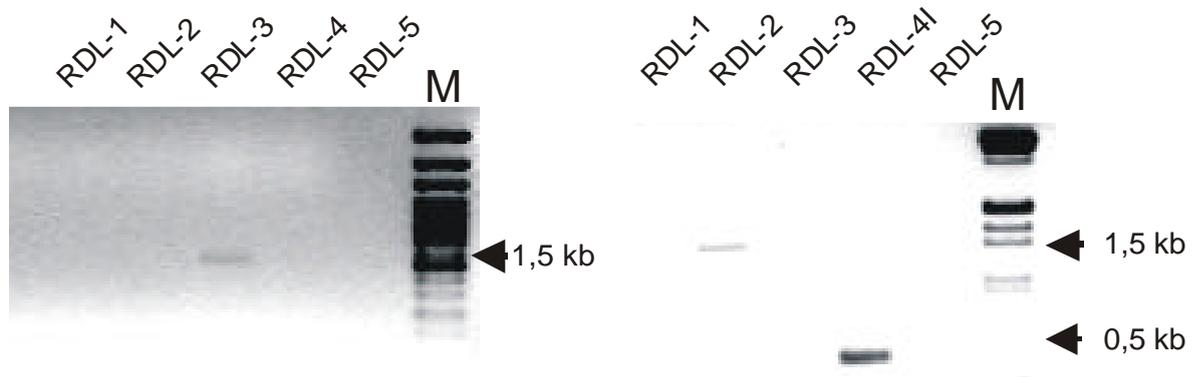
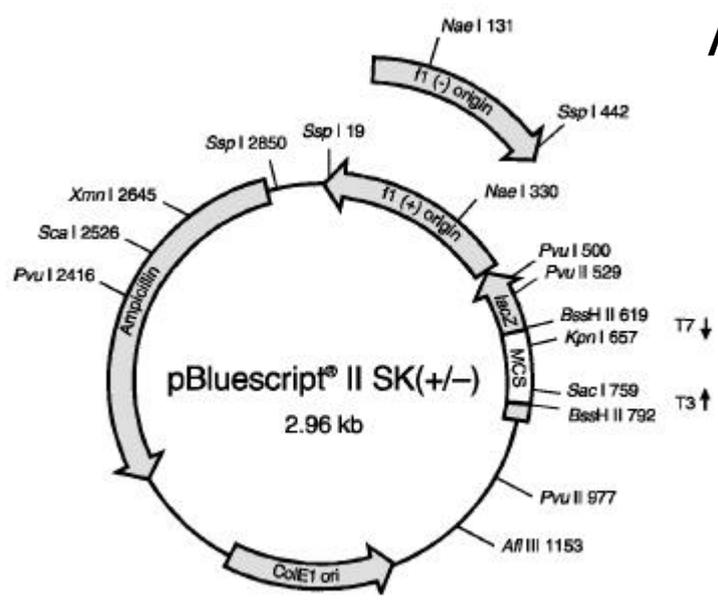
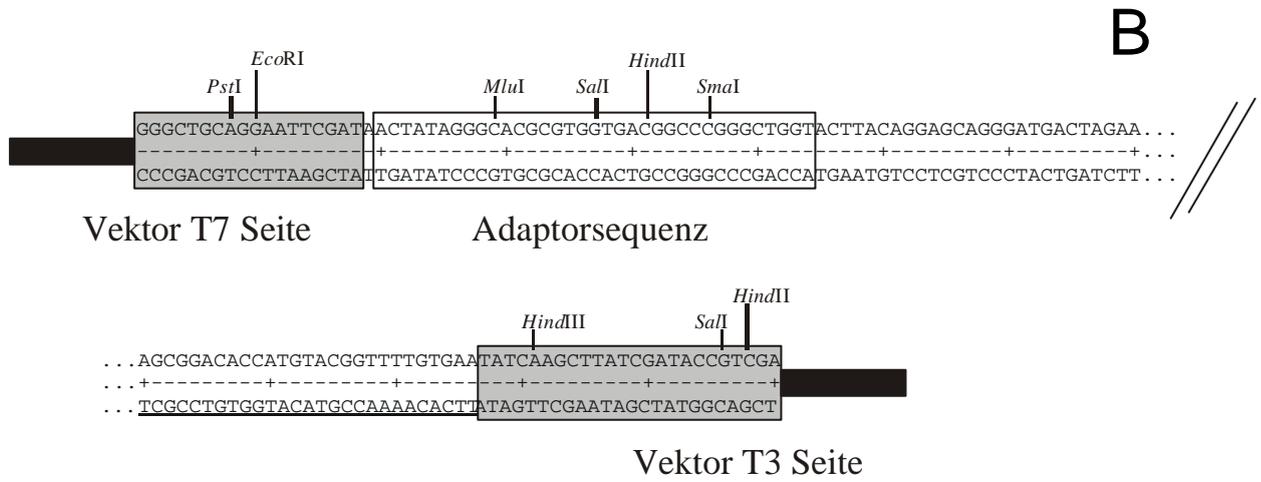


Abbildung 15: GenomeWalker[™] PCR zur Klonierung von Promotorbereichen der β_1 Untereinheit.

In (A) ein 1% Agarosegel mit den Produkten der ersten Amplifikationsrunde mit den Primern GWK β_1 Extern und ADP1. (B) Elektrophoretische Auftrennung in einem 1% Agarosegel der Produkte aus der zweiten Runde mit den Primern GWK β_1 Intern und ADP2. Abkürzungen: RDL-1: *EcoRV* geschnittene genomische Ratten DNA, RDL-2: *SacI*, RDL-3: *DraI*, RDL-4: *PvuII* und RDL-5: *SspI*.



A



B

Abbildung 16: Übersichtskarte des b₁ Klon.

(A) Karte des verwendeten Klonierungsvektor pBluescript® II SK⁺ EcoRV geschnitten. Die Figuren (B/C) zeigen die Übergänge von Vektor zu Insertion. Grau und Schwarz markiert die Vektorsequenzen, die Primersequenzen unterstrichen sind unterstrichen. Exakte Insertlänge (B) 1354 bp. Mit Rahmen gezeigt die Adaptorsequenz des GenomeWalker™ Kits. Ohne Markierung die Sequenz der Insertion.

Tabelle 18: Liste der *in silico* gefundenen Bindungsregionen verschiedener Transkriptionsfaktoren.
Die Angaben der Positionen beziehen sich auf die erste Base des jeweiligen Bindemotivs und die **Abbildung 17**.

Name	Position auf Sequenz
ADF1	-14
CF1	-1153; -1019; -908
CTCF	-159
E2A	-1021; -630; -554; -265
ECR	-893; -722
ETS1	-766; -385
GATA1, GATA2 & GATA3	-1119; -1107; -1103; -1099; -1095; -1091; -1087; -1083; -1079; -1075; - 1071; -1067; -1063; -1059; -1055; -135
HNF5	-451
NFIL6	-974; -278
PEA3	-1189; -1181; -1177; -419
SIF	-286
TCF1	-1001; -925; -704; -648; -631; -577; -555; -266; -186; -122
YY1	-281

Tabelle 19: Liste der *in silico* gefundenen, potentieller Transkriptionsfaktoren der b_1 Untereinheit.
Mit Angabe der vom Programm verwendeten Konsensussequenzen und Literaturstellen (vgl. Anhang). K = G/T,
M = A/C, R = A/G, S = C/G, W = A/T, Y = C/T.

Akronym	Konsensussequenz	Literaturstelle
ADF1	GCYGYYGYCGY	(England <i>et al.</i> , 1990)
CF1	ANATGG	(Riggs <i>et al.</i> , 1991)
CTCF	CCCTC	(Lobanenkov <i>et al.</i> , 1990)
E2A	RCAGNTG	(Kamps <i>et al.</i> , 1991)
ECR	KNTCANTNNMM	(Luo <i>et al.</i> , 1991)
ETS1	SMGGAWGY	(Ho <i>et al.</i> , 1990)
GATA1	WGATAR	(Pevny <i>et al.</i> , 1991)
GATA2	WGATAR	(Yamamoto <i>et al.</i> , 1990)
GATA3	WGATAR	(Ho <i>et al.</i> , 1991)
HNF5	TRTTTGY	(Grange <i>et al.</i> , 1991)
NFIL6	TKNNGNAAK	(Poli <i>et al.</i> , 1990)
PEA3	AGGAAR	(Wasylyk <i>et al.</i> , 1989)
SIF	CCCGTM	(Wagner <i>et al.</i> , 1990)
TCF1	MAMAG	(van de <i>et al.</i> , 1991)
YY1	CCWTNTTNNNW	(Shrivastava and Calame, 1994)

3 Basal Aktivitäten der α_1 - und β_1 -Promotoren der Ratten-sGC

Nachdem die verschiedenen Promotorfragmente beider Untereinheiten kloniert waren, sollte geprüft werden, ob die DNA-Bereiche eine basale transkriptionelle Aktivität vermitteln können. Dazu wurden die Fragmente in den Vektor pGL3-Basic (Promega), der das Gen für die Leuchtkäfer Luziferase kodiert, gebracht. Im Anhang „Plasmidkarten“ findet sich jeweils eine Übersicht und eine kurze Beschreibung der so gewonnenen Klone. Die Klone wurden in glatte Muskelzellen aus der Rattenaorta transient transfiziert und die Luziferaseaktivität mit der des Leervektors verglichen.

3.1 Basal Aktivitäten der α_1 Promotorfragmente

Die α_1 Promotorfragmente in dem Reporter-gen-Vektor pGL3-Basic: Alpha3000 (-2794 bp), Alpha1100 (- 1092 bp), Alpha350 (- 346 bp) und Alpha200 (- 200 bp) wurden transient in kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte transfiziert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Vektor pRL-TK (Promega) kotransfiziert. Dieser Vektor kodiert für die Luziferase der Renilla unter der Kontrolle eines konstitutiven viralen Promotors. Die Leuchtkäfer Luziferaseaktivität der Promotorfragmente wurde durch die Aktivität der Renilla Luziferase geteilt und so Unterschiede in der Transfektionseffizienz berücksichtigt. Die so bereinigten Werte wurden gegen die Aktivitäten der Kontrolle (Leervektor, pGL3-Basic ohne Insertion) kalibriert. Das Konstrukt mit dem längstem Promotorfragment Alpha3000 zeigte eine $8,4 \pm 2,2$ fache (SEM, n=2, im Triplett), das Konstrukt Alpha1100 eine $3,2 \pm 0,6$ fache (SEM, n=2, jeweils im Triplett), Alpha352 eine $15,1 \pm 1,8$ fache (SEM, n=3, im Triplett) und das Alpha200 Konstrukt ein $28,4 \pm 4,7$ fache (SEM, n=2, jeweils im Triplett) Steigerung der Promotoraktivität gegenüber dem Leervektor, siehe auch **Abbildung 18**. Somit zeigten alle Fragmente eine basale transkriptionelle Aktivität, die deutlich über der des Leervektors lag.

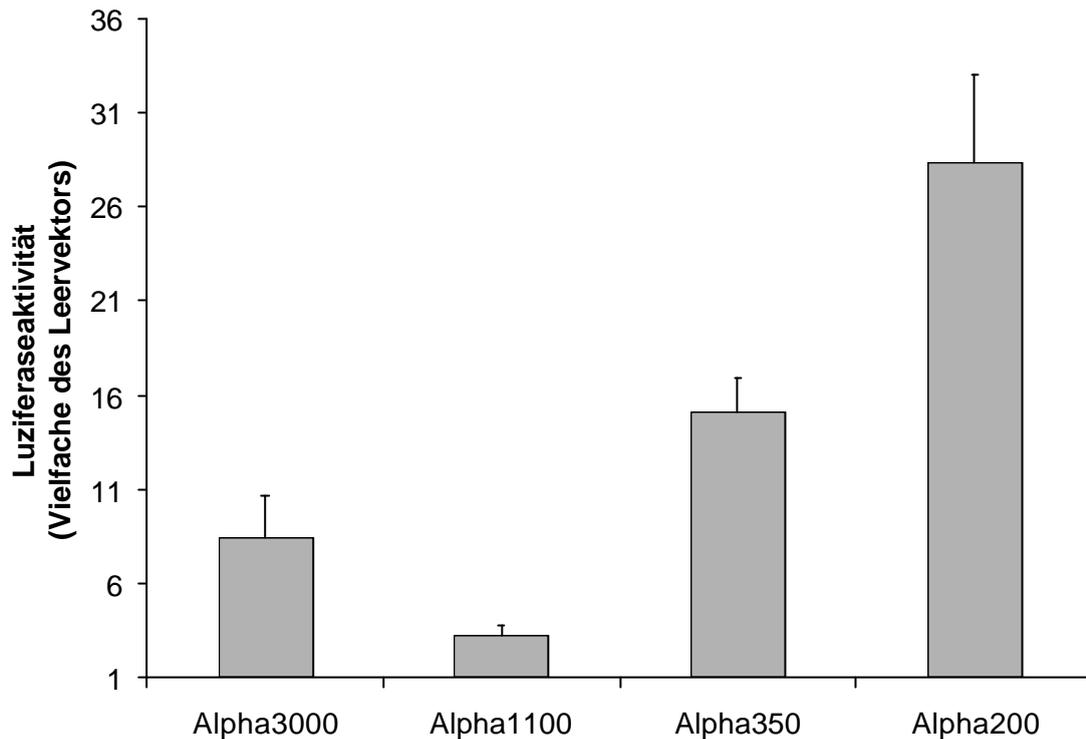


Abbildung 18: Luziferaseaktivitäten der α_1 Promotorkonstrukte im Vergleich zum Leervektor.

Die Konstrukte wurden transient in kultivierte, glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte transfiziert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Leuchtkäfer Luziferaseaktivität wurde durch die Aktivität der Renilla Luziferase geteilt und so Unterschiede in der Transfektionseffizienz berücksichtigt. Die Ergebnisse (x-Fache der Aktivität des Leervektors) sind jeweils als Mittelwerte \pm SEM von n = 2 (Alpha3000; 1100 & 200) bzw. von n = 3 (Alpha352) Transfektionen, jeweils im Triplet durchgeföhrt, angegeben

3.2 Basal Aktivitäten der β_1 Promotorfragmente

Die β_1 Promotorfragmente in dem Reporter-gen-Vektor pGL3-Basic, Beta1200 (-1287 bp), Beta564 (-564 bp), Beta312 (-312 bp) und Beta164 (-164 bp) wurden transient in kultivierte Gefäßmuskelzellen der Ratte transfiziert und die Luziferaseaktivität, wie bei den α_1 -Reporter-gen-konstrukten bestimmt. Das Konstrukt mit dem längstem Promotorfragment Beta1200 zeigte, im Vergleich zum Leervektor, eine $10,2 \pm 1,0$ fach (SEM, n=4, jeweils im Triplet), das Konstrukt Beta564 eine $14,5 \pm 2,2$ fach (SEM, n=4, jeweils im Triplet), Beta312 eine $20,9 \pm 0,6$ fach (SEM, n=4, jeweils im Triplet) und das Beta164 Konstrukt ein $12,7 \pm 1,0$ fach (SEM, n=3, jeweils im Triplet) erhöhte Aktivität (s. **Abbildung 19**). Somit zeigten alle Fragmente des β_1 -Promotors eine basale transkriptionelle Aktivität, die deutlich über der des Leervektors lag.

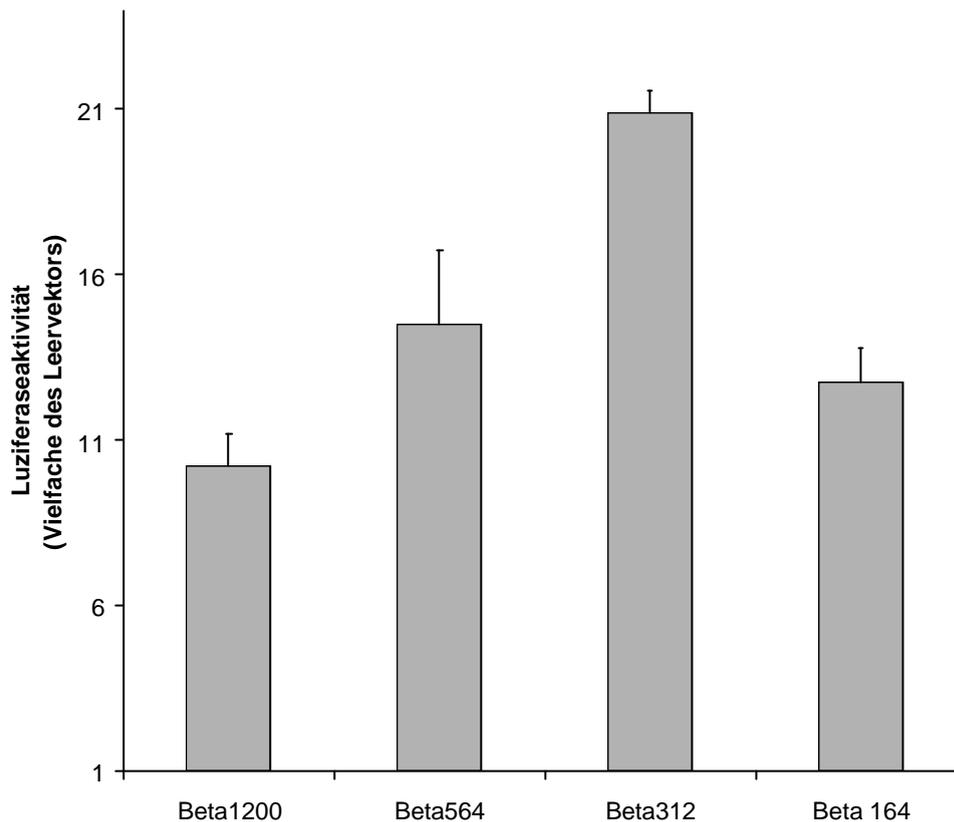


Abbildung 19: Luciferaseaktivitäten der b_1 Promotorkonstrukte im Vergleich zum Leervektor.

Die Konstrukte wurden transient in kultivierte, glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte transfiziert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Firefly Luciferaseaktivität der Promotorfragmente wurde durch die Aktivität der Renilla Luciferase geteilt und so Unterschiede in der Transfektionseffizienz berücksichtigt. Die Ergebnisse (\times Fache der Aktivität des Leervektors) sind jeweils als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ (Beta1200; 564 & 312) bzw. von $n = 3$ (Beta164) Transfektionen, die jeweils im Triplett durchgeführt wurden, angegeben.

4 Wirkung von Endothelin-1 auf die Promotoraktivität der Ratten sGC a_1 und b_1 Untereinheiten

Um die Wirkung von Endothelin-1 (ET-1) auf die Promotoraktivität der sGC-Untereinheiten zu untersuchen wurden VSMC ausgesät und nach 16 - 24 h mit den jeweiligen Reportergenkonstrukten transient transfiziert. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen für 24 h unter Serum-freien Bedingungen kultiviert und anschließend mit 10 nM ET-1 für 6 h inkubiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Vektor pRL-TK kotransfiziert. Die Leuchtkäfer Luciferaseaktivität der Promotorfragmente wurde durch die Aktivität der Renilla Luciferase geteilt und so Unterschiede in der Transfektionseffizienz berücksichtigt. Die so bereinigten Werte wurden gegen die Aktivitäten der Kontrolle (unstimuliert) kalibriert.

Das Konstrukt mit dem längstem Promotorfragment Alpha3000 (-2794 bp) zeigte eine $1,86 \pm 0,1$ fache (SEM, n=3, jeweils im Triplet), das Konstrukt Alpha350 (- 346 bp) eine $1,58 \pm 0,1$ fache (SEM, n=3, jeweils im Triplet) und das Alpha200 (- 200 bp) Konstrukt mit $1,03 \pm 0,06$ fache (SEM, n=3, jeweils im Triplet) keine Induktion der Promotoraktivität nach Stimulation (s. **Abbildung 20**). Das Konstrukt Beta1200 zeigte eine $1,547 \pm 0,06$ fache (SEM, n=7, jeweils im Triplet) Steigerung der Aktivität (**Abbildung 20**).

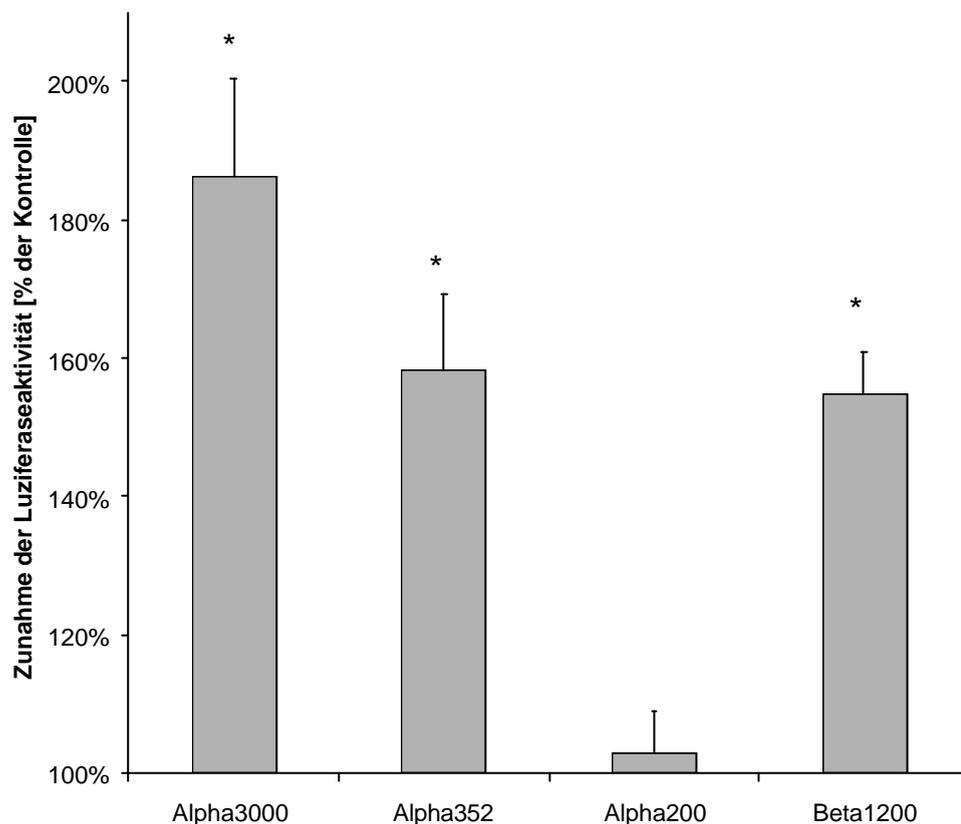


Abbildung 20: Luziferaseaktivitäten der α_1 und β_1 Promotorkonstrukte nach ET-1 Stimulation.

400.000 VSMC wurden ausgesät und nach 16 - 24 h die Konstrukte transient transfiziert. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen für 24 h unter Serum-freien Bedingungen kultiviert und anschließend mit 10 nM ET-1 für 6 h inkubiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Vektor pRL-TK wurde kotransfiziert und die Firefly Luziferaseaktivität der Promotorfragmente durch die Aktivität der Renilla Luziferase geteilt. Die so bereinigten Werte wurden gegen die Aktivitäten der Kontrolle (unstimuliert) kalibriert. Die Ergebnisse (% Zunahme gegen die Kontrolle) sind jeweils als Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Transfektionen für α_1 und für β_1 n = 7, jeweils im Triplet durchgeföhrt, angegeben (*P<0,05 vs. Kontrolle)

5 Einfluss extrazellulärer Signal auf die sGC-Expression

Um festzustellen, ob die Expression der sGC durch extrazelluläre Signale moduliert werden kann, wurde der Einfluss im kardiovaskulären System wichtiger Signalmoleküle, auf die sGC-mRNA in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Dazu wurden kultivierte glatte Muskelzellen der Ratte (*Wistar*) (VSMC) zwischen Passage 8 und 20 bei Erreichen von ca. 70% Konfluenz für 24 h unter Serum-freien Bedingungen und anschließend für 6 h mit Endothelin-1 oder Angiotensin II inkubiert. Die RNA-Präparation, Reverse Transkription und PCR wurden wie in Material & Methoden beschrieben durchgeführt.

5.1 Wirkung von Angiotensin II

Um den Zeitrahmen, in dem Angiotensin II (AngII) die mRNA Expression der sGC beeinflusst, zu bestimmen, wurden VSMC für 6, 8 und 24 h mit 100 nM AngII inkubiert. Anschließend wurde eine RT-PCR für beide Untereinheiten und den Elongationsfaktor II (*eloII*) als endogene Kontrolle durchgeführt. **Abbildung 21** zeigt ein exemplarisches Ergebnis.

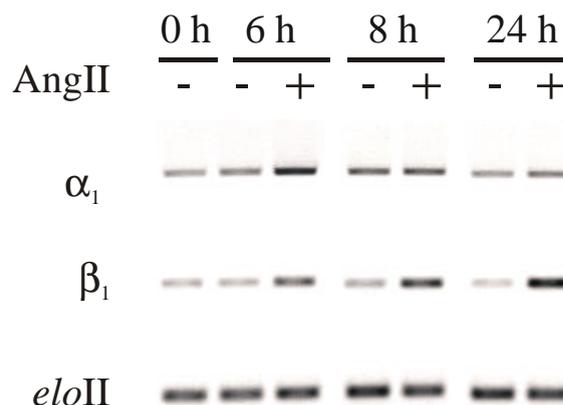


Abbildung 21: RT-PCR Analyse der mRNA-Expression der sGC α_1 -und β_1 -Untereinheit nach AngII Stimulation.

VSMC wurden bei Erreichen von ~70% Konfluenz für 24 h unter Serum-freien Bedingungen kultiviert und anschließend mit 100 nM AngII für 6 h inkubiert. Die Gesamt RNA wurde präpariert und mit 1 μ g eine RT durchgeführt. Für die PCR wurden pro Ansatz 100 ng eingesetzt. α_1 sGC 28 Zyklen, β_1 sGC und *eloII* 26 Zyklen. Ethidiumbromid gefärbtes 1% Agarosegel.

Die α_1 Untereinheit zeigte eine deutliche Verstärkung der mRNA Expression nach 6 h. Nach 8 h und 24h war nur eine sehr schwache Induktion sichtbar. Die β_1 Untereinheit wurde jedoch zu allen drei Zeitpunkten deutlich induziert.

5.2 Wirkung von ET-1 auf die mRNA Expression der sGC Untereinheiten

Dazu wurden kultivierte glatte Muskelzellen der Ratte (*Wistar*) zwischen Passage 8 und 20 bei Erreichen von ca. 70% Konfluenz für 24 h unter Serum-freien Bedingungen und anschließend für 6 h mit ET-1 inkubiert. Die RNA-Präparation, Reverse Transkription und PCR wurden wie in Material & Methoden beschrieben durchgeführt.

Um den Konzentrationsbereich in dem ET-1 auf die mRNA der sGC Wirkung zeigt, zu bestimmen, wurden VSMC der Ratte (*Wistar*) für 6 h mit 100, 10 und 1 nM ET-1 inkubiert. Anschließend wurde eine RT-PCR für beide Untereinheiten und die endogene Kontrolle durchgeführt. **Abbildung 22** zeigt exemplarisch eines der erhaltenen Ergebnisse. Bei allen drei Konzentrationen zeigt sich eine deutliche Induktion der mRNA Expression beider Untereinheiten der sGC. Die stärkste Induktion wurde mit 10 nM ET-1 erreicht. ET-1 zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit da 100 nM ET-1 eine schwächere Steigerung der mRNA Expression für α_1 und β_1 bewirkte als 10 nM.

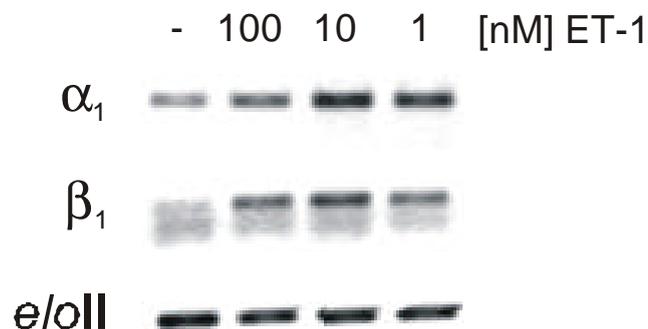


Abbildung 22: Repräsentatives Ergebnis einer Analyse der Expression der α_1 und β_1 sGC Untereinheiten nach ET-1 Stimulation.

VSMC wurden bei Erreichen von ~70% Konfluenz für 24 h unter Serum-freien Bedingungen kultiviert und anschließend mit 1, 10 oder 100 nM ET-1 für 6 h inkubiert. Gesamt RNA wurde präpariert und mit 1 μ g eine RT durchgeführt. Für die PCR wurden pro Ansatz 100 ng eingesetzt. α_1 sGC 28 Zyklen, β_1 sGC und *e/oII* 26 Zyklen. Ethidiumbromid gefärbtes 1% Agarosegel.

Abbildung 23 zeigt die densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Versuchen. 100 nM ET-1 bewirkt hier bei der α_1 Untereinheit eine 2,6fachen (SEM \pm 1,0), bei β_1 einen 2,84fachen (SEM \pm 0,8) Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. 10 nM ET-1 induziert α_1 um das 2,96fachen (SEM \pm 0,8) und β_1 3,2fach (SEM \pm 0,8). Eine Konzentration von 1 nM ET-1 bewirkte eine 3,1fache (SEM \pm 0,6) Steigerung der mRNA Expression für α_1 und für β_1 eine 2,5fache (SEM \pm 1,1). ET-1 bewirkte somit eine signifikante Induktion der α_1 und β_1 Untereinheiten bei einer maximal wirksamen Konzentration von 10 nM.

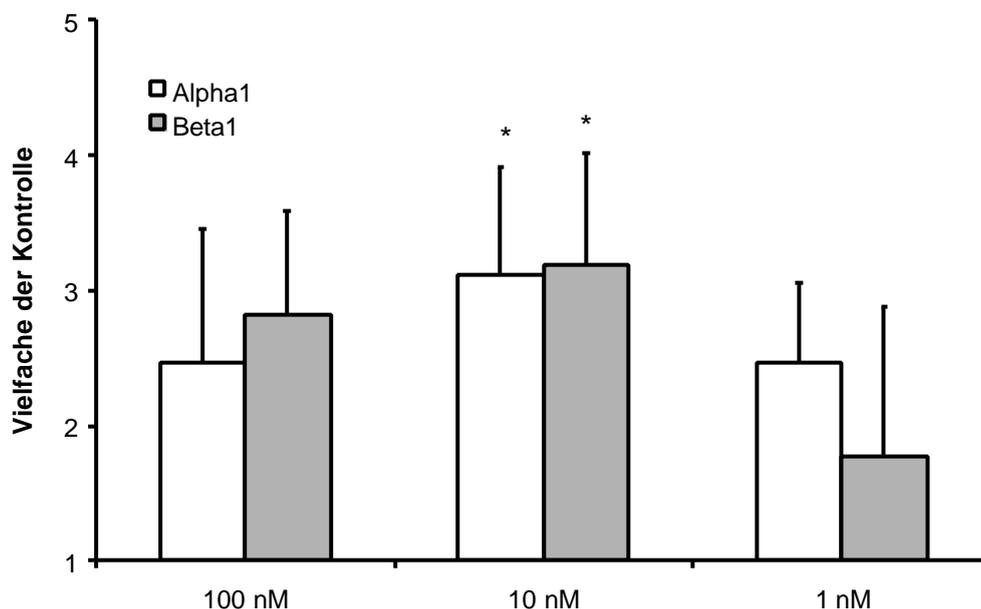


Abbildung 23: Summarische Auswertung der RT-PCR Daten nach ET-1 Stimulation.

Die Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die Signale densitometrisch (GelDoc System, Biorad) vermessen. Die Messungen wurden gegen die endogene Kontrolle *eloII* normalisiert und gegen die Kontrolle (1fach) kalibriert. Gezeigt ist eine statistische Auswertung aus 4 unabhängigen Experimenten (n = 4 pro Bedingung, Mittelwert \pm SEM, *P<0,05 vs. Kontrolle).

6 Identifizierung des beteiligten ET-Rezeptors

Um den an der ET-1 vermittelten Induktion der sGC mRNA beteiligten Endothelin Rezeptor zu identifizieren, wurden spezifische Rezeptorblocker verwendet. BQ123 ein für den ET_A-Rezeptor und BQ788 ein für den ET_B-Rezeptor spezifischer Rezeptorblocker. Es wurden VSMC zwischen Passage 8 und 20 verwendet. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von ~70% Konfluenz kultiviert, dann für 24 h unter Serum-freien Bedingungen inkubiert. Es

folgte eine 30 Min Inkubation mit 1 μM des jeweiligen Antagonisten und 6 h mit 10 nM ET-1. Anschließend wurde die RNA präpariert, eine Reverse Transkription erfolgte und die mRNA Menge der β_1 -Untereinheit wurde durch eine Real-Time PCR (TaqMan, ABI) relativ quantifiziert (s.a. Material & Methoden).

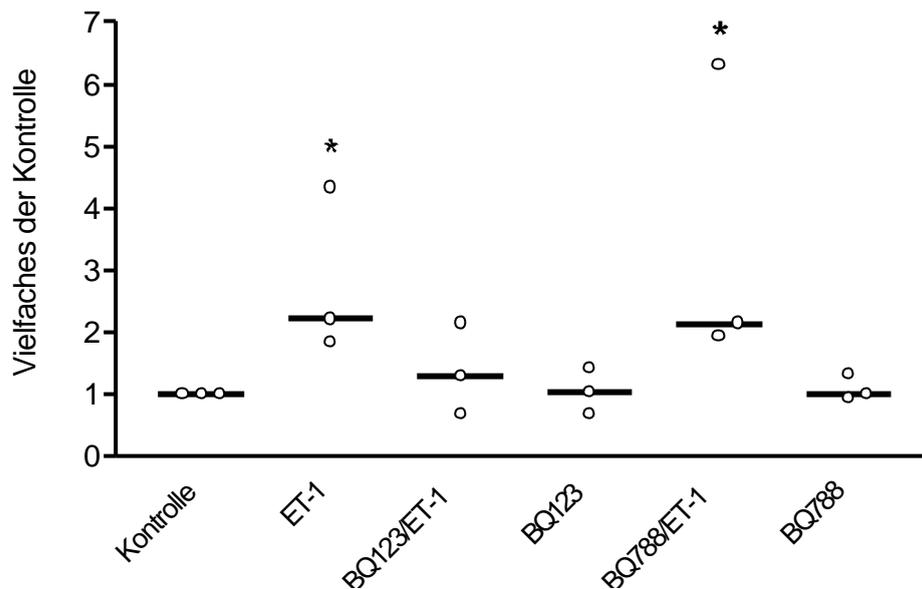


Abbildung 24: Expression der β_1 -sGC mRNA in ET-1 stimulierten VSMC.

Zellen zw. Passage 8 & 20 wurden verwendet. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von ~70% Konfluenz kultiviert, dann für 24 h unter Serum-freien Bedingungen inkubiert. Es folgte eine 30 Min Inkubation mit 1 μM des jeweiligen Antagonisten und 6 h mit 10 nM ET-1. Anschließend wurde die RNA präpariert, eine Reverse Transkription erfolgte und die mRNA Mengen der β_1 -Untereinheit wurde durch eine Real-Time PCR (TaqMan, ABI) relativ quantifiziert. Die Ergebnisse (% der Kontrolle) sind jeweils als Mediane (schwarze Balken) von $n = 3$ (jeweils im Triplett durchgeführt) und als Mittelwerte der Triplets (offene Kreise) pro Bedingung angegeben. * $0,02 < P > 0,01$, berechnet mit einem Kruskal-Wallis und einem nachfolgenden multiplen Tukey-Typ Vergleichstest (Zar, 1996), im Vergleich zur Kontrolle.

Es zeigte sich, dass sich die Induktion der β_1 mRNA durch ET-1 (2,21fach) mit BQ123 um mehr als 50% (1,28fach) reduzieren lässt. BQ123 allein hat keinen Effekt (1,03fach) auf die β_1 Expression. Die Vorbehandlung mit BQ788 hatte ebenfalls keine Wirkung auf den ET-1 Effekt (2,14fach), allein hat es keine signifikante Veränderung der mRNA Menge verursacht (0,98fach). Für die β_1 Untereinheit lässt sich festhalten, dass die Induktion sich nur über den Antagonisten blockieren lässt, der auf den ET_A -Rezeptor wirkt, welcher somit die ET-1 Effekte vermittelt.

7 Wirkung von ET-1 auf die NO induzierte Gefäß-Relaxation der Rattenaorta

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ET-1 die auf die mRNA-Expression und Promotoraktivität beider Untereinheiten der sGC steigert, stellte sich die Frage, inwieweit dieser Befund Auswirkung auf die NO vermittelte Relaxation von Gefäßen hat.

7.1 SNP-induzierte Relaxation

Um diese Frage zu klären wurden endothel-freie Aortenringe der Ratte (*Wistar-Kyoto*) für 4 h mit 10 nM ET-1 in Serum-freien Medium inkubiert und anschließend in einem Organbad (Schuler-Organbad, Hugo Sachs Electronic) in Krebs-Henseleitlösung (pH 7.4, 37°C) zur Messung der isometrischen Kontraktion eingespannt, mit 2,5 g passiver Spannung gedehnt und mit 1 µM Phenylephrin (PE) vorkontrahiert. Nach Erreichen einer stabilen Kontraktion wurden die Ringe mit steigenden Konzentrationen (0,1 nM – 0,5 µM) des NO-Donors Natrium Nitroprussid (SNP) relaxiert (s. auch Material & Methoden).

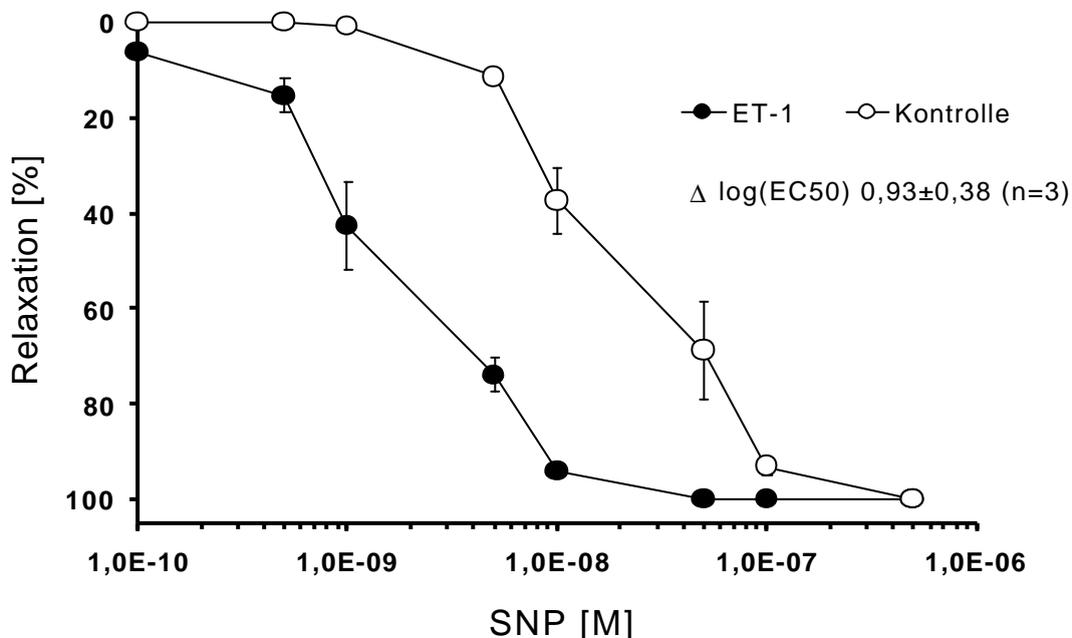


Abbildung 25: SNP-induzierte Relaxation ET-1 behandelter endothel-freier Aorten Ringe.

Endothel-freie Ringe der thorakalen Aorta von WKY-Ratten wurden mit 10 nM ET-1 für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert und mit PE kontrahiert. Anschließend wurden die Gefäße durch Gabe des NO-Donors SNP relaxiert. Die Ergebnisse (% Relaxation) sind jeweils als Mittelwerte \pm SD von n = 3 Aortenringen von 3 verschiedenen Ratten pro Gruppe angegeben.

Es zeigte sich, dass die behandelten Aorten deutlich sensitiver auf NO reagierten. Der EC_{50} Wert der Kontrolle lag bei $16,4 \pm 6,3$ nM (SD, n=3), die der ET-1 behandelten Aorten bei $2,0 \pm 1$ nM (SD, n=3) SNP, die Differenz ($\Delta \log EC_{50}$) betrug nahezu eine Zehnerpotenz ($0,93 \pm 0,38$). Die Aorten waren schon bei einer SNP Konzentration von ca. 5 nM (ET-1) statt 50 nM (Kontrolle) zu 100% relaxiert (s. **Abbildung 25**). ET-1 verstärkte somit signifikant die NO-induzierte Relaxation endothel-freier Rattenaorten.

7.2 Forskolin-induzierte Relaxation

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ET-1 die mRNA-Expression der sGC als auch die NO induzierte Relaxation verstärkt, stellte sich die Frage, inwieweit ET-1 den Kontraktilen Apparat der glatten Gefäßmuskulatur direkt beeinflusst. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass auch die cAMP-vermittelte Gefäßrelaxation durch ET-1 verstärkt wird. es wurde daher untersucht, ob ET-1 Vorbehandlung die Forskolin-induzierte Gefäßrelaxation beeinflusst. Forskolin ist ein direkter Aktivator der Adenylyl Zyklase und bewirkt eine Gefäßrelaxation durch Erhöhung des glattmuskulären cAMP.

Hierzu wurden wiederum endothel-freie Aortenringe für 4 h mit 10 nM ET-1 in Serum-freien Medium inkubiert und anschließend in einem Organbad zur Messung der isometrischen Kontraktion eingespannt, mit 2,5 g passiver Spannung gedehnt und mit 1 μ M Phenylephrin (PE) vorkontrahiert. Nach Erreichen einer stabilen Kontraktion wurden die Ringe mit steigenden Konzentrationen (10 nM – 300 nM) von Forskolin relaxiert (s. auch Material & Methoden).

Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Relaxationsverhalten zwischen Kontrolle und ET-1 behandelten Gefäß-Ringen gab (s. **Abbildung 26**). Die cAMP vermittelte Relaxation der Rattenaorten wird daher nicht durch eine ET-1-Vorbehandlung beeinflusst.

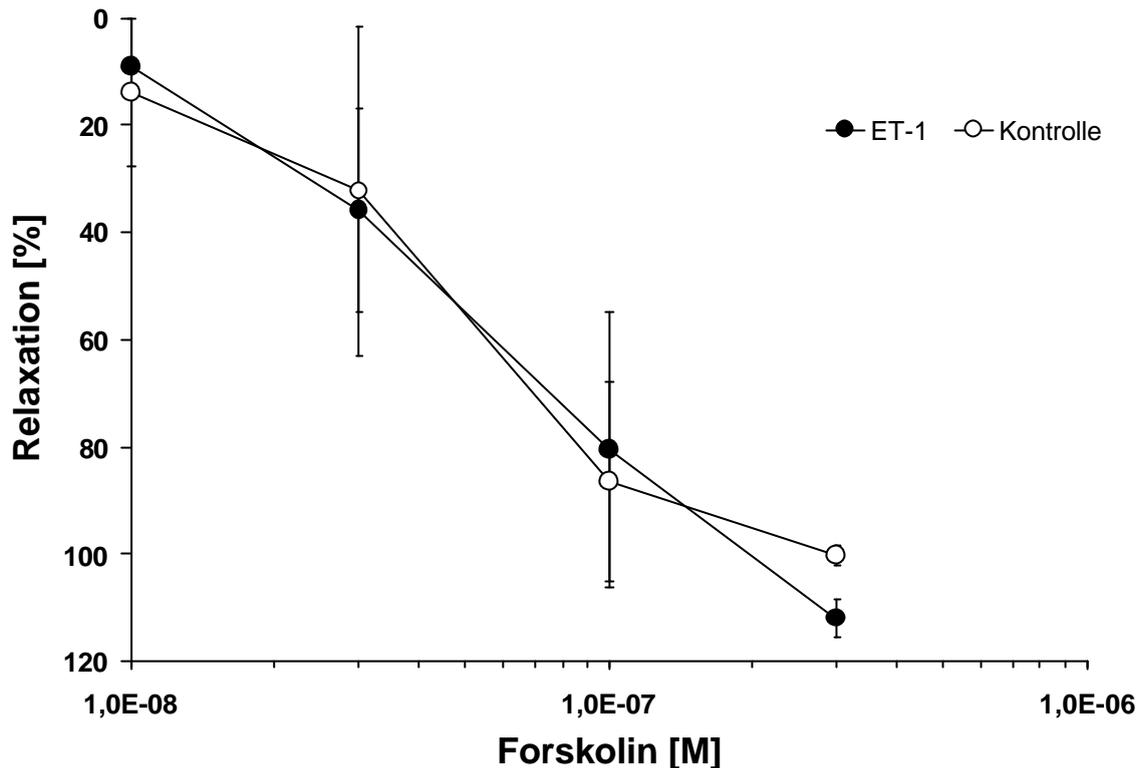


Abbildung 26: Forskolin induzierte Relaxation ET-1 behandelter endothel-freier Aortenringe der Ratte.

Endothel-freie Ringe der thorakalen Aorta von WKY-Ratten wurden mit 10 nM ET-1 für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert und mit PE kontrahiert. Anschließend wurden die Gefäße durch Gabe von Forskolin relaxiert. Die Ergebnisse (% Relaxation) sind jeweils als Mittelwerte \pm SD von n=3 Aortenringen von 3 verschiedenen Ratten pro Gruppe angegeben.

7.3 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ET-1 sowohl die mRNA-Expression der sGC als auch auf die NO induzierte Relaxation steigert ohne die cAMP vermittelte Relaxation zu beeinflussen. Es stellte sich nun die Frage, ob neben einer Veränderten Expression der sGC die beobachteten Effekte auch durch eine Modifikation weiter down-stream gelegener Elemente der cGMP Signalkaskade, z.B. der Proteinkinase GI, zu erklären sind. Hierzu wurden wiederum endothel-freie Aortenringe für 4 h mit 10 nM ET-1 wie oben beschrieben behandelt und mit PE vorkontrahiert. Nach Erreichen einer stabilen Kontraktion wurden die Ringe mit steigenden Konzentrationen (1 μ M – 30 μ M) von 8-Br-cGMP (einem metabolisch stabilen cGMP Analogon) und direktem Aktivator der Proteinkinase GI relaxiert (s. auch Material & Methoden).

Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Relaxationsverhalten zwischen Kontrolle und ET-1 behandelten Gefäß-Ringen gab (s. **Abbildung 26**). ET-1 beeinflusst also nicht Bestandteile der Signal-Transduktionskette der cGMP vermittelten Relaxation, die der löslichen Guanylyl Zyklase nachgeschaltet sind.

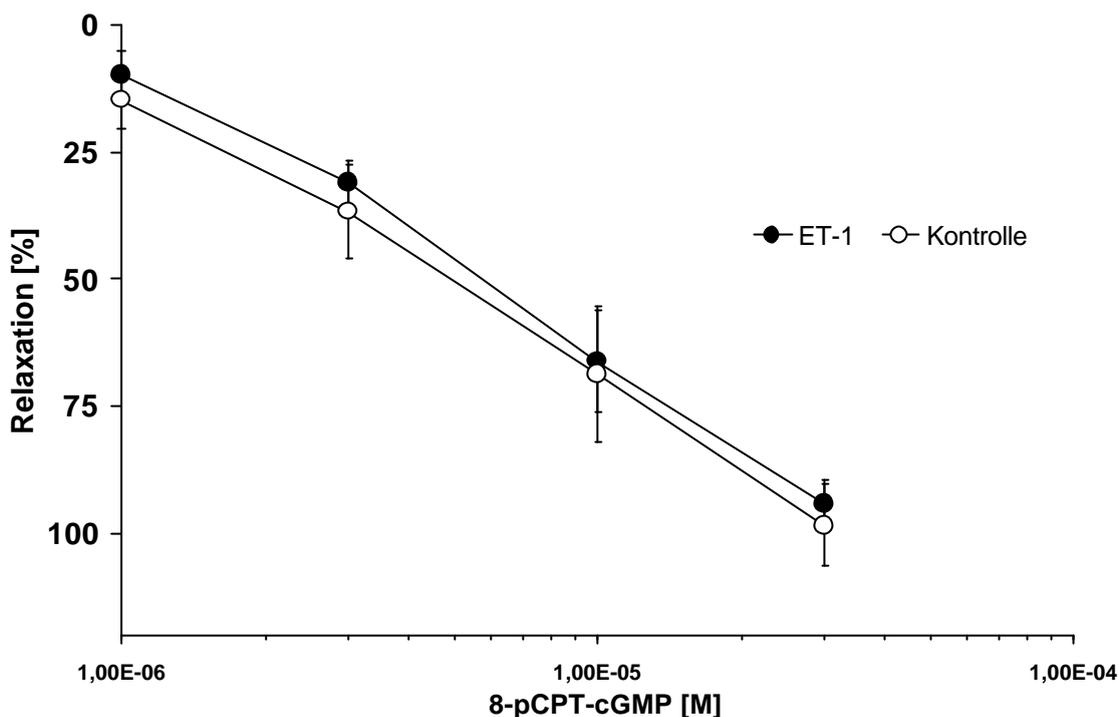


Abbildung 27: 8-Br-cGMP induzierte Relaxation ET-1 behandelter endothel-freier Rattenaorten.

Endothel-freie Ringe der thorakalen Aorta von WKY-Ratten wurden mit 10 nM ET-1 für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert und mit PE kontrahiert. Anschließend wurden die Gefäße 8-Br-cGMP relaxiert. Die Ergebnisse (% Relaxation) sind jeweils als Mittelwerte \pm SD von n=3 (Kontrolle) und n=4 (ET-1) Aortenringen von 3 verschiedenen Ratten pro Gruppe angegeben.

8 Wirkung von ET-1 auf die NO-abhängige sGC-Aktivität

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass ET-1 sowohl die Promotor Aktivität der α_1/β_1 sGC als auch die mRNA Expression beider Untereinheiten erhöht. Darüber hinaus zeigte sich eine deutliche Zunahme der NO-Sensitivität bei der SNP-induzierten Relaxation endothel-freier, thorakaler Rattenaorten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Effekte nicht durch tiefer gelegene Abschnitte des cGMP Signalkette oder

durch Modifikation des cAMP Signalweges vermittelt wurden. Nun stellte sich die Frage, inwieweit sich diese Beobachtungen auf Ebene der Enzymaktivität der sGC widerspiegeln. Hierzu wurden sGC-Aktivitätstests mit thorakaler Rattenaorta, glatten Muskelzellen aus thorakaler Rattenaorta und zusätzlich mit Schweine Koronargefäßen durchgeführt.

Zur Bestimmung der sGC Aktivität in thorakalen Rattenaorten (Wistar), wurden Aorten entnommen, vom Endothel befreit und in Serum-freien Medium für 6 h mit bzw. ohne ET-1 [10 nM] inkubiert. Die Proben wurden anschließend in fl. N₂ schockgefroren, homogenisiert und aufgearbeitet (vgl. Material & Methoden).

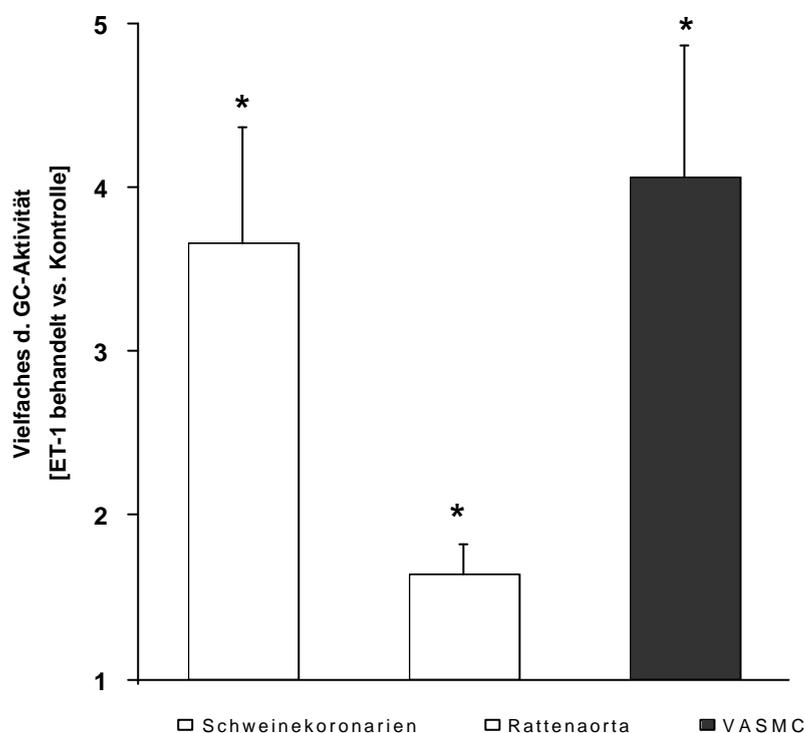


Abbildung 28: sGC Aktivitätsmessung in verschiedenen Geweben nach ET-1-Behandlung

Es wurden 30 bis 60 µg Gesamtprotein aus den homogenisierten Geweben bzw. Zellen für den Enzym-Essay eingesetzt. Die SNP [100 µM] stimulierte sGC-Aktivität ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) wurde durch katalytische Umsetzung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ zu $[\text{}^{32}\text{P}] \text{cGMP}$ bestimmt und die Relation zwischen Kontrolle und ET-1 [10 nM] stimuliert gebildet (gezeigt ist die Vielfache Induktion, Kontrolle=1). Statistische Auswertung aus 4 (Koronargefäße) bzw. 3 (VASMC und Aorten) unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM, * $P < 0,05$).

Zur Bestimmung der sGC Aktivität in glatten Muskelzellen aus der thorakalen Rattenaorta (Wistar), wurden Zellen (Passage 8-12) bis zum Erreichen von 70% Konfluenz kultiviert und in Serum-freien Medium für 24 h gehungert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 nM ET-

1 bzw. ohne ET-1 für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie in Abschnitt **III2.28** beschrieben aufgearbeitet.

Zur Bestimmung der sGC Aktivität in Koronargefäßen des Schweins wurden Koronarien entnommen, vom Endothel befreit und in Serum-freien Medium für 6 h mit bzw. ohne ET-1 [10 nM] inkubiert. Die Proben wurden anschließend in fl. N₂ schockgefroren, homogenisiert und aufgearbeitet (vgl. Material & Methoden).

Die Tests erfolgten wie in Material & Methoden beschrieben. Für den Vergleich zwischen Kontrolle und ET-1 behandelten Proben wurden nur die Umsatzraten gemessen, die durch eine maximal-wirksame Konzentration des NO-Donors SNP erzeugt wurden. Die erhaltenen Umsatzraten (nmol * min⁻¹ * mg⁻¹) wurden zu der sGC-Aktivität der Kontrolle in Relation gesetzt und so die Vielfache Steigerung berechnet. Für die Koronargefäße des Schweins wurde eine signifikante (P < 0,05 vs. Kontrolle) Steigerung der Enzymaktivität von 3,7 ± 0,7 (SEM, bei n = 4) gefunden (s. **Abbildung 28**). Die glatten Muskelzellen der Rattenaorta (VSMC) zeigten eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität von 4,07 ± 0,8 (SEM, bei n = 4), und für die Rattenaorten wurde eine signifikante Induktion der Enzymaktivität von 1,64 ± 0,19 (SEM, bei n = 3) ermittelt.

V Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Wirkungen von endogenen Vasopressoren auf die transkriptionelle Regulation und Expression der sGC der Ratte zu untersuchen. Dazu wurden die Promotoren der beiden sGC-Untereinheiten α_1 und β_1 kloniert. Mit Hilfe von Promotor-Konstrukten wurde anschließend untersucht, durch welche extrazellulären Signale die Transkription der sGC-Untereinheiten beeinflusst werden kann. Mit Hilfe von Funktionstests (Gefäßtonusmessungen) wurden außerdem die biologischen Auswirkungen der veränderten sGC-Expression untersucht.

1 **Klonierung der Promotoren und Bestimmung des Transkriptionsstarts**

Um den Mechanismus der transkriptionellen Kontrolle der mRNA-Expression der sGC untersuchen zu können, mussten die 5' flankierenden Sequenzen der beiden sGC- Gene kloniert werden. Da die genomische Struktur beider Gene in der Ratte nicht bekannt war, wurde zunächst versucht von dem 5' Bereich der kodierenden Sequenzen ausgehend flankierende, regulative Bereiche zu finden. Das klassische Verfahren, das Durchsuchen einer genomischen Phagenbibliothek der Ratte mit Sonden aus den 5' Bereichen der publizierten mRNA/cDNA (Nakane *et al.*, 1990); (Nakane *et al.*, 1988) führte leider zu keinen Klonen, die im direkten Kontakt mit der cDNA/mRNA Sequenz der sGC-Untereinheiten standen (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher eine andere, PCR-basierende Technik verwandt, um die 5' flankierenden, genomischen Bereiche zu klonieren. Bei dieser Methode muss von dem Bereich des Transkriptionsstarts (auf Exon I) des Gens ausgegangen werden, da die mit dieser Technik zu erwartende Klone eine Größe von 6000 bp nicht übersteigt (ClonTech, 1999) und somit ein eventuelles Intron das Erreichen der 5' flankierenden Bereiche verhindern könnte. Um sicher zu gehen mit Sequenzen aus dem Bereich des ersten Exons zu arbeiten, wurde daher zunächst eine Bestimmung des Transkriptionsstart für beide Untereinheiten der Ratte durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass vor allem die α_1 -Untereinheit starke Abweichungen in der Nukleotidsequenz im Bereich des 5'UTRs im Vergleich mit der von Nakane et al. (1990) publizierten Sequenz aufweist (s. **Abbildung 6**). So fehlten die ersten 213 bp der publizierten Sequenz in den hier gefundenen Klonen. Es war daher anzunehmen,

dass es sich bei dieser Region um einen Klonierungsartefakt handelt. Es ergab sich somit für die Klonierung des α_1 -Promotors ein neuer Ausgangsbereich im 5' UTR der α_1 -Untereinheit mRNA.

Im Gegensatz hierzu wurde die 5'-UTR für die β_1 -Untereinheit nur um 30 bp verlängert (**Abbildung 7**), diese neue Nukleotidsequenz wies zudem eine beinahe 100%ige Übereinstimmung mit der murinen Sequenz (Gansmans *et al.*, 1997) auf (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von der nun bekannten Lage des Transkriptionsstart wurde nun erneut versucht die genomischen 5' flankierenden Regionen der beiden sGC-Untereinheiten zu klonieren.

2 Identifizierung und in-silico Analyse der a_1 - und b_1 -Promotoren

Durch wiederholtes Anwenden der PCR-basierten GenomeWalkerTM Technik konnte letztlich die Sequenz von 2864 Basen, 5' des neu definierten Transkriptionsstart der α_1 -Untereinheit, bestimmt werden (**Abbildung 14**). Für die 5' flankierende Region des β_1 -Gens konnten 1316 bp kloniert werden (**Abbildung 17**). Durch eine eingehende *in-silico* Untersuchung der Sequenzen mit dem Husar Programmpaket des DKFZ Heidelberg, basierend auf der Bindemotivdatenbank Transfac der GBF Braunschweig, wurden zahlreiche, potentielle Transkriptionsfaktoren-Bindungsmotive gefunden (s. **Tabelle 16** und **Tabelle 18**). Über die Rolle der gefundenen Bindemotive lässt sich jedoch an dieser Stelle noch keine Aussage machen, da man berücksichtigen muss, dass das Vorhandensein der Similarität zu bekannten Nukleotid-Abfolgen, an die Transkriptionsfaktoren in anderen Promotoren binden, zufällig sein kann. Es lässt sich lediglich feststellen, dass eine Anzahl der gefundenen Bindemotive in beiden Promotoren vorkommen (z.B. E2A, ETS-1, PEA3, HNF5, NF-Il6 und YY-1). Dies wäre ein Hinweis auf eine Funktion dieser Transkriptionsfaktoren bei der transkriptionellen Regulation der sGC-Untereinheiten. Zu nennen sind hier vor allem die Mitglieder der Ets-Transkriptionsfaktorenfamilie, deren Vertreter ETS-1 und PEA3 mehrfach in beiden Promotoren gefunden wurden. Zudem der Transkriptionsfaktor NF-Il6 (auch C/EBP β genannt), welcher ebenfalls mehrfach in beiden Promotoren zu finden ist. Über die Ets-Familie ist bekannt, dass sie die Expression von Matrix Metallo Proteinase steuern ((de

Launoit *et al.*, 1997)). Die Reorganisation der Extrazellulären Matrix durch Matrix Metallo Proteinasen spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Neointima. Zudem wurde von (Naito *et al.*, 1998) gezeigt, dass ETS-1 durch ET-1 in einem Zeitraum von ca. 2 Stunden aktiviert wird. Diese Beobachtungen einerseits und die Tatsache, dass der Gentransfer der sGC in Aorten die Neointima-Bildung nach einer Ballon-Dilatation unterdrückt (Sinnaeve *et al.*, 2001), macht die Mitglieder dieser Familie zu interessanten Kandidaten für die Regulation der sGC-Expression.

Auffallend war, dass keine „klassischen“ Bestandteile eines Promotors, wie z.B. eine TATA-Box oder GC-Box, gefunden werden konnten. Lediglich eine invertierte CAAT-Box bei -70 bis -73 bp war in der α_1 -sGC Sequenz (s. **Abbildung 14**), vorhanden. Die Promotoren der Gene der partikulären GCs-A, -C, -E, besitzen ebenfalls keine typische TATA-Box und keine oder nur invertierte CAAT-Boxen (Lucas *et al.*, 2000). Andererseits besitzt der publizierte Promotor der α_1 und β_1 sGC-Untereinheit des Medakafischs (*Oryzias latipes*) einen „klassischen“ Promotoraufbau (Mikami *et al.*, 1999). Im allgemeinen wird bei Fehlen der „klassischen“ Promotor-Elemente, davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Genen um „Haushalts“-Gene handelt, d.h. Gene die keiner Regulation unterliegen und konstitutiv exprimiert werden (Knippers, 1995). Die Schlussfolgerung, dass die sGC der Ratte und die pGC-Isoformen „Haushalts“-Gene sind, stünde jedoch in Gegensatz zu den Befunden einer regulierten Expression der pGC (s.a. Übersichtsartikel von (Foster *et al.*, 1999) und den in der **Tabelle 2 (Seite 7)** beschriebenen Veränderungen der sGC Expression.

Im α_1 -Promotor wurde mit Hilfe der Computeranalyse im Bereich zwischen -798 und -723 eine 76 bp lange Sequenz gefunden, die eine beinahe 100%ige Übereinstimmung zur sogenannten „Identifizier“-Sequenz besitzt (s. a. **Abbildung 14**). Diese kommt mit einer Kopienzahl von $1,5 \times 10^5$ im Rattengenom vor (Schuler *et al.*, 1983). Es handelt sich um ein Retroposon, also ein über eine reverse Transkription ins Genom integriertes DNA-Fragment. Die sGC wird während der Hirnentwicklung reguliert. So fanden (Smigrodzki and Levitt, 1996) in der Ratte die α_1 -Untereinheit mit Hilfe eines Differential-Displays als reguliertes Gen und (Liu *et al.*, 1997) konnten zeigen, dass in einer Phäochromocytoma-Zelllinie der Ratte NGF (Nerve growth Factor) die sGC Expression vermindert. Da die „Identifizier“-Sequenz eine Rolle bei der Regulation von Genen, die ausschließlich im neuronalen Gewebe exprimiert werden (Sutcliffe *et al.*, 1982), spielt, könnte es möglich sein, dass dieses Retroposon auch

die transkriptionelle Regulation der Expression der α_1 -Untereinheit sGC im neuronalen Gewebe beeinflusst.

3 Die Promotoren der α_1 - und β_1 -Untereinheit zeigen eine basale Aktivität

Zur Überprüfung der transkriptionellen Aktivität der in dieser Arbeit klonierten 5' flankierenden Bereiche beider Gene wurden diese an ein Reporterogen (Luziferase) gekoppelt und diese Konstrukte transient in glatte Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta transfiziert. Anschließend wurde aus Gesamtproteinlysaten die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Reportergenkonstrukte beider Gene zeigten dabei eine Luziferaseaktivität, die deutlich über der des Leervektors pGL3-Basic (s. **Abbildung 18** und **Abbildung 19**) lag. Da das α_1/β_1 Heterodimer der sGC in diesem Zelltyp konstitutiv exprimiert wird, ist somit davon auszugehen, dass es sich bei den klonierten Sequenzen um Promotorteile dieser Gene handelte.

Bei der α_1 -Untereinheit war eine deutliche Zunahme der basalen Aktivität mit zunehmender Kürze in 5' Richtung der Promotorfragmente zu erkennen (**Abbildung 18**). Das kürzeste Konstrukt, mit -200 bp Länge, zeigte die höchste basale Promotoraktivität. Zudem war ein Abfall der Aktivität im Vergleich zwischen dem Konstrukt Alpha3000 und Alpha1100 zu beobachten. Ein mögliches Indiz für eventuelle Silencer-Elemente in der Region zwischen -1100 und -352 (die Bindemotive für: NPTCII, AP2, PPAR, MYB, AP1, ETS-1, PEA3, BRN-1, MYC und CF-1 wurden durch die *in-silico* Analyse in diesem Bereich gefunden) und starke Enhancer-Elemente zwischen -3000 und -1100 (in der *in-silico* Analyse gefundene Transkriptionsfaktorenbindemotive: AP3, ELK-1, PEA3, LYF-1, MEF2, FREAC-7, BRN-2, ISL-1, CF-1, NFIL-6, NPTCII, CTCF, HNF5, C/EPB, E2A, AP2, YY-1, Y-1 und SEF3). Für die β_1 -Untereinheit wurde ebenfalls eine Zunahme der Reportergenaktivität bei gleichzeitiger Verkürzung in 5' Richtung der Konstrukte beobachtet (**Abbildung 19**).

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden der genomische Aufbau der Gene der α_1 - und β_1 -Untereinheit des Medakafischs (Mikami *et al.*, 1999) und der Maus (Sequenzen nicht freigegeben) (Sharina *et al.*, 2000) inklusive der 5' flankierenden Bereiche, publiziert. Dabei zeigte sich eine Tandemorganisation beider Gene im Fisch. α_1 und β_1 sind im Medakafisch

nur durch ca. 1 kb getrennt. Zudem wurde gezeigt, dass für die Expression der β_1 -Untereinheit ihr 5' flankierender Bereich nicht ausreichend und zusätzlich der Promotor der α_1 -Untereinheit nötig ist (Mikami *et al.*, 1999). In der Maus wurde von Sharina *et al.* (2000) jedoch gezeigt, dass beide Gene unabhängig voneinander aktive 5' regulative Regionen besitzen und der Abstand zwischen ihnen so groß ist, dass keine Tandemorganisation beider Gene vorliegt. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass beide Untereinheiten unabhängig voneinander aktive Promotoren besitzen.

Sharina *et al.* (2000) fanden bei Vergleich der α_1 - und β_1 -Promotoren der Maus eine deutlich höhere basale Aktivität für β_1 . Dabei waren die verwendeten Regionen ca. 1600 bp lang. Vergleicht man die Basalaktivität der Promotoren Alpha1100 und Beta1200 der Ratten sGC, also von Fragmenten mit einer ähnlichen Länge wie die von Sharina *et al.* (2000) verwendeten, lässt sich ebenso eine deutlich höhere Basalaktivität für die β_1 -Untereinheit feststellen. Vergleicht man jedoch die basale Aktivität der anderen in dieser Arbeit klonierten Konstrukte, der α_1 - bzw. β_1 -Untereinheiten, mit verschiedenen Längen (Alpha3000, Alpha350, Alpha200, Beta564, Beta312 und Beta164) wird kein deutlicher Unterschied in der basalen Aktivität dieser Promotorkonstrukte gefunden (s.a. **Abbildung 18** und **Abbildung 19**).

4 ET-1 erhöht die Aktivität der α_1 und β_1 Promotorkonstrukte der sGC

Die transiente Transfektion der Reportergenkonstrukte bei gleichzeitiger Stimulation mit ET-1 zeigte, dass eine 6 Std. Inkubation mit ET-1 die langen Promotorfragmente sowohl der α_1 - als auch der β_1 -Untereinheit aktiviert (**Abbildung 20**). Bei der Untersuchung der verschiedenen Verkürzungen der α_1 -Promotorfragmente zeigte sich zudem, dass diese Aktivierung bei dem Konstrukt Alpha200 nicht mehr nachweisbar war. Das nur 146 bp längere Konstrukt Alpha352 hingegen ließ sich durch ET-1 anregen (**Abbildung 20**). Im Bereich dieser 146 bp lagen nach der *in-silico* Analyse die Konsensus-Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren, NF- κ B (auch als C/EBP β bezeichnet), PEA3 und E2A. Diese drei Transkriptionsfaktoren haben gemeinsam, dass ihre Aktivität durch den MAPK-Signalweg (Mitogen Activated Protein-Kinase) moduliert wird (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos,

1998); (de Launoit *et al.*, 1997); (Bain *et al.*, 2001). Da der MAPKinase-Signalweg auch durch ET-1 aktiviert wird (Vacca *et al.*, 2000) wäre es durchaus möglich, dass ET-1 über einen oder mehrere dieser Transkriptionsfaktoren mittels des MAPKinase-Signalwegs die Expression der α_1 -sGC-Untereinheit reguliert. Zudem gehört PEA3 zur gleichen Transkriptionsfaktor-Familie, zu der auch ETS-1 gehört. Die Bindung von ETS-1 an die DNA kann durch ET-1 aktiviert werden (Naito *et al.*, 1998). Eine Überprüfung, ob dies auch bei der α_1 -Untereinheit geschieht, wäre durch Mutation/Deletion der jeweiligen Erkennungs-Sequenz in den Reportergenkonstrukten und durch einen EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), mit dem die Bindung von PEA3 an die hier Gefundenen Sequenzmotive nachzuweisen wäre, durchzuführen.

5 Die Peptidhormone Angiotensin II und Endothelin-1 erhöhen die Expression der sGC-Untereinheiten a_1 und b_1

Wie schon in der Einleitung erläutert spielen die Peptidhormone ET-1 und AngII eine bedeutende Rolle bei vielen pathophysiologischen Prozessen des Gefäßsystems, wie z.B. der Regulation des Blutdrucks, der Proliferation der glatten Muskelzellen, der Entwicklung von Hypertonie und Arteriosklerose usw. (Lucius *et al.*, 1999); (Goldie, 1999). Für beide Hormone konnte zudem eine Beteiligung bei der Nitrat-Toleranz gezeigt werden (Münzel *et al.*, 1995) die mit einer erhöhten Expression der sGC-Untereinheiten einherging (Mülsch *et al.*, 2001). Daher lag es nahe diese Vasopressoren in ihrer Wirkung auf die sGC-Expression zu testen. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass AngII und ET-1 eine Steigerung der α_1 - und β_1 -sGC mRNA-Mengen erzeugen (**Abbildung 21**, **Abbildung 22** und **Abbildung 23**).

6 Der ET_A -Rezeptor ist für die erhöhte Expression der sGC-Untereinheiten mRNA verantwortlich

Im Säugetiermodell sind zwei Endothelin-Rezeptortypen beschrieben, der ET_A - und ET_B -Rezeptor (Yanagisawa *et al.*, 1990). Beide Rezeptoren werden von der glatten Muskulatur exprimiert (Yanagisawa *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990; Batra *et al.*, 1993). Der ET_A -Rezeptor vermittelt dabei über eine Erhöhung der intrazellulären freien Kalzium-Ionen

Konzentration die Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur (Haynes and Webb, 1994).

Welcher dieser beiden Rezeptortypen für eine Vermittlung einer ET-1 Wirkung verantwortlich ist, lässt sich mit Hilfe verschiedener Rezeptor-Antagonisten feststellen. Die Substanzen BQ123, ein ET_A-Rezeptor spezifisches Peptid (Ihara *et al.*, 1992) und BQ788, eine ET_B-Rezeptor spezifische nicht-peptidische Substanz (Ishikawa *et al.*, 1994), gelten als etablierte ET_A/ET_B-Rezeptor-Antagonisten.

Durch eine Behandlung der VASMC mit ET-1 für 6 Std. und einer 30 min. Vorbehandlung mit den oben genannten Antagonisten wurde untersucht, welcher Rezeptortyp die Steigerung der sGC mRNA-Mengen durch ET-1 vermittelt. Die Messung der mRNA-Menge der β_1 -sGC-Untereinheit erfolgte dabei durch Real-Time RT-PCR. Es zeigte sich, dass die ET-1 Wirkung durch BQ123, nicht aber durch BQ788, inhibiert wird. Da die ET-1 Wirkung durch den ET_A-Rezeptor Antagonisten BQ123 zu inhibieren war, ist folglich der ET_A-Rezeptor der an dieser Signaltransduktion beteiligte Rezeptor (**Abbildung 24**). Dieser Befund steht in Einklang mit der Beobachtung, dass sich in den großen Lungengefäßen der Ratte der cGMP-Gehalt durch ET-1 Stimulation endothel-unabhängig über die Aktivierung des ET_A-Rezeptor erhöhen lässt (Mullaney *et al.*, 2000).

7 ET-1 verstärkt die NO-induzierte Relaxation von Rattengefäßen

Der NO/cGMP-Signalweg ist im Gefäßsystem ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Gefäßspannung. Im Gefäßendothel wird durch verschiedene Signale, wie z.B. die Schubspannung des strömenden Bluts, die endotheliale NO-Synthase aktiviert, dadurch vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) produziert, welches dann in der glatten Gefäßmuskulatur die sGC aktiviert. Das erzeugte cGMP agiert als „second-messenger“ und erzeugt durch Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen letztlich eine Verringerung des intrazellulären, freien Kalziumgehalts und in der Folge die Relaxation der Gefäßmuskulatur. Außerdem bewirkt cGMP eine Dephosphorylierung der Myosin-Leichten-Kette-Kinase und dadurch eine Desensitivierung des kontraktile Apparats gegenüber Ca²⁺.

Gefäße können auch Endothel-unabhängig durch Gabe von NO oder einen NO-Donor wie Natriumnitroprussid (SNP) Dosis-abhängig relaxiert werden (Lincoln and Fisher-Simpson,

1984). Auch mit cGMP, dem Produkt der löslichen Guanylyl Zyklase, bzw. metabolisch stabilen cGMP-Analoga lassen sich endothel-freie Gefäße Dosis-abhängig relaxieren (Lincoln and Fisher-Simpson, 1984). Da eine erhöhte mRNA-Expression beider sGC-Untereinheiten durch ET-1 in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sollte die Wirkung einer ET-1 Stimulation auf die NO-induzierte Relaxation endothel-freie Gefäße der Ratte untersucht werden. Dazu wurden Abschnitte der *A. thoracalis* vom Endothel befreit, in Serum-freien Medium mit ET-1 für 4 Std. inkubiert und wie in Material und Methoden beschrieben die Relaxation untersucht. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich die benötigte NO-Donor-Menge (SNP) für eine 50%ige Relaxation um beinahe eine Zehnerpotenz erniedrigte (**Abbildung 25**). Dies war eine deutliche Sensitivierung der Gefäße gegenüber NO. Eine Überprüfung, ob die der sGC nachgeschalteten Signalmoleküle durch die ET-1 Stimulation beeinflusst werden, durch Relaxation mit dem metabolisch stabilen cGMP-Analoga 8-Br-cGMP, zeigte keine Veränderung der für eine Relaxation nötigen cGMP-Konzentrationen (**Abbildung 27**). Die der sGC nachfolgenden Signalmoleküle werden also durch ET-1 nicht in ihrer Funktion modifiziert.

Neben cGMP kann auch der „klassische“ second messenger cAMP eine Relaxation der Gefäßmuskulatur vermitteln (McMahon and Paul, 1986). Zudem wurden Wechselwirkungen zwischen cGMP und cAMP-abhängigen Proteinkinasen beschrieben (Lohmann *et al.*, 1997); (Pfeifer *et al.*, 1999). Um eine Modifikation dieser Signalwege durch ET-1 auszuschließen, wurde mit Forskolin, einer die Adenylyl Zyklase aktivierende Substanz (Karaki, 1987), ET-1 stimulierte und Kontrollgefäße relaxiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (**Abbildung 26**). Der beobachtete ET-1 Effekt auf die NO-abhängige Gefäßrelaxation wird also nicht durch eine Veränderung des cAMP-Signalwegs erzeugt.

Die ET-1 induzierte potenzierende Wirkung auf die NO-abhängige Relaxation kann somit nur über eine vermehrte Expression und/oder über eine erhöhte Sensitivität der sGC gegenüber NO erzeugt werden.

8 ET-1 erhöht die NO-induzierte cGMP-Produktion in verschiedenen Geweben

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von ET-1 auf die spezifische, NO-induzierte Aktivität der sGC in endothel-freien Rattenaorten, in endothel-freien Koronargefäßen des Schweins und in kultivierten glatten, Muskelzellen der thorakalen Rattenaorta gemessen. Die spezifische Aktivität der löslichen Guanylyl Zyklenen kann durch Messung der Umsatzraten des Substrats GTP in cGMP bestimmt werden (Schultz and Böhme, 1984). Dazu wurden wie in Material und Methoden beschrieben Teile der Gefäße für 6 Std. mit ET-1 in Serum-freien Medium inkubiert, das Gewebe anschließend homogenisiert und die spezifische Aktivität der sGC in den Homogenaten nach Aktivierung mit NO (SNP) bzw. der Höchst Substanz HMR S973448, welche nur die oxidierte, NO-insensitive Form der sGC aktiviert (Töpfer, 2001), bestimmt.

Es zeigte sich, dass die ET-1 Behandlung zu einer signifikanten Steigerung der durch NO-induzierten (SNP) sGC-Aktivität führte (**Abbildung 28**). Bei Messung der HMR S973448-induzierten, wurden zudem keine Änderung des Verhältnisses zwischen oxidiertes und reduziertes sGC gefunden, bei gleichzeitiger signifikanter Steigerung der Aktivität nach ET-1 Behandlung (Daten nicht gezeigt). Da sich die Verhältnisse zwischen NO- und HMR S973448-induzierter sGC-Aktivität im Vergleich zwischen ET-1-behandelten Gewebe und Kontrollen nicht änderten (Daten nicht gezeigt), muß eine Neusynthese von Enzym durch ET-1 induziert werden. Zudem wurde gezeigt, dass die Stimulation mit ET-1 in verschiedenen Geweben bzw. Zellen die NO-abhängige spezifische Aktivität der sGC erhöht. Ein Befund, der auch indirekt durch die Beobachtung einer Endothel-unabhängigen, durch ET-1 erzeugten, erhöhten cGMP-Menge in den Lungenarterien der Ratte gestützt wird (Mullaney *et al.*, 2000).

9 Zusammenfassung der Diskussion

ET-1 gilt als wichtiges Hormon im kardiovaskulären System, da es kurzfristig, über die Aktivierung der endothelialen NOS, zu einer Vasodilatation führt, langfristig aber über eine Ca^{2+} -Ionen Mobilisierung als Vasokonstriktor agiert, dessen Inhibition durch Antagonisten zur Senkung des systemischen Blutdrucks führt (Wright and Fozard, 1988). Zusätzlich ist aus verschiedenen Knock-out-Mausmodellen bekannt welche wichtige Rolle ET-1 in der

Embryogenese spielt (Kedzierski and Yanagisawa, 2001). Auch wird seine Funktion im Geschehen der endothelialen Dysfunktion diskutiert, auf Grund der mitogenen Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen (Fujitani *et al.*, 1995), speziell im Zusammenhang mit der Atherosklerose. Die Untersuchung der diesen Vorgängen zugrundeliegenden Mechanismen wird erschwert durch die Tatsache, dass ET-1 als auto- bzw. parakrines Hormon wirkt (Yanagisawa *et al.*, 1988) und dass der Besatz der Zellen mit den bekannten ET-Rezeptortypen, sowie deren Koppelung an verschiedene G-Proteine, variiert (Kedzierski and Yanagisawa, 2001).

Die Aktivierung der Expression der sGC-Untereinheiten durch ET-1 dient vermutlich als biologischer Rückkopplungsmechanismus, um übermäßige Vasokonstriktion bei vermehrter ET-1 Bildung zu verhindern. Ähnlich wie ET-1 auch die Expression eines anderen Vasodilators, des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF), erhöht (Morin *et al.*, 2001). Aufgrund der Tatsache, dass im Rahmen der Nitrat-Toleranz sowohl ET-1 (Münzel *et al.*, 1995) als auch die sGC (Mülsch *et al.*, 2001) verstärkt exprimiert werden, kann ebenfalls auf einen biologischen Rückkopplungsmechanismus geschlossen werden. Da die NO-Sensitivität in diesem Tiermodell zur Gefäßdysfunktion abnimmt, scheint eine gleichzeitige, erhöhte Expression des NO-Rezeptors sGC sinnvoll, um die verringerte NO-Sensitivität der Gefäße zu kompensieren.

ET-1 ist ein mitogener Stimulus für die glatten Gefäßmuskelzellen (Fujitani *et al.*, 1995). Auch hier scheint eine Kopplung mit der Aktivierung von entgegengesetzt wirkenden Mechanismen gegeben. Durch die Steigerung der ANF-Spiegel, welcher auch als antiproliferativer Stimulus wirkt (Vollmar *et al.*, 1996) oder der sGC-Expression gefolgt von einer Erhöhung der glattmuskulären cGMP-Spiegel, würde auch eine übermäßige Proliferation der VSMC durch ET-1 verhindert. Zudem ist bekannt, dass ETS-1 durch ET-1 aktiviert werden kann (Naito *et al.*, 1998). Dieser Transkriptionsfaktor und die Mitglieder der gleichnamigen Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, indem sie z.B. die Matrix Metallo-Proteinasen aktivieren (Naito *et al.*, 1998). Das Vorhandensein mehrerer möglicher Bindestellen für die Ets-Familie in beiden Promotoren der Ratten sGC (s. **Abbildung 14** und **Abbildung 17**) läßt es möglich erscheinen, dass die Aktivierung der Promotoren beider sGC-Untereinheiten durch Mitglieder dieser Transkriptionsfaktoren-Familie in Gegenwart mitogener Stimuli vermittelt werden. Diese

Hypothese wird auch durch den Befund unterstützt, dass bei Fehlen einer PEA3-Bindestelle die Stimulierbarkeit des α_1 -Promotors durch ET-1 verloren geht (s.a. **Abbildung 20**).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ET-1 nach 6 Std. über den ET_A-Rezeptor die mRNA-Expression beider sGC-Untereinheiten der Ratte erhöht, die Aktivität der hier gefundenen Promotorfragmente verstärkt, die NO-abhängige Aktivität der sGC in Gewebe- und Zellhomogenaten erhöht und die durch NO ausgelöste Relaxation von kontrahierten Rattenaorten verstärkt.

VI Literaturquellen

Andreopoulos,S., Papapetropoulos,A. (2000). Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation. *Gen.Pharmacol.* 34, 147-157.

Andreopoulos,S., Papapetropoulos,A., Gupta,G., Azam,M., Yang,L., Danziger,R.S. (1997). The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. *J.Clin.Invest* 100, 1488-1492.

Andrianopoulos,A., Timberlake,W.E. (1994). The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol.Cell Biol.* 14, 2503-2515.

Arnold,W.P., Mittal,C.K., Katsuki,S., Murad,F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 3203-3207.

Ashman,D.F., Lipton,R., Melicow,M.M., Price,T.D. (1963). Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3'-5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys.Res.Comm.* 11, 330-334.

Aszodi,A., Pfeifer,A., Ahmad,M., Glauner,M., Zhou,X.H., Ny,L., Andersson,K.E., Kehrel,B., Offermanns,S., Fassler,R. (1999). The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 18, 37-48.

Bain,G., Cravatt,C.B., Loomans,C., Alberola-Ila,J., Hedrick,S.M., Murre,C. (2001). Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat.Immunol.* 2, 165-171.

Batra,V.K., McNeill,J.R., Xu,Y., Wilson,T.W., Gopalakrishnan,V. (1993). ETB receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* 264, C479-C484.

Battistini,B., D'Orleans-Juste,P., Sirois,P. (1993). Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 68, 600-628.

Bauersachs,J., Bouloumie,A., Fraccarollo,D., Hu,K., Busse,R., Ertl,G. (1999). Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 100, 292-298.

- Bauersachs,J., Fleming,I., Fraccarollo,D., Busse,R., Ertl,G. (2001). Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc.Res.* 51, 344-350.
- Baynash,A.G., Hosoda,K., Giaid,A., Richardson,J.A., Emoto,N., Hammer,R.E., Yanagisawa,M. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79, 1277-1285.
- Behrends,S., Harteneck,C., Schultz,G., Koesling,D. (1995). A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J.Biol.Chem.* 270, 21109-21113.
- Behrends,S., Kazmierczak,B., Steenpa,A., Knauf,B., Bullerdiek,J., Scholz,H., Eiberg,H. (1999). Assignment of GUCY1B2, the gene coding for the beta2 subunit of human guanylyl cyclase to chromosomal band 13q14.3 between markers D13S168 and D13S155. *Genomics* 55, 126-127.
- Behrends,S., Kempfert,J., Mietens,A., Koglin,M., Scholz,H., Middendorff,R. (2001). Developmental changes of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase expression in pulmonary arteries. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 283, 883-887.
- Biel,M., Zong,X., Ludwig,A., Sautter,A., Hofmann,F. (1999). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev.Physiol Biochem Pharmacol.* 135:151-71., 151-171.
- Bird,J.E., Waldron,T.L., Dorso,C.R., Asaad,M.M. (1993). Effects of the endothelin (ET) receptor antagonist BQ 123 on initial and delayed vascular responses induced by ET-1 in conscious, normotensive rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 22, 69-73.
- Bloch,K.D., Filippov,G., Sanchez,L.S., Nakane,M., de la Monte,S.M. (1997). Pulmonary soluble guanylate cyclase, a nitric oxide receptor, is increased during the perinatal period. *Am.J.Physiol* 272, L400-L406.
- Boulanger,C., Luscher,T.F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J.Clin.Invest* 85, 587-590.
- Bradford,M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brune,B., Schmidt,K.U., Ullrich,V. (1990). Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur.J.Biochem* 192, 683-688.

- Buechler,W.A., Ivanova,K., Wolfram,G., Drummer,C., Heim,J.M., Gerzer,R. (1994). Soluble guanylyl cyclase and platelet function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 714:151-7., 151-157.
- Buechler,W.A., Nakane,M., Murad,F. (1991). Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 174, 351-357.
- Buechler,W.A., Nakane,M., Murad,F., Humbert,P., Niroomand,F., Fischer,G., Mayer,B., Koesling,D., Hinsch,K.D., Gausepohl,H., Frank,R., Schultz,G., Bohme,E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur.J.Biochem* 190, 273-278.
- Carini,D.J., Lee,R.J., Wexler,R.R., Geisterfer,A.A., Peach,M.J., Owens,G.K. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ.Res.* 62, 749-756.
- Chakravarti,A. (1996). Endothelin receptor-mediated signaling in hirschsprung disease. *Hum.Mol.Genet.* 5, 303-307.
- Chang,M.S., Lowe,D.G., Lewis,M., Hellmiss,R., Chen,E., Goeddel,D.V. (1989). Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 341, 68-72.
- Cheng,C., Kacherovsky,N., Dombek,K.M., Camier,S., Thukral,S.K., Rhim,E., Young,E.T. (1994). Identification of potential target genes for Adr1p through characterization of essential nucleotides in UAS1. *Mol.Cell Biol.* 14, 3842-3852.
- Chomczynski,P., Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroformextraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chrisman,T.D., Schulz,S., Potter,L.R., Garbers,D.L. (1993). Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides. *J.Biol.Chem.* 268, 3698-3703.
- ClonTech. Genome Walker Kits User Manual. [PT1116-1]. 1999. Clontech. Ref Type: Catalog
- Clouthier,D.E., Hosoda,K., Richardson,J.A., Williams,S.C., Yanagisawa,H., Kuwaki,T., Kumada,M., Hammer,R.E., Yanagisawa,M. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125, 813-824.

- Collier,J., Vallance,P. (1989). Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol.Sci.* *10*, 427-431.
- de Gasparo,M., Catt,K.J., Inagami,T., Wright,J.W., Unger,T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol.Rev.* *52*, 415-472.
- de Launoit,Y., Baert,J.L., Chotteau,A., Monte,D., Defossez,P.A., Coutte,L., Pelczar,H., Leenders,F. (1997). Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors. *Biochem Mol.Med.* *61*, 127-135.
- Denninger,J.W., Marletta,M.A. (1999). Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim.Biophys.Acta* *1411*, 334-350.
- Dignam,J.D., Lebovitz,R.M., Roeder,R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* *11*, 1475-1489.
- Dou,Q.P., Fridovich-Keil,J.L., Pardee,A.B. (1991). Inducible proteins binding to the murine thymidine kinase promoter in late G1/S phase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *88*, 1157-1161.
- Ederly,P., Attie,T., Amiel,J., Pelet,A., Eng,C., Hofstra,R.M., Martelli,H., Bidaud,C., Munnich,A., Lyonnet,S. (1996). Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat.Genet.* *12*, 442-444.
- Emori,T., Hirata,Y., Imai,T., Ohta,K., Kanno,K., Eguchi,S., Marumo,F. (1992). Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol.* *44*, 2409-2411.
- England,B.P., Heberlein,U., Tjian,R. (1990). Purified *Drosophila* transcription factor, Adh distal factor-1 (Adf-1), binds to sites in several *Drosophila* promoters and activates transcription. *J.Biol.Chem.* *265*, 5086-5094.
- Filippov,G., Bloch,D.B., Bloch,K.D. (1997). Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J.Clin.Invest* *100*, 942-948.
- Foster,D.C., Wedel,B.J., Robinson,S.W., Garbers,D.L. (1999). Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* *135:1-39.*, 1-39.
- Förster,V.Th. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics* *2*, 55-75.

- Friebe,A., Schultz,G., Koesling,D. (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.* 15, 6863-6868.
- Frings,S. (1997). Cyclic nucleotide-gated channels and calcium: an intimate relation. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 31:75-82., 75-82.
- Fujitani,Y., Ninomiya,H., Okada,T., Urade,Y., Masaki,T. (1995). Suppression of endothelin-1-induced mitogenic responses of human aortic smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *J.Clin.Invest* 95, 2474-2482.
- Fukuroda,T., Fujikawa,T., Ozaki,S., Ishikawa,K., Yano,M., Nishikibe,M. (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys.Res.Comm.* 199, 1461-1465.
- Fulle,H.J., Vassar,R., Foster,D.C., Yang,R.B., Axel,R., Garbers,D.L. (1995). A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 3571-3575.
- Furchgott,R.F., Zawadzki,J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Furuta,H., Mori,N., Luo,L., Ryan,A.F. (1995). Detection of mRNA encoding guanylate cyclase A/atrial natriuretic peptide receptor in the rat cochlea by competitive polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Hear.Res.* 92, 78-84.
- Gansemans,Y., Brouckaert,P., and Fiers,W. (1997). Murine soluble guanylate cyclase, beta-1 subunit. Acessionnumber AF020339.
- Garbers,D.L. (1979). Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J.Biol.Chem.* 254, 240-243.
- Garbers,D.L., Gray,J.P. (1974). Guanylate cyclase from sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Methods Enzymol.* 38:196-9., 196-199.
- Garipey,C.E. (2001). Intestinal motility disorders and development of the enteric nervous system. *Pediatr.Res.* 49, 605-613.
- Gerzer,R., Brash,A.R., Hardman,J.G. (1986). Activation of soluble guanylate cyclase by arachidonic acid and 15-lipoxygenase products. *Biochim.Biophys.Acta* 886, 383-389.
- Gerzer,R., Hofmann,F., Schultz,G. (1981). Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur.J.Biochem* 116, 479-486.

- Giuli,G., Scholl,U., Bulle,F., Guellaen,G. (1992). Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett.* 304, 83-88.
- Goldie,R.G. (1999). Endothelins in health and disease: an overview. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 26, 145-148.
- Goodwin,D.C., Gunther,M.R., Hsi,L.C., Crews,B.C., Eling,T.E., Mason,R.P., Marnett,L.J. (1998). Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385. *J.Biol.Chem.* 273, 8903-8909.
- 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.
- Grange,T., Roux,J., Rigaud,G., Pictet,R. (1991). Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res.* 19, 131-139.
- Greenblatt,J. (1991). Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell* 66, 1067-1070.
- Gudi,T., Casteel,D.E., Vinson,C., Boss,G.R., Pilz,R.B. (2000). NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene* 19, 6324-6333.
- Gunther,M.R., Hsi,L.C., Curtis,J.F., Gierse,J.K., Marnett,L.J., Eling,T.E., Mason,R.P. (1997). Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J.Biol.Chem.* 272, 17086-17090.
- Hahn,A.W., Regenass,S., Kern,F., Buhler,F.R., Resink,T.J. (1993). Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin II and endothelin-1. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 192, 189-197.
- Hanafy,K.A., Krumenacker,J.S., Murad,F. (2001). NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med.Sci.Monit.* 7, 801-819.
- Hardman,J.G., Sutherland,E.W. (1969). Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J.Biol.Chem.* 244, 6363-6370.
- Harteneck,C., Wedel,B., Koesling,D., Malkewitz,J., Bohme,E., Schultz,G. (1991). Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 292, 217-222.

- Haynes,W.G., Webb,D.J. (1994). Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 344, 852-854.
- Hedlund,P., Aszodi,A., Pfeifer,A., Alm,P., Hofmann,F., Ahmad,M., Fassler,R., Andersson,K.E. (2000). Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 2349-2354.
- Hevel,J.M., White,K.A., Marletta,M.A. (1991). Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J.Biol.Chem.* 266, 22789-22791.
- Hickey,K.A., Rubanyi,G., Paul,R.J., Highsmith,R.F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am.J.Physiol* 248, C550-C556.
- Ho,I.C., Bhat,N.K., Gottschalk,L.R., Lindsten,T., Thompson,C.B., Papas,T.S., Leiden,J.M. (1990). Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor alpha gene enhancer. *Science* 250, 814-818.
- Ho,I.C., Vorhees,P., Marin,N., Oakley,B.K., Tsai,S.F., Orkin,S.H., Leiden,J.M. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *EMBO J.* 10, 1187-1192.
- Hobbs,A.J. (1997). Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol.Sci.* 18, 484-491.
- Hosoda,K., Hammer,R.E., Richardson,J.A., Baynash,A.G., Cheung,J.C., Giaid,A., Yanagisawa,M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79, 1267-1276.
- Howard,P.G., Plumpton,C., Davenport,A.P. (1992). Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J.Hypertens.* 10, 1379-1386.
- Huber,A., Neuhuber,W.L., Klugbauer,N., Ruth,P., Allescher,H.D. (2000). Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 275, 5504-5511.
- Ignarro,L.J., Buga,G.M., Wood,K.S., Byrns,R.E., Chaudhuri,G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 9265-9269.

Ihara,M., Noguchi,K., Saeki,T., Fukuroda,T., Tsuchida,S., Kimura,S., Fukami,T., Ishikawa,K., Nishikibe,M., Yano,M. (1992). Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* 50, 247-255.

Imagawa,M., Chiu,R., Karin,M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51, 251-260.

Imbert,J., Zafarullah,M., Culotta,V.C., Gedamu,L., Hamer,D. (1989). Transcription factor MBF-I interacts with metal regulatory elements of higher eucaryotic metallothionein genes. *Mol.Cell Biol.* 9, 5315-5323.

Inoue,A., Yanagisawa,M., Kimura,S., Kasuya,Y., Miyauchi,T., Goto,K., Masaki,T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 2863-2867.

Ishikawa,E., Ishikawa,S., Davis,J.W., Sutherland,E.W. (1969). Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J.Biol.Chem.* 244, 6371-6376.

Ishikawa,K., Ihara,M., Noguchi,K., Mase,T., Mino,N., Saeki,T., Fukuroda,T., Fukami,T., Ozaki,S., Nagase,T., . (1994). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 4892-4896.

Issemann,I., Green,S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.

Itoh,H., Bird,I.M., Nakao,K., Magness,R.R. (1998). Pregnancy increases soluble and particulate guanylate cyclases and decreases the clearance receptor of natriuretic peptides in ovine uterine, but not systemic, arteries. *Endocrinology* 139, 3329-3341.

Jackson,S.P., MacDonald,J.J., Lees-Miller,S., Tjian,R. (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63, 155-165.

Jaffrey,S.R., Snyder,S.H. (1995). Nitric oxide: a neural messenger. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11:417-40., 417-440.

Jankowski,M., Reis,A.M., Mukaddam-Daher,S., Dam,T.V., Farookhi,R., Gutkowska,J. (1997). C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. *Biol.Reprod.* 56, 59-66.

Jarchau,T., Hausler,C., Markert,T., Pohler,D., Vanderkerckhove,J., De Jonge,H.R., Lohmann,S.M., Walter,U. (1994). Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 9426-9430.

Johnston,C.I., Risvanis,J. (1997). Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding issues. *Am.J.Hypertens.* 10, 306S-310S.

Kamisaki,Y., Saheki,S., Nakane,M., Palmieri,J.A., Kuno,T., Chang,B.Y., Waldman,S.A., Murad,F. (1986). Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J.Biol.Chem.* 261, 7236-7241.

Kamps,M.P., Look,A.T., Baltimore,D. (1991). The human t(1;19) translocation in pre-B ALL produces multiple nuclear E2A-Pbx1 fusion proteins with differing transforming potentials. *Genes Dev.* 5, 358-368.

Karaki,H. (1987). Use of tension measurements to delineate the mode of action of vasodilators. *J.Pharmacol.Methods* 18, 1-21.

Karlsson,O., Thor,S., Norberg,T., Ohlsson,H., Edlund,T. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344, 879-882.

Kedzierski,R.M., Yanagisawa,M. (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 41, 851-876.

Kim,C.G., Swendeman,S.L., Barnhart,K.M., Sheffery,M. (1990). Promoter elements and erythroid cell nuclear factors that regulate alpha-globin gene transcription in vitro. *Mol.Cell Biol.* 10, 5958-5966.

Kimura,B., Sumners,C., Phillips,M.I. (1992). Changes in skin angiotensin II receptors in rats during wound healing. *Biochem Biophys.Res.Comm.* 187, 1083-1090.

Kimura,H., Mittal,C.K., Murad,F. (1976). Appearance of magnesium guanylate cyclase activity in rat liver with sodium azide activation. *J.Biol.Chem.* 251, 7769-7773.

Kimura,H., Murad,F. (1974). Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J.Biol.Chem.* 249, 6910-6916.

Kimura,H., Murad,F., Chrisman,T.D., Garbers,D.L., Parks,M.A., Hardman,J.G. (1975). Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J.Biol.Chem.* 250, 374-381.

Kisanuki, Y., Ohuchi, Y., Takahashi, H., Hammer, R. E., and Williams, S. C. Endothelial cell-specific knock-out of the endothelin-1 gene in mice. 1999. Int. Conf. Endothelins, 6th, Montreal, Canada. Int. Conf. Endothelins, 6th, Montreal, Canada. 1999. Ref Type: Conference Proceeding

Klöß,S., Bouloumie,A., Mülsch,A. (2000). Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35, 43-47.

Knippers,R. (1995). RNA-Polymerasen Und Die Grundlagen Der Transkription Von Eukaryonten-Genen. In: Molekulare Genetik Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Koesling,D., Harteneck,C., Humbert,P., Bosserhoff,A., Frank,R., Schultz,G., Bohme,E. (1990). The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 266, 128-132.

Koesling,D., Herz,J., Gausepohl,H., Niroomand,F., Hinsch,K.D., Mülsch,A., Bohme,E., Schultz,G., Frank,R. (1988). The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* 239, 29-34.

Kohno,M., Horio,T., Yokokawa,K., Kurihara,N., Takeda,T. (1992). C-type natriuretic peptide inhibits thrombin- and angiotensin II-stimulated endothelin release via cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Hypertension* 19, 320-325.

Komalavilas,P., Lincoln,T.M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J.Biol.Chem.* 271, 21933-21938.

Krumenacker,J.S., Hyder,S.M., Murad,F. (2001). Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 717-722.

Kurihara,H., Yoshizumi,M., Sugiyama,T., Takaku,F., Yanagisawa,M., Masaki,T., Hamaoki,M., Kato,H., Yazaki,Y. (1989). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 159, 1435-1440.

Kurihara,Y., Kurihara,H., Oda,H., Maemura,K., Nagai,R., Ishikawa,T., Yazaki,Y. (1995). Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J.Clin.Invest* 96, 293-300.

Kurihara,Y., Kurihara,H., Suzuki,H., Kodama,T., Maemura,K., Nagai,R., Oda,H., Kuwaki,T., Cao,W.H., Kamada,N., . (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368, 703-710.

Laber,U., Kober,T., Schmitz,V., Schrammel,A., Meyer,W., Mayer,B., Weber,M., Kojda,G. (2002). Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation* 105 , 855-860.

Lakowicz,J.R. (1983). Energy Transfer. In: Principles of Fluorescent Spectroscopy New York: Plenum Press, 303-339.

Lander,H.M., Ogiste,J.S., Pearce,S.F., Levi,R., Novogrodsky,A. (1995). Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J.Biol.Chem.* 270, 7017-7020.

Laney,D.W., Jr., Bezerra,J.A., Kosiba,J.L., Degen,S.J., Cohen,M.B. (1994). Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. *Am.J.Physiol* 266, G899-G906.

Lattion,A.L., Espel,E., Reichenbach,P., Fromental,C., Bucher,P., Israel,A., Baeuerle,P., Rice,N.R., Nabholz,M. (1992). Characterization of a new tissue-specific transcription factor binding to the simian virus 40 enhancer TC-II (NF-kappa B) element. *Mol.Cell Biol.* 12, 5217-5227.

Lawyer,F.C., Stoffel,S., Saiki,R.K., Myambo,K., Drummond,R., Gelfand,D.H. (1989). Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus. *J.Biol.Chem.* 264, 6427-6437.

Lekstrom-Himes,J., Xanthopoulos,K.G. (1998). Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J.Biol.Chem.* 273, 28545-28548.

Lemischka,I., Sharp,P.A. (1982). The sequences of an expressed rat alpha-tubulin gene and a pseudogene with an inserted repetitive element. *Nature* 300, 330-335.

Lessard,P.A., Allen,R.D., Bernier,F., Crispino,J.D., Fujiwara,T., Beachy,R.N. (1991). Multiple nuclear factors interact with upstream sequences of differentially regulated beta-conglycinin genes. *Plant Mol.Biol.* 16, 397-413.

Levine,S.N., Steiner,A.L., Earp,H.S., Meissner,G. (1979). Particulate guanylate cyclase of skeletal muscle: effects of Ca²⁺ and other divalent cations on enzyme activity. *Biochim.Biophys.Acta* 566, 171-182.

Li,D., Zhou,N., Johns,R.A. (1999). Soluble guanylate cyclase gene expression and localization in rat lung after exposure to hypoxia. *Am.J.Physiol* 277, L841-L847.

- Li,P., He,X., Gerrero,M.R., Mok,M., Aggarwal,A., Rosenfeld,M.G. (1993). Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes Dev.* 7, 2483-2496.
- Li,Z., Goy,M.F. (1993). Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. *Am.J.Physiol* 265, G394-G402.
- Lincoln,T.M., Fisher-Simpson,V. (1984). A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta. *Eur.J.Pharmacol.* 101, 17-27.
- Lipa,J.E., Neligan,P.C., Perreault,T.M., Baribeau,J., Levine,R.H., Knowlton,R.J., Pang,C.Y. (1999). Vasoconstrictor effect of endothelin-1 in human skin: role of ETA and ETB receptors. *Am.J.Physiol* 276, H359-H367.
- Liu,H., Force,T., Bloch,K.D. (1997). Nerve growth factor decreases soluble guanylate cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 272, 6038-6043.
- Lo,K., Landau,N.R., Smale,S.T. (1991). LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. *Mol.Cell Biol.* 11, 5229-5243.
- Lobanenkov,V.V., Nicolas,R.H., Adler,V.V., Paterson,H., Klenova,E.M., Polotskaja,A.V., Goodwin,G.H. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5, 1743-1753.
- Lohmann,S.M., Vaandrager,A.B., Smolenski,A., Walter,U., De Jonge,H.R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 22, 307-312.
- Lopez-Farre,A., Rodriguez-Feo,J.A., Garcia-Colis,E., Gomez,J., Lopez-Blaya,A., Fortes,J., de Andres,R., Rico,L., Casado,S. (2002). Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of the alpha1 -receptor blocker doxazosin. *J.Hypertens.* 20, 463-470.
- Lowe,D.G., Chang,M.S., Hellmiss,R., Chen,E., Singh,S., Garbers,D.L., Goeddel,D.V. (1989). Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* 8, 1377-1384.
- Lowe,D.G., Klisak,I., Sparkes,R.S., Mohandas,T., Goeddel,D.V. (1990). Chromosomal distribution of three members of the human natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase gene family. *Genomics* 8, 304-312.

Lucas,K.A., Pitari,G.M., Kazerounian,S., Ruiz-Stewart,I., Park,J., Schulz,S., Chepenik,K.P., Waldman,S.A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol.Rev.* 52, 375-414.

Lucius,R., Gallinat,S., Busche,S., Rosenstiel,P., Unger,T. (1999). Beyond blood pressure: new roles for angiotensin II. *Cell Mol.Life Sci.* 56, 1008-1019.

Lucius,R., Gallinat,S., Rosenstiel,P., Herdegen,T., Sievers,J., Unger,T. (1998). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J.Exp.Med.* 188, 661-670.

Luo,Y., Amin,J., Voellmy,R. (1991). Ecdysterone receptor is a sequence-specific transcription factor involved in the developmental regulation of heat shock genes. *Mol.Cell Biol.* 11, 3660-3675.

Luscher,T.F., Seo,B.G., Buhler,F.R. (1993). Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension* 21, 752-757.

MacNulty,E.E., Plevin,R., Wakelam,M.J. (1990). Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for Rat-1 fibroblasts. *Biochem J.* 272, 761-766.

MacNulty,E.E., Plevin,R., Wakelam,M.J., Ruetten,H., Thiernemann,C. (1997). Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J.Physiol Pharmacol.* 48, 675-688.

Majello,B., Arcone,R., Toniatti,C., Ciliberto,G. (1990). Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J.* 9, 457-465.

Mann,E.A., Swenson,E.S., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Taguchi,T., Testa,J.R., Giannella,R.A. (1996). Localization of the guanylyl cyclase C gene to mouse chromosome 6 and human chromosome 12p12. *Genomics* 34, 265-267.

McCoy,D.E., Guggino,S.E., Stanton,B.A. (1995). The renal cGMP-gated cation channel: its molecular structure and physiological role. *Kidney Int.* 48, 1125-1133.

McMahon,E.G., Paul,R.J. (1986). Effects of forskolin and cyclic nucleotides on isometric force in rat aorta. *Am.J.Physiol* 250, C468-C473.

Mikami,T., Kusakabe,T., Suzuki,N. (1999). Tandem organization of medaka fish soluble guanylyl cyclase alpha1 and beta1 subunit genes. Implications for coordinated transcription of two subunit genes. *J.Biol.Chem.* 274, 18567-18573.

- Miki,N., Kawabe,Y., Kuriyama,K. (1977). Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys.Res.Comm.* 75, 851-856.
- Milner,R.J., Bloom,F.E., Lai,C., Lerner,R.A., Sutcliffe,J.G. (1984). Brain-specific genes have identifier sequences in their introns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 713-717.
- Misaka,T., Kusakabe,Y., Emori,Y., Gono,T., Arai,S., Abe,K. (1997). Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *J.Biol.Chem.* 272, 22623-22629.
- Mitchell,P.J., Wang,C., Tjian,R. (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847-861.
- Molina,C.R., Andresen,J.W., Rapoport,R.M., Waldman,S., Murad,F. (1987). Effect of in vivo nitroglycerin therapy on endothelium-dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 10, 371-378.
- Moncada,S., Palmer,R.M., Higgs,E.A. (1988). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12, 365-372.
- Morin,S., Paradis,P., Aries,A., Nemer,M. (2001). Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol.Cell Biol.* 21, 1036-1044.
- Mueller,P.R., Salser,S.J., Wold,B. (1988). Constitutive and metal-inducible protein:DNA interactions at the mouse metallothionein I promoter examined by in vivo and in vitro footprinting. *Genes Dev.* 2, 412-427.
- Mullaney,I., Vaughan,D.M., MacLean,M.R. (2000). Regional modulation of cyclic nucleotides by endothelin-1 in rat pulmonary arteries: direct activation of G(i)2-protein in the main pulmonary artery. *Br.J.Pharmacol.* 129, 1042-1048.
- Mülsch,A., Bauersachs,J., Schafer,A., Stasch,J.P., Kast,R., 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, 681-689.
- Mülsch,A., Oelze,M., Klöß,S., Mollnau,H., Topfer,A., Smolenski,A., Walter,U., Stasch,J.P., Warnholtz,A., Hink,U., Meinertz,T., Münzel,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, 2188-2194.

- Münzel,T., Giaid,A., Kurz,S., Stewart,D.J., Harrison,D.G. (1995). Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 5244-5248.
- Naito,S., Shimizu,S., Maeda,S., Wang,J., Paul,R., Fagin,J.A. (1998). Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* 274, C472-C480.
- Nakajima,M., Hutchinson,H.G., Fujinaga,M., Hayashida,W., Morishita,R., Zhang,L., Horiuchi,M., Pratt,R.E., Dzau,V.J. (1995). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 10663-10667.
- Nakane,M., Arai,K., Saheki,S., Kuno,T., Buechler,W., Murad,F. (1990). Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J.Biol.Chem.* 265, 16841-16845.
- Nakane,M., Murad,F. (1994). Cloning of guanylyl cyclase isoforms. *Adv.Pharmacol.* 26:7-18., 7-18.
- Nakane,M., Saheki,S., Kuno,T., Ishii,K., Murad,F. (1988). Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 157, 1139-1147.
- Ness,S.A., Marknell,A., Graf,T. (1989). The v-myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific mim-1 gene. *Cell* 59, 1115-1125.
- Nio,Y., Matsubara,H., Murasawa,S., Kanasaki,M., Inada,M. (1995). Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J.Clin.Invest* 95, 46-54.
- Ohyama,Y., Miyamoto,K., Saito,Y., Minamino,N., Kangawa,K., Matsuo,H. (1992). Cloning and characterization of two forms of C-type natriuretic peptide receptor in rat brain. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 183, 743-749.
- Olesen,S.P., Drejer,J., Axelsson,O., Moldt,P., Bang,L., Nielsen-Kudsk,J.E., Busse,R., Mulsch,A. (1998). Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br.J.Pharmacol.* 123 , 299-309.
- Oliveira,L., Miniou,P., Viegas-Pequignot,E., Rozet,J.M., Dollfus,H., Pittler,S.J. (1994). Human retinal guanylate cyclase (GUC2D) maps to chromosome 17p13.1. *Genomics* 22, 478-481.

- Palmer,R.M., Ferrige,A.G., Moncada,S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Papapetropoulos,A., Marczin,N., Mora,G., Milici,A., Murad,F., Catravas,J.D. (1995). Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension* 26, 696-704.
- Papapetropoulos,A., Marczin,N., Snead,M.D., Cheng,C., Milici,A., Catravas,J.D. (1994). Smooth muscle cell responsiveness to nitrovasodilators in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 23, 476-484.
- Parkinson,S.J., Jovanovic,A., Jovanovic,S., Wagner,F., Terzic,A., Waldman,S.A. (1999). Regulation of nitric oxide-responsive recombinant soluble guanylyl cyclase by calcium. *Biochemistry* 38, 6441-6448.
- Pei,D.Q., Shih,C.H. (1990). Transcriptional activation and repression by cellular DNA-binding protein C/EBP. *J.Virol.* 64, 1517-1522.
- Pevny,L., Simon,M.C., Robertson,E., Klein,W.H., Tsai,S.F., D'Agati,V., Orkin,S.H., Costantini,F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.
- Pfeifer,A., Klatt,P., Massberg,S., Ny,L., Sausbier,M., Hirneiss,C., Wang,G.X., Korth,M., Aszodi,A., Andersson,K.E., Krombach,F., Mayerhofer,A., Ruth,P., Fassler,R., Hofmann,F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17, 3045-3051.
- Pfeifer,A., Ruth,P., Dostmann,W., Sausbier,M., Klatt,P., Hofmann,F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 135:105-49., 105-149.
- Piette,J., Hirai,S., Yaniv,M. (1988). Constitutive synthesis of activator protein 1 transcription factor after viral transformation of mouse fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, 3401-3405.
- Poli,V., Mancini,F.P., Cortese,R. (1990). IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* 63, 643-653.
- Prendergast,G.C., Lawe,D., Ziff,E.B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 65, 395-407.

- Prins,B.A., Hu,R.M., Nazario,B., Pedram,A., Frank,H.J., Weber,M.A., Levin,E.R. (1994). Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 269, 11938-11944.
- Pryzwansky,K.B., Wyatt,T.A., Lincoln,T.M. (1995). Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils. *Blood* 85, 222-230.
- Raeymaekers,L., Eggermont,J.A., Wuytack,F., Casteels,R. (1990). Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump of bovine pulmonary artery. *Cell Calcium* 11, 261-268.
- Raleigh,E.A., Trimarchi,R., Revel,H. (1989). Genetic and physical mapping of the mcrA (rglA) and mcrB (rglB) loci of Escherichia coli K-12. *Genetics* 122, 279-296.
- Rall,T.W., Sutherland,E.W. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J.Biol.Chem.* 232, 1065-1076.
- Riggs,K.J., Merrell,K.T., Wilson,G., Calame,K. (1991). Common factor 1 is a transcriptional activator which binds in the c-myc promoter, the skeletal alpha-actin promoter, and the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol.Cell Biol.* 11, 1765-1769.
- Ruetten,H., Zabel,U., Linz,W., Schmidt,H.H. (1999). Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ.Res.* 85, 534-541.
- Russwurm,M., Behrends,S., Harteneck,C., Koesling,D. (1998). Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J.* 335, 125-130.
- Ryden,T.A., Beemon,K. (1989). Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol.Cell Biol.* 9, 1155-1164.
- Sakurai,T., Yanagisawa,M., Takuwa,Y., Miyazaki,H., Kimura,S., Goto,K., Masaki,T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 732-735.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.
- Schlossmann,J., Ammendola,A., Ashman,K., Zong,X., Huber,A., Neubauer,G., Wang,G.X., Allescher,H.D., Korth,M., Wilm,M., Hofmann,F., Ruth,P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* 404, 197-201.

Schmidt,H.H., Lohmann,S.M., Walter,U. (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim.Biophys.Acta* 1178, 153-175.

Schrammel,A., Behrends,S., Schmidt,K., Koesling,D., Mayer,B. (1996). Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol.Pharmacol.* 50, 1-5.

Schuler,L.A., Weber,J.L., Gorski,J. (1983). Polymorphism near the rat prolactin gene caused by insertion of an Alu-like element. *Nature* 305, 159-160.

Schultz,G., Bohme,E., Munske,K. (1969). Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 8, 1323-1332.

Schultz,G., Böhme,E. (1984). *Guanylate Cyclase: Methods of Enzymatic Analysis.* Weinheim: Verlag Chemie Weinheim.

Schultz,K., Schultz,K., Schultz,G. (1977). Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265, 750-751.

Schulz,S., Wedel,B.J., Matthews,A., Garbers,D.L. (1998). The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J.Biol.Chem.* 273, 1032-1037.

Sharina,I.G., Krumenacker,J.S., Martin,E., Murad,F. (2000). Genomic organization of alpha1 and beta1 subunits of the mammalian soluble guanylyl cyclase genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 10878-10883.

Shelton,K.D., Franklin,A.J., Khor,A., Beechem,J., Magnuson,M.A. (1992). Multiple elements in the upstream glucokinase promoter contribute to transcription in insulinoma cells. *Mol.Cell Biol.* 12, 4578-4589.

Shimouchi,A., Janssens,S.P., Bloch,D.B., Zapol,W.M., Bloch,K.D. (1993). cAMP regulates soluble guanylate cyclase beta 1-subunit gene expression in RFL-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am.J.Physiol* 265, L456-L461.

Shrivastava,A., Calame,K. (1994). An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. *Nucleic Acids Res.* 22, 5151-5155.

Sinnaeve,P., Chiche,J.D., Nong,Z., Varenne,O., Van Pelt,N., Gillijns,H., Collen,D., Bloch,K.D., Janssens,S. (2001). Soluble guanylate cyclase alpha(1) and beta(1) gene transfer increases NO responsiveness and reduces neointima formation after balloon injury in rats via antiproliferative and antimigratory effects. *Circ.Res.* 88, 103-109.

- Smigrodzki,R., Levitt,P. (1996). The alpha 1 subunit of soluble guanylyl cyclase is expressed prenatally in the rat brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 97, 226-234.
- Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. (1994). Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv.Pharmacol.* 26:87-114., 87-114.
- Stasch,J.P., Becker,E.M., Alonso-Alija,C., Apeler,H., Dembowski,K., Feurer,A., Gerzer,R., Minuth,T., Perzborn,E., Pleiss,U., Schroder,H., Schroeder,W., Stahl,E., Steinke,W., Straub,A., Schramm,M. (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 410, 212-215.
- Stoll,M., Steckelings,U.M., Paul,M., Bottari,S.P., Metzger,R., Unger,T. (1995). The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J.Clin.Invest* 95, 651-657.
- Stoll,M., Steckelings,U.M., Paul,M., Bottari,S.P., Metzger,R., Unger,T., Paquet,J.L., Baudouin-Legros,M., Brunelle,G., Meyer,P. (1990). Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* 8, 565-572.
- Stone,J.R., 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, 5636-5640.
- Stone,J.R., Marletta,M.A. (1995). The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry* 34, 16397-16403.
- Surks,H.K., Mochizuki,N., Kasai,Y., Georgescu,S.P., Tang,K.M., Ito,M., Lincoln,T.M., Mendelsohn,M.E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science* 286, 1583-1587.
- Sutcliffe,J.G., Milner,R.J., Bloom,F.E., Lerner,R.A. (1982). Common 82-nucleotide sequence unique to brain RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79, 4942-4946.
- Takata,M., Filippov,G., Liu,H., Ichinose,F., Janssens,S., Bloch,D.B., Bloch,K.D. (2001). Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 280, L272-L278.
- Tamura,N., Itoh,H., Ogawa,Y., Nakagawa,O., Harada,M., Chun,T.H., Suga,S., Yoshimasa,T., Nakao,K. (1996). cDNA cloning and gene expression of human type Ialpha cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 27, 552-557.

Timmermans,P.B., Wong,P.C., Chiu,A.T., Herblin,W.F., Benfield,P., Carini,D.J., Lee,R.J., Wexler,R.R., Saye,J.A., Smith,R.D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol.Rev.* 45, 205-251.

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

Tonnessen,T., Lunde,P.K., Giaid,A., Sejersted,O.M., Christensen,G. (1998). Pulmonary and cardiac expression of preproendothelin-1 mRNA are increased in heart failure after myocardial infarction in rats. Localization of preproendothelin-1 mRNA and endothelin peptide. *Cardiovasc.Res.* 39, 633-643.

Treisman,R., Marais,R., Wynne,J. (1992). Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. *EMBO J.* 11, 4631-4640.

Tsai,S.C., Manganiello,V.C., Vaughan,M. (1978). Purification of guanylate cyclase from rat liver supernatant. *J.Biol.Chem.* 253, 8542-8547.

Uhler,M.D. (1993). Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J.Biol.Chem.* 268, 13586-13591.

Ujiie,K., Drewett,J.G., Yuen,P.S., Star,R.A. (1993). Differential expression of mRNA for guanylyl cyclase-linked endothelium-derived relaxing factor receptor subunits in rat kidney. *J.Clin.Invest* 91, 730-734.

Unger,T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am.J.Cardiol.* 89(suppl), 3A-10A.

Unger,T., Chung,O., Csikos,T., Culman,J., Gallinat,S., Gohlke,P., Hohle,S., Meffert,S., Stoll,M., Stroth,U., Zhu,Y.Z. (1996). Angiotensin receptors. *J.Hypertens.Suppl* 14, S95-103.

Unger,T., Culman,J., Gohlke,P. (1998). Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection: pharmacological rationale and evidence. *J.Hypertens.Suppl* 16, S3-S9.

Vaandrager,A.B., Bot,A.G., De Jonge,H.R. (1997). Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology* 112, 437-443.

Vacca,F., Bagnato,A., Catt,K.J., Tecce,R. (2000). Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 60, 5310-5317.

- van de,W.M., Oosterwegel,M., Dooijes,D., Clevers,H. (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* *10*, 123-132.
- Vollmar,A.M., Schmidt,K.N., Schulz,R. (1996). Natriuretic peptide receptors on rat thymocytes: inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology* *137*, 1706-1713.
- Wagner,B.J., Hayes,T.E., Hoban,C.J., Cochran,B.H. (1990). The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J.* *9*, 4477-4484.
- Wagner,O.F., Christ,G., Wojta,J., Vierhapper,H., Parzer,S., Nowotny,P.J., Schneider,B., Waldhausl,W., Binder,B.R. (1992). Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J.Biol.Chem.* *267*, 16066-16068.
- Waldman,S.A., Murad,F. (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol.Rev.* *39*, 163-196.
- Wang,G.R., Zhu,Y., Halushka,P.V., Lincoln,T.M., Mendelsohn,M.E. (1998). Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *95*, 4888-4893.
- Warner,T.D., Mitchell,J.A., Sheng,H., Murad,F. (1994). Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. *Adv.Pharmacol.* *26:171-94.*, 171-194.
- Wasylyk,C., Flores,P., Gutman,A., Wasylyk,B. (1989). PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes. *EMBO J.* *8*, 3371-3378.
- Waterman,M.L., Fischer,W.H., Jones,K.A. (1991). A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes Dev.* *5*, 656-669.
- White,A.A., Aurbach,G.D. (1969). Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim.Biophys.Acta* *191*, 686-697.
- Wilcox,J.N., Augustine,A., Goeddel,D.V., Lowe,D.G. (1991). Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol.Cell Biol.* *11*, 3454-3462.
- Winning,R.S., Shea,L.J., Marcus,S.J., Sargent,T.D. (1991). Developmental regulation of transcription factor AP-2 during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Nucleic Acids Res.* *19*, 3709-3714.

- Wright,C.E., Fozard,J.R. (1988). Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol.* *155*, 201-203.
- Yamamoto,M., Ko,L.J., Leonard,M.W., Beug,H., Orkin,S.H., Engel,J.D. (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev.* *4*, 1650-1662.
- Yanagisawa,H., Hammer,R.E., Richardson,J.A., Emoto,N., Williams,S.C., Takeda,S., Clouthier,D.E., Yanagisawa,M. (2000). Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J.Clin.Invest* *105*, 1373-1382.
- Yanagisawa,H., Yanagisawa,M., Kapur,R.P., Richardson,J.A., Williams,S.C., Clouthier,D.E., de Wit,D., Emoto,N., Hammer,R.E. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* *125*, 825-836.
- Yanagisawa,M., Kurihara,H., Kimura,S., Tomobe,Y., Kobayashi,M., Mitsui,Y., Yazaki,Y., Goto,K., Masaki,T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* *332*, 411-415.
- Yanagisawa,M., Kurihara,H., Kimura,S., Tomobe,Y., Kobayashi,M., Mitsui,Y., Yazaki,Y., Goto,K., Masaki,T., Arai,H., Hori,S., Aramori,I., Ohkubo,H., Nakanishi,S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* *348*, 730-732.
- Yang,R.B., Foster,D.C., Garbers,D.L., Fulle,H.J. (1995). Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *92*, 602-606.
- Yang,R.B., Fulle,H.J., Garbers,D.L. (1996). Chromosomal localization and genomic organization of genes encoding guanylyl cyclase receptors expressed in olfactory sensory neurons and retina. *Genomics* *31*, 367-372.
- Yu,F., Warburton,D., Wellington,S., Danziger,R.S. (1996). Assignment of GUCIA2, the gene coding for the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase, to position 11q21-q22 on human chromosome 11. *Genomics* *33*, 334-336.
- Yu,Y.T., Breitbart,R.E., Smoot,L.B., Lee,Y., Mahdavi,V., Nadal-Ginard,B. (1992). Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev.* *6*, 1783-1798.
- Yuen,P.S., Potter,L.R., Garbers,D.L. (1990). A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* *29*, 10872-10878.

Zabel,U., Weeger,M., La,M., Schmidt,H.H. (1998). Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J.* 335, 51-57.

Zar,J.H. (1996). In: *Biostatistical analysis*.Upper Saddle River, New Jersey 07458: Prentice-Hall.

Zhang,L., Lemarchandel,V., Romeo,P.H., Ben David,Y., Greer,P., Bernstein,A. (1993). The Fli-1 proto-oncogene, involved in erythroleukemia and Ewing's sarcoma, encodes a transcriptional activator with DNA-binding specificities distinct from other Ets family members. *Oncogene* 8, 1621-1630.

Zou,M.H., Klein,T., Pasquet,J.P., Ullrich,V. (1998). Interleukin 1beta decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. *Biochem J.* 336, 507-512.

Zou,M.H., Leist,M., Ullrich,V. (1999). Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am.J.Pathol.* 154, 1359-1365.

Zwiller,J., Basset,P., Mandel,P. (1981). Rat brain guanylate cyclase. Purification, amphiphilic properties and immunological characterization. *Biochim.Biophys.Acta* 658, 64-75.

VII Zusammenfassung

Die lösliche Guanylyl Zyklase (sGC) ist das Schlüsselenzym, das die Stickstoffmonoxid (NO)-induzierte Vasodilatation über eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen 3',5'-Guanosinmonophosphats (cGMP) vermittelt. Obwohl die sGC oft als „Haushalts“-Gen bezeichnet wurde, dessen Aktivität nur akut durch die verfügbare NO-Menge reguliert wird, zeigen einige neuere Befunde, dass eine Regulation auch auf Ebene der Gen-Expression stattfindet. Z.B. wurde in zwei Rattenmodellen, der Nitrat-Toleranz (Mülsch *et al.*, 2001) bzw. des chronischen Herzversagens (Bauersachs *et al.*, 1999), eine zwei- bis dreifache Induktion der sGC-Expression beobachtet. Bei der Nitrat-Toleranz wurde zudem ein Anstieg der Endothelin-1 (ET-1)-Expression beobachtet (Münzel *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob ET-1 einen Einfluss auf die sGC-Expression und die sGC/cGMP vermittelte Relaxation von Rattengefäßen hat.

Um den möglichen Einfluss von ET-1 auf die Transkription der sGC zu untersuchen sollten die Promotoren der beiden Untereinheiten (UE) α_1 und β_1 der Ratte kloniert werden. Dazu wurde zuerst eine Bestimmung der Transkriptionsstarts für beide UE durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Sequenz der bis dahin bekannten 5' Untranslatierten Region (5' UTR) der α_1 -UE (Nakane *et al.*, 1990) nicht korrekt war. Die ersten 213 bp dieser Sequenz konnten nicht gefunden werden. Für die β_1 -UE konnte der 5' UTR um 30 bp, im Vergleich zu der von Nakane (1990) publizierte Sequenz, verlängert werden. Letztlich konnten mit Hilfe einer PCR-Technik 2864 bp (α_1) und 1287 bp (β_1) in 5' Richtung des Transkriptionsstarts kloniert und sequenziert werden. Beide Promotoren zeigten eine basale Aktivität, die sich mit zunehmender Verkürzung der Bereiche in Richtung Transkriptionsstart erhöhte. Die basale Aktivität der beiden UE-Promotoren zeigte, dass die Gene der beiden UE nicht in Tandemorganisation, wie im Medakafisch (Mikami *et al.*, 1999) vorliegen, sondern ähnlich wie bei der Maus (Sharina *et al.*, 2000) beide UE unabhängig voneinander reguliert werden.

Beide Promotoren ließen sich durch eine 6 stündige Stimulation mit ET-1 [10nM] um das ca. 1,6 bis 1,9fache aktivieren. Bei Verkürzung des α_1 -Promotors wurde zudem festgestellt, dass das kürzeste Fragment sich nicht mehr durch ET-1 stimulieren ließ. In den 146 bp, die diesem Konstrukt fehlten, befinden sich mögliche Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren PEA3, NF- κ B und E2A.

In kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte konnte mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden, dass ET-1 (10 nM, 6 Std.) die Expression beider UE auf mRNA-Ebene um das ca. dreifache erhöht. Zudem konnte für die β_1 -UE mit Hilfe der Real-Time-PCR (TaqMan™) und für die ET-Rezeptortypen spezifische Antagonisten gezeigt werden, dass dieser ET-1 Effekt über den ET_A-Rezeptor vermittelt wird.

Bei isometrischen Kontraktionsmessungen an Endothel-freien Rattengefäßen konnte gezeigt werden, dass eine 4 stündige Vorstimulation mit 10 nM ET-1 die für eine 50%ige Relaxation der Gefäße nötige Konzentration des NO-Donors Natriumnitropussuid (SNP) um ca. eine Zehnerpotenz verringert. ET-1 erzeugt also eine deutliche Sensitivierung der Gefäße gegenüber NO. Durch Versuche mit einem stabilem cGMP-Analogen (8-Bromo-cGMP) konnte zudem gezeigt werden, dass nachfolgenden Elemente der NO/cGMP Signalkette nicht durch die ET-1 Stimulation beeinflusst wurden. Auch Teile der Signalkette, die die cAMP-induzierte Relaxation vermitteln, wurden nicht durch ET-1 beeinflusst.

Schließlich konnte in *in-vitro* Versuchen gezeigt werden, dass ET-1 sowohl in Endothel-freien Rattenaorten und Koronargefäßen des Schweins, als auch in kultivierten, glatten Rattengefäßmuskelzellen eine signifikante Steigerung der spezifischen NO-induzierten sGC-Aktivität bewirkt.

Die in dieser Arbeit gezeigte Steigerung der Promotoraktivität, der mRNA-Mengen und der enzymatischen Aktivität der sGC durch ET-1 deutet auf einen biologischen Rückkoppelungsmechanismus hin. Dieser würde einer übermäßigen Vasokontraktion und den mitogenen Effekten von ET-1 bei einer Überexpression entgegen wirken und wäre somit ein wichtiges Element der Feineinstellung der ET-1 Wirkung.

VIII Anhang

1 Plasmid Karten

Die Übersichtskarten der bei der Untersuchung der Promotoraktivitäten verwendeten Reporter-genkonstrukte sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

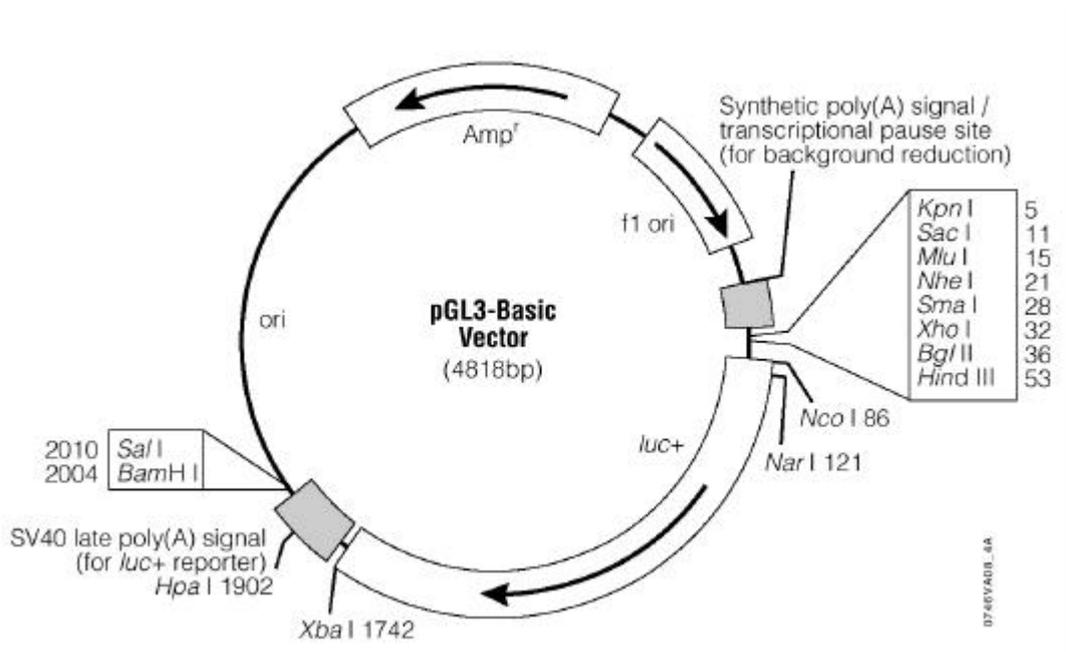


Abbildung 29: Schematische Darstellung des verwendeten Reporter-gen-Plasmids.
Die Karte wurde dem Promega Manual Nr.: 033 entnommen.

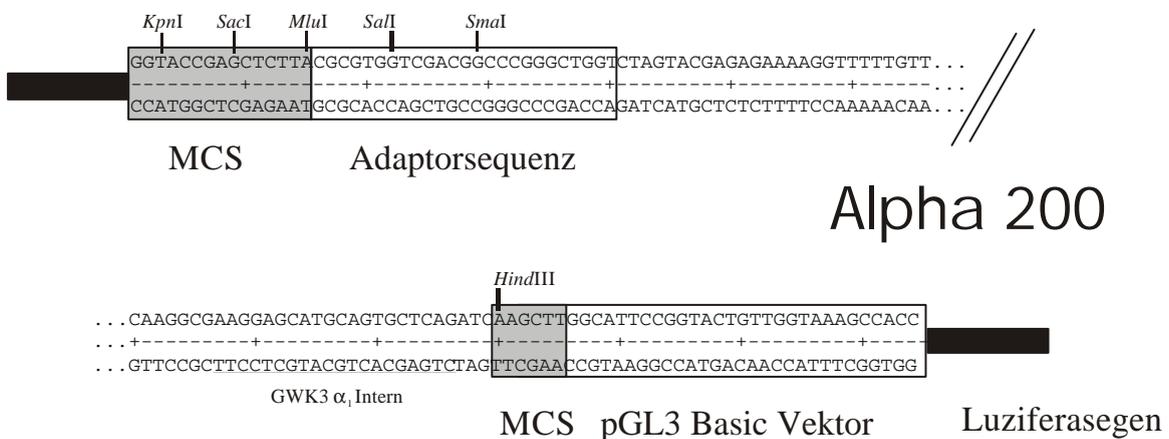


Abbildung 30: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 200 Konstrukts.

Das Amplifikat des GenomeWalker™ Experiments (vgl. Kapitel IV2.1), kloniert in pBluescript® II SK⁺, wurde mit *MluI* und *HindIII* ausgeschnitten und in einen mit *MluI* und *HindIII* geöffneten Vektor gebracht

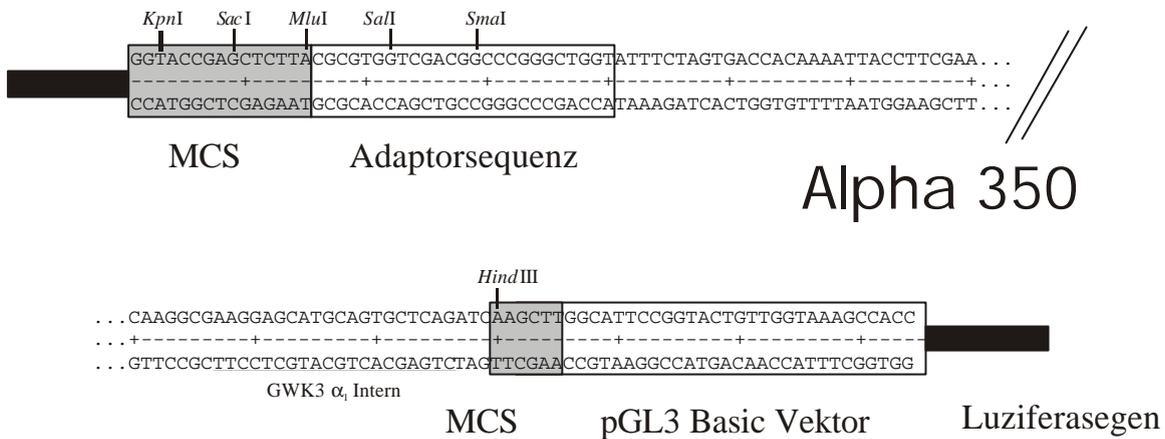


Abbildung 31: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 350 Konstrukts.

Das Amplifikat des GenomeWalker™ Experiments (vgl. Kapitel IV2.1), kloniert in pBluescript® II SK⁺, wurde mit *MluI* und *HindIII* ausgeschnitten und in einen mit *MluI* und *HindIII* geöffneten Vektor gebracht.

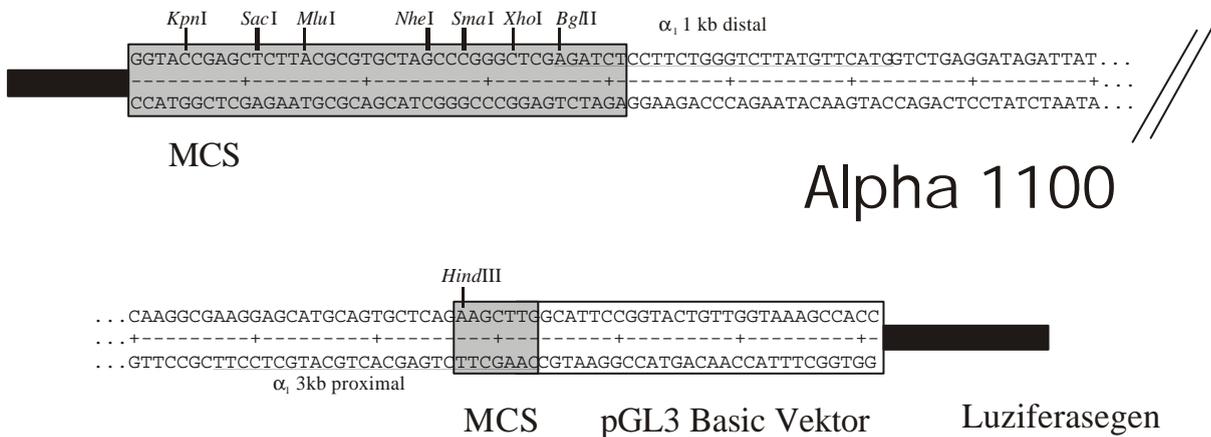


Abbildung 32: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 1100 Konstrukts.

Der Klon pBluescript® II SK⁺ mit dem 3 kb α₁ Promotorfragment (vgl. Kapitel IV2.1) diente als Matrize für eine PCR mit den modifizierten Primern α₁ 1,1 kb distal (mit *BglII* Schnittstelle) und α₁ 3 kb proximal (mit *HindIII* Schnittstelle) als Matrize. Das Amplifikat wurde mit *BglII* und *HindIII* verdaut und in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor pGL3-Basic gebracht.

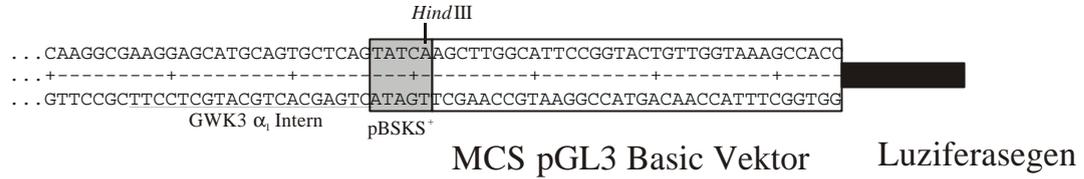
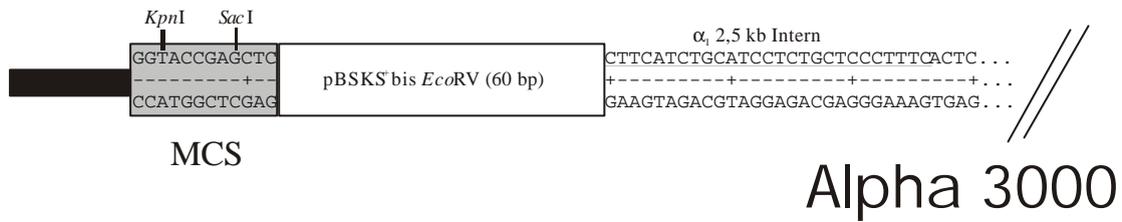


Abbildung 33: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 3000 Konstrukts.

Es wurde genomische DNA der Ratte als Matrize verwendet und mit den Primerpaaren α_1 2,5 Intern/Extern (5' Ende) und α_1 GWK3 Intern/Extern (3' Ende) eine nested PCR ausgeführt. Das Amplifikat wurde in pBluescript[®] II SK⁺ (*EcoRV* geöffnet) kloniert und über *SacI* und *HindIII* in den pGL3-Basic gebracht.

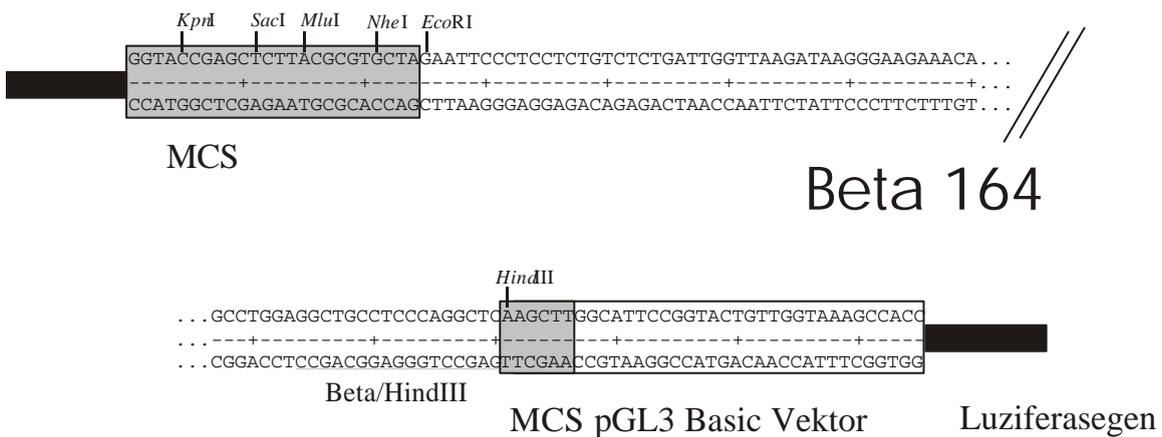


Abbildung 34: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 164 Konstrukts.

pGL3 Beta312 wurde mit *EcoRI* und *NheI* geschnitten und nach einer Auffüll-Reaktion relegiert

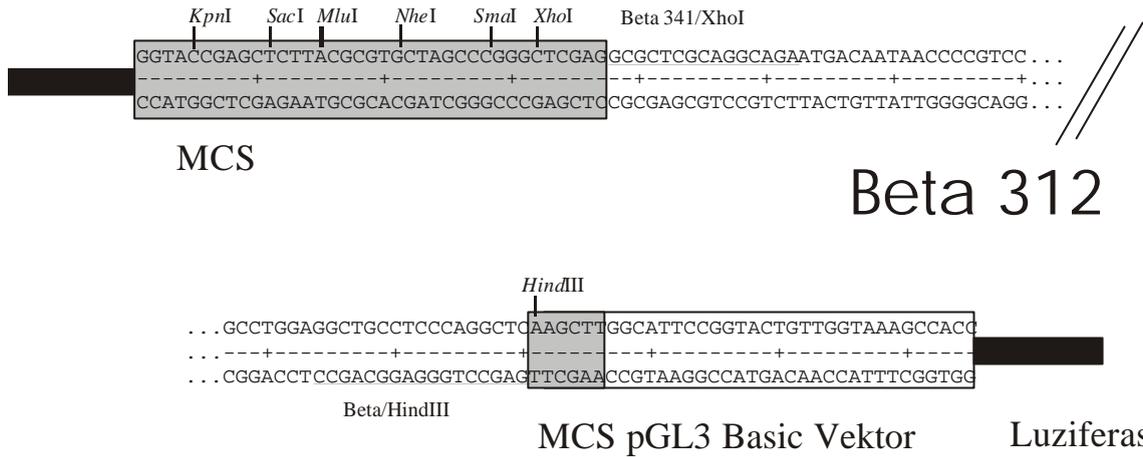


Abbildung 35: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 312 Konstrukts.

pGL3 Beta1200 diente als Matrize für PCR mit den Primern Beta312/*XhoI* (5' Ende) und Beta/*HindIII* (3' Ende). Das Amplifikat wurde in pBluescript[®] II SK⁺ (*EcoRV* geschnitten) kloniert und über *XhoI* und *HindIII* in den Vektor pGL3-Basic gebracht.

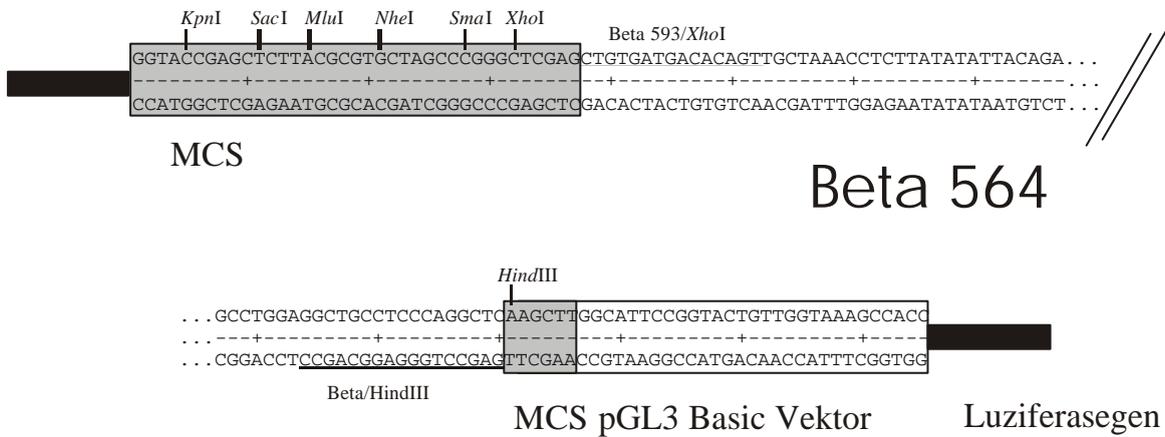


Abbildung 36: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 564 Konstrukts.

pGL3 Beta1200 diente als Matrize für PCR mit den Primern Beta564/*XhoI* (5' Ende) und Beta/*HindIII* (3' Ende). Das Amplifikat wurde in pBluescript[®] II SK⁺ (*EcoRV* geschnitten) kloniert und über *XhoI* und *HindIII* in den pGL3-Basic gebracht.

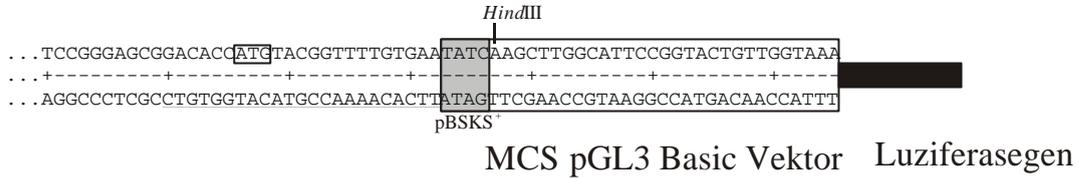
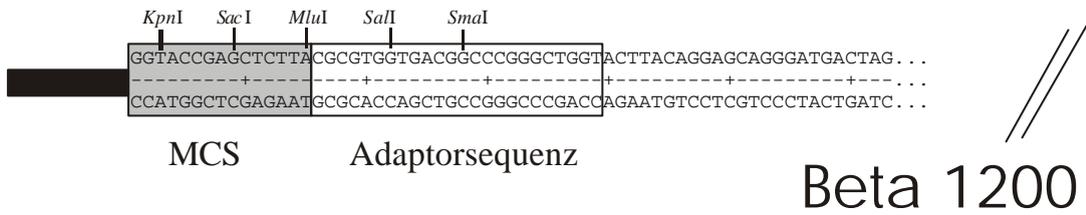


Abbildung 37: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 1200 Konstrukts.

Das Insert wurde aus dem pBluescript[®] II SK⁺ (vgl. Kapitel IV.2.3) mit *Mlu*I und *Hind*III ausgeschnitten und in den pGL3-Basic, geöffnet mit *Mlu*I und *Hind*III kloniert. Es verblieb das Startcodon und ein 4 bp großes Stück pBluescript[®] II SK⁺ vor dem 3' Beginn des pGL3-Basic Vektors.

2 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung des α_1/β_1 -Heterodimers.	4
Abbildung 2: Übersicht der verschiedenen Wirkungsmechanismen von NO.	11
Abbildung 3: Synthesewege von Angiotensin II.	14
Abbildung 4: Schema der Endothelinsynthese und Rezeptorbindungen.	17
Abbildung 5: Übersicht über die Signalkaskaden ET-1 im Gefäßsystem.	19
Abbildung 6: Vergleich der Sequenzen der α_1 sGC mRNA und der Klone α_1 TS1 und α_1 TS2.	54
Abbildung 7: Vergleich der Sequenzen der β_1 sGC mRNA und der Klone β_1 TS1 und β_1 TS2.	55
Abbildung 8: GenomeWalker™ PCR. Erhaltene Fragmente für die α_1 Untereinheit.	57
Abbildung 9: Übersichtskarte der klonierten α_1 Promotoren.	58
Abbildung 10: GenomeWalker™ PCR zur Verlängerung der schon erhaltenen Fragmente für die α_1 Untereinheit.	59
Abbildung 11: Übersichtskarte der α_1 Promotorverlängerungen.	60
Abbildung 12: Übersichtskarte der α_1 Promotorfragment Fusionen.	61
Abbildung 13: Übersicht über die in dieser Arbeit erhaltenen Klone des Promotors der α_1 Untereinheit der sGC und ihrer Lage zueinander.	62
Abbildung 14: Sequenz und <i>in-silico</i> Analyse des α_1 -Promotors.	66
Abbildung 15: GenomeWalker™ PCR zur Klonierung von Promotorbereichen der β_1 Untereinheit.	69
Abbildung 16: Übersichtskarte des β_1 Klons.	70
Abbildung 17: Sequenz und <i>in-silico</i> Analyse des β_1 -Promotors.	72
Abbildung 18: Luziferaseaktivitäten der α_1 Promotorkonstrukte im Vergleich zum Leervektor.	75
Abbildung 19: Luziferaseaktivitäten der β_1 Promotorkonstrukte im Vergleich zum Leervektor.	76
Abbildung 20: Luziferaseaktivitäten der α_1 und β_1 Promotorkonstrukte nach ET-1 Stimulation.	77
Abbildung 21: RT-PCR Analyse der mRNA-Expression der sGC α_1 - und β_1 -Untereinheit nach AngII Stimulation.	78
Abbildung 22: Repräsentatives Ergebnis einer Analyse der Expression der α_1 und β_1 sGC Untereinheiten nach ET-1 Stimulation.	79
Abbildung 23: Summarische Auswertung der RT-PCR Daten nach ET-1 Stimulation.	80
Abbildung 24: Expression der β_1 -sGC mRNA in ET-1 stimulierten VSMC.	81
Abbildung 25: SNP-induzierte Relaxation ET-1 behandelter endothel-freier Aorten Ringe.	82
Abbildung 26: Forskolin induzierte Relaxation ET-1 behandelter endothel-freier Aortenringe der Ratte.	84
Abbildung 27: 8-Br-cGMP induzierte Relaxation ET-1 behandelter endothel-freier Rattenaorten.	85
Abbildung 28: sGC Aktivitätsmessung in verschiedenen Geweben nach ET-1-Behandlung	86
Abbildung 29: Schematische Darstellung des verwendeten Reporter-gen-Plasmids.	124
Abbildung 30: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 200 Konstrukts.	125
Abbildung 31: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 350 Konstrukts.	125

Abbildung 32: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 1100 Konstrukts.	125
Abbildung 33: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Alpha 3000 Konstrukts.	126
Abbildung 34: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 164 Konstrukts.	126
Abbildung 35: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 312 Konstrukts.	127
Abbildung 36: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 564 Konstrukts.	127
Abbildung 37: Übersicht der Vektor Insert Übergänge des Beta 1200 Konstrukts.	128

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewebedistribution und Chromosomale Lokalisation der sGC Untereinheiten im Menschen.	3
Tabelle 2: Übersicht über die Änderungen der sGC-Expression.	7
Tabelle 3: Die verschiedenen bekannten pGC's und deren Liganden, Kofaktoren, chromosomale Lokalisation und Expressionsmuster.	10
Tabelle 4: Übersicht über Substrate der PKG I und die durch die Phosphorylierung hervorgerufene Effekte.	12
Tabelle 5: Übersicht der verschiedenen Wirkungen der AngII Rezeptortypen.	15
Tabelle 6: Übersicht der Gewebeexpression von ET-1 und der beiden Rezeptortypen (ET _A und ET _B).	18
Tabelle 7: Übersicht der Funktionen des Endothelinsystems in verschiedenen Geweben.	21
Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte	27
Tabelle 9: Liste diverser Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 10: Liste der für die RT-PCR verwendeten Primer	38
Tabelle 11: Liste der für die Real-time PCR verwendeten Primer.	41
Tabelle 12: Liste der für die Transkriptionsstartbestimmung verwendeten Oligonukleotide.	42
Tabelle 13: Liste der für die Promotorklonierungen verwendeten Primer.	43
Tabelle 14: Liste der verwendeten Sequenzierprimer.	44
Tabelle 15: Liste der <i>in-silico</i> gefundenen Bindungsregionen verschiedener Transkriptionsfaktoren	67
Tabelle 16: Liste der <i>in-silico</i> gefundenen, möglicherweise bindender Transkriptionsfaktoren.	68
Tabelle 17: Liste der <i>in silico</i> gefundenen Bindungsregionen verschiedener Transkriptionsfaktoren.	73
Tabelle 18: Liste der <i>in silico</i> gefundenen, potentieller Transkriptionsfaktoren der β_1 Untereinheit.	73

4 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (<i>Angiotensin converting enzyme</i>)
Ang	Angiotensin
AT	AngiotensinII Rezeptor
B	Cytosin, Guanin oder Thymin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
D	Adenin, Guanin oder Thymin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat; umfaßt dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECE	Endothelin konvertierendes Enzym (<i>Endothelin converting enzyme</i>)
ET	Endothelin
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
°C	Grad Celsius
h	Stunde
H	Adenin, Cytosin oder Thymin
Ig	Immunglobulin
K	Guanin oder Thymin (Keto)
kb	Kilobase
kDa	Kilo dalton
μ	Mikro
M	Molar
M	Adenin oder Cytosin (Amino)
min	Minuten
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)

MW	Molekulargewicht
n	Nano
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p	Pico
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfomylfluorid
R	Guanin oder Adenin (Purine)
RLU	Relative Licht Einheiten (Relativ Light Unit)
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Ketten Reaktion
s	siehe
S	Guanin oder Cytosin (Strong)
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sGC	Lösliche Guanylyl Zyklase
sog.	sogenannt
Std	Stunde
T	Thymin
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
U	Enzymeinheit
UE	Untereinheit
UTR	nicht tranlatierte Region (<i>untranslated region</i>)
V	Volt
V	Adenin, Cytosin oder Guanin
v/v	Volumen-Volumen-Verhältnis
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
W	Adenin oder Thymin (Weak)
w/v	Gewichts-Volumen-Verhältnis (<i>weight/volume</i>)
w/w	Gewichts-Gewichts-Verhältnis
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Y	Thymin oder Cytosin (Pyrimidine)

5 *Lebenslauf*

Name: Meik Helmut Behrens
Anschrift: Ludwig-Rehn Straße 16
60596 Frankfurt
Geburtsdatum: 29.03.1971 in Wolfsburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1977-1981 Grundschole in Vorsfelde
1981-1983 Orientierungsstufe in Vorsfelde
1983-1987 Gymnasium in Vorsfelde
1987-1990 Gymnasium in Wolfsburg, Abschluß: Abitur

Hochschulbildung:

11/1990-03/1993 Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
Studium der Biologie

Zivildienst:

04/1993-05/1994 Fahrer des Behindertentransportdienstes
des Arbeiter Samariter Bundes in Würzburg

Hochschulbildung:

05/1994-04/1998 Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
Studium der Biologie Schwerpunkte:
Molekulare Genetik, Mikrobiologie und Verhaltensphysiologie
Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur transkriptionellen
Kontrolle von Differenzierungsprozessen bei der Muskelbildung
Abschluß: Diplom-Biologe, Note: „gut“

seit November 1998 Promotion am Klinikum der Johann-Wolfgang
Goethe Universität im Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, AG
Prof. Dr. A. Mülsch

6 **Publikationen**

Teile dieser Arbeit wurden bei den im folgenden aufgelisteten Kongressen als Vortrag oder Posterpräsentation vorgestellt.

6.1 **Vorträge**

M.H. Behrens, K.F. Beck, O. Abu Hassan, J. Pfeilschifter, A. Mülsch

Endothelin sensitizes blood vessels to NO induced relaxation by upregulation of guanylyl cyclase. Joint Congress of the German and Scandinavian Physiological Societies 2001, Humboldt-Universität Berlin, Berlin, Deutschland.

M.H. Behrens, K.F. Beck, O. Abu Hassan, J. Pfeilschifter, A. Mülsch

Endothelin sensitizes blood vessels to nitric oxide-induced relaxation by transcriptional upregulation of soluble guanylyl cyclase. 7. International Conference on Endothelin, 2001 Edinburgh, England.

M.H. Behrens, K.F. Beck, O. Abu Hassan, J. Pfeilschifter, A. Mülsch

Endothelin-1 induces transcription of soluble guanylyl cyclase α_1 and β_1 subunit genes. 7. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, 2001 Magdeburg, Deutschland.

6.2 **Posterpräsentationen**

M.H. Behrens, K.F. Beck, O. Abu Hassan, J. Pfeilschifter, A. Mülsch

Endothelin induces transcriptional upregulation of soluble GC.

2nd European Meeting on Vascular Biology and Medicine, 2001 Ulm, Deutschland.

M.H. Behrens, K.F. Beck, O. Abu Hassan, J. Pfeilschifter, A. Mülsch

Endothelin-1 sensitizes blood vessels to NO-induced relaxation by transcriptional upregulation of soluble guanylyl cyclase subunit genes. Goethe-University/Aventis Workshop in Chemical Biology: Dissecting G-Protein-Coupled Receptors: Structure, Function, and Ligand Interaction, 2002 Wiesbaden, Deutschland.

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von November 1998 bis Februar 2002 am Zentrum der Physiologie des Universitätsklinikums Frankfurt/Main und des *pharmazentrum frankfurt* unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz und Herrn Prof. Dr. Mülsch durchgeführt.

Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz, der Leiterin des Instituts für Humangenetik der J.-W. Goethe-Universität Frankfurt/Main, schulde ich großen Dank für die Förderung und für die Möglichkeit, diese Dissertation unter ihrer Betreuung durchzuführen.

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

Herrn Prof. Dr. Pfeilschifter, dem Leiter des *pharmazentrum frankfurt*, gilt mein Dank für die Möglichkeit in seinem Institut arbeiten zu dürfen und die äußerst freundliche Aufnahme.

Herrn Dr. Karl-Friedrich Beck danke ich für die seine stete Freundlichkeit und kompetente Beratung in allen technischen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Luise Reinsberg für ihre hervorragende Unterstützung bei der Ausführung der GC-Aktivitätstests.

Herrn Osama Abu Hassan danke ich herzlichst für seine Hilfe bei den Organbadversuchen und seine stete Freundlichkeit.

Natürlich danke ich auch allen meinen Kollegen im Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und im *pharmazentrum frankfurt* für Ihre Unterstützung und das hervorragende Arbeitsklima.