

Aus dem Zentrum der Physiologie  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Kontrolle der glattmuskulären GC-Aktivität via  
NO-Sensitivität, Häm-Redox-Status und Proteinexpression**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Andrea Töpfer**

Frankfurt am Main 2001

Aus dem Zentrum der Physiologie  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Betreuer: Prof. Dr. Alexander Mülsch

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Martin Diener

**Kontrolle der glattmuskulären GC-Aktivität via  
NO-Sensitivität, Häm-Redox-Status und Proteinexpression**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Andrea Töpfer**

Tierärztin aus

Frankfurt am Main 2001

Für meine Eltern

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Mülsch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2001

Töpfer, Andrea:

Dissertation "Kontrolle der glattmuskulären GC-Aktivität via NO-Sensitivität,  
Häm-Redox-Status und Proteinexpression"

ISBN 3-930657-43-0

© 2001 by

12 & 12

12&12 Verlag  
Karl-Hermann-Flach-Str. 32  
61440 Oberursel  
Germany  
Fax 06171 4956

<http://BuchVers12.de>

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Gefäßtonusregulation durch das NO/cGMP-System.....	1
1.1.1	Stickstoffmonoxid (NO).....	1
1.1.2	Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP).....	2
1.1.3	Mechanismus der Gefäßkontraktion.....	4
1.1.4	Lösliche Guanylylcyclase (GC).....	5
1.1.5	Aktivatoren der GC.....	6
1.1.6	Akute Desensitivierung der GC.....	7
1.2	GC-Regulation in Tiermodellen mit vaskulären Störungen.....	8
1.2.1	Nitrattoleranz.....	8
1.2.2	Bluthochdruck in Dahl-S-Ratten.....	10
1.3	Ziel der Arbeit.....	12
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
2.1	Material.....	15
2.1.1	Substanzen.....	15
2.1.2	Zusammensetzung der Lösungen.....	16
2.1.2.1	Hepes-Tyrode-Pufferlösung.....	16
2.1.2.2	Krebs-Henseleit-Pufferlösung.....	16
2.1.2.3	Lösungen für Proteinaufarbeitung, SDS-Page und Immunoblot.....	17
2.1.3	Lösungsvorschriften.....	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Tierspezies und Haltungsbedingungen.....	20
2.2.2	Tiermodelle.....	20
2.2.2.1	Behandlung mit der Substanz S973448 für 3 Tage.....	20
2.2.2.2	Behandlung mit der Substanz HMR1766 für 3 Tage.....	21
2.2.2.3	Behandlung mit der Substanz HMR1766 für 4 Wochen.....	21
2.2.2.4	Implantation der osmotischen Minipumpe.....	21
2.2.2.5	Fütterung mit salzreicher Diät.....	22
2.2.3	Isolation von Gefäßsegmenten der <i>A. thoracalis</i> der Ratte.....	22
2.2.4	Durchführung der isometrischen Kontraktionsmessungen im Organbad.....	23
2.2.4.1	Methode A.....	23
2.2.4.2	Methode B.....	24
2.2.5	Isolierung nativer Proteine.....	25
2.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zur Proteinauftrennung.....	25
2.2.7	Immunoblot (Western Blot).....	26
2.2.8	Statistische Auswertung.....	27

<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>		
3.1	GC-Regulation bei intakter Gefäßfunktion.....	29		
3.1.1	Akute Desensitivierung der glattmuskulären GC gegenüber NO durch das Endothel.....	29		
3.1.1.1	Nachweis der Wirkung des bei isometrischer Kontraktion aus Rattenaorten <i>in vitro</i> freigesetzten endothelialen NO.....	29		
3.1.1.2	Einfluß des endothelialen NO auf die Natriumnitroprussid-induzierte Relaxation Phenylephrin-kontrahierter Rattenaorten <i>in vitro</i> .....	32		
3.1.1.3	Einfluß von exogen zugeführtem NO auf die Natriumnitroprussid-induzierte Relaxation von Rattenaorten <i>in vitro</i> .....	34		
3.1.1.4	Einfluß des Atrialen Natriuretischen Faktors auf die Natriumnitroprussid-induzierte Relaxation von Rattenaorten <i>in vitro</i> .....	36		
3.1.2	Einfluß von endogenem NO auf den Oxidationszustand des Hämeisens der GC in isolierten Rattenaorten.....	38		
3.1.3	Einfluß einer chronischen Aktivierung der Häm-oxidierten GC <i>in vivo</i> auf die NO-Sensitivität des Enzyms in isolierten Rattenaorten.....	40		
3.1.3.1	Akute relaxierende Wirkung von S973448 <i>in vitro</i> auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage).....	40		
3.1.3.2	Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin <i>in vitro</i> auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage).....	42		
3.1.3.3	Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol <i>in vitro</i> auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage).....	43		
3.1.3.4	Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 <i>in vitro</i> auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage).....	44		
3.1.3.5	Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin <i>in vitro</i> auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage).....	46		
3.1.3.6	Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol <i>in vitro</i> auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage).....	47		
3.1.3.7	Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 <i>in vitro</i> auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen).....	48		
3.1.3.8	Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin <i>in vitro</i> auf Aorten HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen).....	50		
3.1.3.9	Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol <i>in vitro</i> auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen).....	51		
3.1.4	Western Blot Analyse der Expression der $\alpha_1$ - und der $\beta_1$ -Untereinheit der GC von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen).....	53		
3.2	GC-Regulation bei vaskulären Störungen.....	55		
3.2.1	Einfluß von Nitrattoleranz auf NO-Sensitivität, Häm-Redox-Zustand und Expression der GC.....	55		
3.2.1.1	Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage).....	56		
3.2.1.2	Akute relaxierende Wirkung von Natriumnitroprussid <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage).....	57		
3.2.1.3	Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage).....	58		
3.2.1.4	Akute relaxierende Wirkung von S973448 <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage).....	60		
3.2.1.5	Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage).....	61		
3.2.1.6	Western Blot Analyse der Expression der $\alpha_1$ - und der $\beta_1$ -Untereinheit der GC von NTG-behandelten Ratten (3 Tage).....	63		
3.2.2	Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf NO-Sensitivität, Häm-Redox-Zustand und Expression der GC in Dahl-S-Ratten.....	65		
3.2.2.1	Akute relaxierende Wirkung von ACh <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	65		
3.2.2.2	Akute relaxierende Wirkung von NNP <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	67		
3.2.2.3	Akute relaxierende Wirkung von YC-1 <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	69		
3.2.2.4	Akute relaxierende Wirkung von S973448 <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	71		
3.2.2.5	Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	73		
3.2.3	Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf die Expression der GC in Dahl-S-Ratten.....	74		
3.2.3.1	Western Blot Analyse der Expression der $\alpha_1$ - und der $\beta_1$ -Untereinheit der in Dahl-S-Ratten.....	74		
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>77</b>		
5.1	GC-Regulation bei intakter Gefäßfunktion.....	78		
5.1.1	Akute Desensitivierung der glattmuskulären GC gegenüber exogenem NO durch das endotheliale NO.....	78		
5.1.2	Akute Desensitivierung der GC durch exogene NO-Donoren.....	80		
5.1.3	Einfluß des Atrialen Natriuretischen Faktors auf die Desensitivierung der GC.....	81		
5.1.4	Akute Aktivierung der GC durch Aktivatoren der Häm-oxidierten GC.....	82		
5.1.5	Chronische Aktivierung der GC durch Aktivatoren der Häm-oxidierten ...	84		
5.1.5.1	Akute relaxierende Wirkung von S973448, ACh und NTG <i>in vitro</i> auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage).....	85		
5.1.5.2	Akute relaxierende Wirkung von HMR1766, ACh und NTG <i>in vitro</i> auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage).....	86		
5.1.5.3	Akute relaxierende Wirkung von HMR1766, ACh und NTG <i>in vitro</i> auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen).....	87		
5.1.5.4	GC-Expression in HMR1766-behandelten Rattenaorten (4 Wochen).....	88		
5.2	GC-Regulation bei vaskulären Störungen.....	89		
5.2.1	Einfluß von Nitrattoleranz auf NO-Sensitivität, Häm-Redox-Zustand und GC-Expression .....	89		

5.2.1.1	Akute relaxierende Wirkung von NTG <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten.....	89
5.2.1.2	Akute relaxierende Wirkung von NNP <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten.....	90
5.2.1.3	Akute relaxierende Wirkung von ACh <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage).....	91
5.2.1.4	Akute relaxierende Wirkung von S973448 und HMR1766 <i>in vitro</i> auf Aorten von NTG-behandelten Ratten.....	92
5.2.1.5	Einfluß von Nitrattoleranz auf die Expression der GC in Rattenaorten.....	94
5.2.2	Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf NO-Sensitivität, Häm-Redox-Zustand und Expression der GC in Dahl-S-Ratten.....	95
5.2.2.1	Akute relaxierende Wirkung von ACh <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	95
5.2.2.2	Akute relaxierende Wirkung von NNP <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	96
5.2.2.3	Akute relaxierende Wirkung von YC-1 <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	98
5.2.2.4	Akute relaxierende Wirkung von S973448 <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	99
5.2.2.5	Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 <i>in vitro</i> auf Aorten von Dahl-S-Ratten.....	99
5.2.2.6	Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf die Expression der GC in Dahl-S-Ratten.....	100
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>103</b>
<b>VI</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>105</b>
<b>VII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>107</b>
<b>VIII</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AK	Antikörper
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
AMPS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	salzsensitive Dahl-Ratten
DR	salzresistente Dahl-Ratten
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Relaxation
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
g	Normalfallbeschleunigung
GC	lösliche Guanylylcyclase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HMR1766	schwefelsubstituiertes Sulfonylamino-carbonsäure-N-arylamid
IE	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
Kap.	Kapitel
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
L-NNA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
nM	Nanomol pro Liter
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
NNP	Natriumnitroprussid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NTG	Nitroglycerol
Page	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PE	Phenylephrin
PEG	Polyethylenglykol
pGC	partikuläre Guanylylcyclase
S973448	schwefelsubstituiertes Sulfonylamino-carbonsäure-N-arylamid
s.c.	subkutan
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Poly(oxyethylen)'20-Sorbantin-Monolaurat
UE	Untereinheit
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzylindazol

## I Einleitung

### 1.1 Gefäßtonusregulation durch das NO/cGMP-System

#### 1.1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Der zuerst von Furchgott & Zawadzki (1980) beschriebene endothelabhängige relaxierende Faktor (EDRF), der die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert, wurde aufgrund seiner biologischen und pharmakologischen Eigenschaften als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Furchgott *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987). NO ist ein aus nur zwei Atomen bestehendes, gasförmiges Radikal, das sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen eines der wichtigsten Signal- und Effektormoleküle darstellt. Es wird in Gegenwart von Sauerstoff und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) in einer zweistufigen Reaktion unter Bildung von L-Citrullin enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin hergestellt (Palmer *et al.*, 1988). Diese Reaktion wird von einer Gruppe von Enzymen katalysiert, die als NO-Synthasen (NOS) bezeichnet werden (Knowles & Moncada, 1994). Hierbei handelt es sich um Homodimere mit einem charakteristischen Eisen-Protoporphyrin IX-Komplex, deren katalytische Aktivität von den Kofaktoren Flavin-Adenin-Dinucleotid, Flavin-Mono-Nucleotid und Tetrahydrobiopterin abhängig ist (Marletta, 1994; Bredt & Synder, 1994).

In Säugetierzellen ließen sich bisher drei Isoformen der NOS nachweisen, die sich nicht nur aufgrund ihrer Verteilung in den verschiedenen Körperzellen, sondern auch durch ihre unterschiedliche Abhängigkeit von intrazellulärem Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und ihr Expressionsprofil unterscheiden (Förstermann *et al.*, 1991). Es handelt sich um die neuronale NOS (nNOS, Typ I), die induzierbare NOS (iNOS, Typ II) und die endotheliale NOS (eNOS, Typ III) (Nathan & Xie, 1994). Sowohl die nNOS als auch die eNOS werden konstitutiv exprimiert, während die Expression der iNOS über transkriptionelle Induktion durch Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxin) erfolgt. Die Isoform des Types I ist im zentralen und peripheren Nervensystem zu finden. Ihre Aktivierung erfolgt über intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung und die Bindung an Calmodulin (Marletta, 1994; Förstermann *et al.*, 1994). Die Isoform des Typs II wird in Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und anderen Zelltypen exprimiert (Bredt & Synder, 1994). Sie besitzt ein nicht

kovalent gebundenes Calmodulin, welches das Enzym auch bei niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel aktiviert (Cho *et al.*, 1992). Die eNOS ist hauptsächlich in den Endothelzellen lokalisiert. Sie kann über rezeptorabhängige Agonisten wie Bradykinin und Acetylcholin, oder durch die physiologisch wichtigere physikalische Stimulation (Schubspannung des strömenden Blutes, pulsatile Dehnung) aktiviert werden. Die Rezeptorstimulation führt wie auch bei der nNOS durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung und Bindung an Calmodulin zur transienten Enzymaktivierung (Busse & Mülsch, 1990; Förstermann *et al.*, 1994), während die Schubspannung durch die Aktivierung der Proteinkinase B und Phosphorylierung eines Serinrestes der NOS zu langanhaltender NO-Bildung führt (Dimmeler *et al.*, 1999).

Wichtige akute Funktionen des endothelialen NO sind u. a. die lokale Regulation des Blutgefäßtonus, die Organdurchblutung, die Endothelpermeabilität und Endothelwachstum sowie die Blutgerinnung (Moncada & Higgs, 1993). Langfristig schützt es die Gefäßwand vor atherosklerotischen Veränderungen und der sog. endothelialen Dysfunktion (Haendeler *et al.*, 1999; Zeiher *et al.*, 1995).

Das endotheliale NO besitzt eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Es reguliert den Tonus der glatten Muskulatur in vielen Blutgefäßtypen (Furchgott & Zawadzki, 1980; Busse *et al.*, 1985). Es entfaltet seine relaxierende Wirkung nach abluminaler Diffusion in die angrenzenden glatten Muskelzellen durch Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (GC) und dem damit verbundenen Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) (Rapoport & Murad, 1983). Über eine Aktivierung cGMP-abhängiger Kinasen kommt es anschließend zur Phosphorylierung und Modulation der Aktivität  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Proteine, die zu einer Abnahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen und die glattemuskuläre Kontraktion hemmen (Komas *et al.*, 1991; Lugnier & Komas, 1993).

### 1.1.2 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

Im kardiovaskulären System spielt der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg eine bedeutende Rolle. Die NO-Bindung an den Eisen-Häm-Komplex der GC führt zu einer Aktivierung des Enzyms und bewirkt binnen weniger Sekunden einen starken Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (Moncada & Higgs, 1993; Murad,

1994). Die Signalübertragung über cGMP gehört zu den wichtigsten intrazellulären Signalsystemen in Säugerzellen. Signale, die von außen zur Zelle gelangen, werden durch cGMP als *second messenger* an intrazelluläre Effektorproteine weitervermittelt. cGMP reguliert eine Reihe von Enzymen wie Proteinkinasen, zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen und spannungsabhängige Kationenkanäle (Lincoln & Cornwell, 1993; Walter, 1984 & 1989; Kaupp, 1995). Diese bewirken die spezifische Antwort der Zelle auf das äußere Signal. Die strukturellen Veränderungen der Zielproteine durch die Phosphorylierung können vielfältige Konsequenzen haben. In der Regel kommt es zu einer Änderung der Aktivität von Enzymen und Ionenpumpen.

Die cGMP-abhängige lösliche Proteinkinase vom Typ I existiert in zwei Varianten (Typ  $\alpha$  und  $\beta$ ) (Orstavik, 1997), sie moduliert die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Lucas *et al.*, 2000). Die membrangebundene Proteinkinase vom Typ II (Jarchau *et al.* 1994) wurde in Epithelzellen des Dünndarms identifiziert und daraus cloniert, sie reguliert die Homöostase an der Zellmembran (Lucas *et al.*, 2000). In der glatten Gefäßmuskulatur und in Thrombozyten aktiviert cGMP die Proteinkinase  $\text{I}\alpha$  (PKG). Die PKG hemmt durch die Phosphorylierung verschiedener Proteine die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und die Thrombozytenaggregation (Walter, 1989). In kultivierten glatten Muskelzellen aus Rattenaorten aktiviert die PKG einen kalziumabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanal ( $\text{B}_\gamma$ -Kanal) (Zhou *et al.*, 1996b, Archer *et al.*, 1994). Dies führt zur Hyperpolarisation der Muskelzellen und über eine Verminderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms zur Kontraktionshemmung (Bahnon *et al.*, 1993). Je nach Gewebe, Spezies und Zelltyp kann cGMP die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch durch die Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms, durch die Förderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum und durch die Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation beeinflussen (Lucas *et al.*, 2000).

Die Substrate der Proteinkinase I werden in verschiedene Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfaßt u.a. den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor, welcher primär an der Relaxation der glatten Muskelzellen beteiligt ist (Komalavilas & Lincoln, 1996) sowie das *Vasodilator-stimulated Phosphoprotein* (VASP) und Vimentin, welche in die Aktivierung von Plättchen und Neutrophilen involviert sind (Pryzwansky *et al.*, 1995; Aszodi *et al.*, 1999). Das VASP dient als biochemischer Monitor für die Aktivität der Proteinkinase I (Oelze *et al.*, 2000). Es ist das Substrat der PKG in Thrombozyten



sowie in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen (Draijer *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 1993).

Die zweite Gruppe beinhaltet den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der neben der Phosphorylierung zur Regulation des glattmuskulären Gefäßmuskeltonus und zur Kontraktilität des Herzens beiträgt (Jahn *et al.*, 1988; Fukao *et al.*, 1999), sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige zytosolische Phospholipase  $\text{A}_2$ , die Tyrosin Hydroxylase und die Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-Leichtketten-Phosphatase, welche die Relaxation von glatten Muskelzellen und die Vasodilatation koordiniert (Surks *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2000).

### 1.1.3 Mechanismus der Gefäßkontraktion

Die Kontraktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird durch den Anstieg und den Abfall des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels reguliert (Somlyo & Somlyo, 1994). Eine ansteigende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verursacht über die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) eine Kontraktion der glatten Muskelzellen. Die MLCK phosphoryliert die 20 kDa Leichtketten des Myosins am Serin 19 und aktiviert die kontraktile Myosin-Adenosin-Triphosphatase (ATPase) (Bennett & Waldman, 1995; Horowitz *et al.*, 1996). Eine sinkende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration inaktiviert die Myosin-Leichtketten-Kinase verbunden mit einer Dephosphorylierung der Myosin-Leichtketten durch die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) und führt zur Relaxation der glatten Muskelzellen (Somlyo & Somlyo, 1994). Im glatten Muskel wird die Sensitivität des kontraktile Apparates gegenüber Kalzium durch intrazelluläre Botenstoffe reguliert. Diese ändern die Aktivität der MLCP. Kontraktile Agonisten agieren über Signalmoleküle wie Proteinkinase C, Arachidonsäure und Rho-Kinase. Sie steigern die Empfindlichkeit der glatten Gefäßmuskelzellen gegenüber kontraktile Stimuli durch Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (Kimura *et al.*, 1996; Kitazawa *et al.*, 1991). Umgekehrt regulieren endogenes NO, Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF) und exogene Stoffe wie Nitrovasodilatoren den Blutdruck durch die Aktivierung der GC, Ansteigen des cGMP-Spiegels und Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase  $\text{I}\alpha$ , welche für die NO-medierte Vasorelaxation notwendig ist (Lohmann *et al.*, 1997; Pfeifer *et al.*, 1998). Die cGMP-medierte Relaxation der

glatten Muskeln ist charakterisiert durch eine Reduktion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Aktivierung durch die MLCP. Dies führt zu einer Abnahme der Sensitivität des kontraktile Apparates auf intrazelluläres Kalzium (Surks *et al.*, 1999).

### 1.1.4 Lösliche Guanylylcyclase (GC)

Die GC ist der bedeutendste Rezeptor für NO (Arnold *et al.*, 1977; Palacios *et al.*, 1989). Sie ist ein heterodimeres Enzym, welches aus zwei Untereinheiten besteht (Koesling *et al.*, 1988 & 1990). Je nach Spezies und Gewebetyp existieren verschiedene Subtypen der Untereinheiten. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von 73 - 80 kDa, während die  $\beta_1$ -Untereinheit ein Molekulargewicht von 70 kDa aufweist (Gerzer *et al.*, 1981a; Stone & Marletta, 1994). Die  $\alpha_2$ -Untereinheit konnte im menschlichen fötalen Gehirn nachgewiesen werden (Harteneck *et al.*, 1991). Die  $\beta_2$ -Untereinheit hingegen wird vornehmlich in der Niere und der Leber von Ratten exprimiert (Yuen *et al.*, 1990). Die isolierten Untereinheiten besitzen selbst keine katalytische Aktivität, obwohl sie alle eine katalytische Domäne aufweisen. Die cGMP-Synthese findet nur im dimeren Holoenzym statt. Die Untereinheiten sind zum Teil austauschbar, ein funktionelles Enzym kann jedoch nur durch die Kombination einer  $\alpha$ - mit einer  $\beta$ -Untereinheit gebildet werden (Harteneck *et al.*, 1990; Buecheler *et al.*, 1991; Foerster *et al.*, 1996). Die GC ist ein Hämprotein, sie besitzt eine nicht kovalent gebundene prosthetische Hämgruppe pro Heterodimer. Diese ist für den Aktivierungsmechanismus der GC von zentraler Bedeutung. Die Stimulation erfolgt durch die Bindung von NO an das zweiwertige Eisenatom des Häms und führt über eine Konformationsänderung zu einer bis zu 400-fachen Aktivitätserhöhung des Enzyms (Gerzer *et al.*, 1981b; Stone & Marletta, 1995). Hämfreie GC-Präparationen lassen sich nicht durch NO stimulieren (Ignarro *et al.*, 1986), jedoch durch Häm analoge wie Protoporphyrin IX (Ignarro, 1994). Es bildet sich ein pentakoordinierter Häm-Nitrosyl-Eisen-Komplex. Dadurch wird die im basalen Zustand vorhandene Histidin-Eisen-Bindung am Aminosäurerest Histidin-105 der  $\beta$ -Untereinheit gelöst (Zhao *et al.*, 1998) und die Konformation des Proteins verändert. In Mutanten mit der Aminosäure Phenylalanin anstelle von Histidin-105 kann keine Bindung an das Häm festgestellt werden. Auch eine Aktivierung des

Enzyms durch NO ist dann - trotz erhaltener Basalaktivität - nicht mehr möglich (Wedel *et al.*, 1994).

#### 1.1.5 Aktivoren der GC

Nitrovasodilatoren sind eine Gruppe von pharmakologischen Substanzen, die durch NO-Freisetzung eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur verursachen. Je nach chemischer Struktur variiert der Mechanismus durch welchen NO freigesetzt wird. Leicht reduzierbare Verbindungen wie Natriumnitroprussid (NNP) setzen NO nicht enzymatisch, sondern durch die Aufnahme eines Elektrons frei (Harrison & Bates, 1993). Die NO-Freisetzung aus NNP ist unter Lichtausschluß sehr gering. Die im Blut vorhandenen Reduktionsmittel wie Thiole und Ascorbat führen jedoch zu einer therapeutisch nutzbaren NO-Freisetzung (Bates *et al.*, 1991). Der Mechanismus der GC-Aktivierung durch NNP ist noch nicht genau charakterisiert. Sie läßt sich in einigen Modellen nicht durch NO-Fänger wie Methylenblau hemmen, so daß möglicherweise eine direkte Interaktion des im NNP gebundenen NO mit der Hämgruppe stattfinden kann (Bozinovski *et al.*, 1994).

Bei organischen Nitraten, die nicht so leicht zu reduzieren sind, erfolgt die Freisetzung von NO über einen bisher nicht genau bekannten enzymatischen Mechanismus (Chung & Fung, 1990). Möglicherweise sind Cytochrom P450-ähnliche Enzyme daran beteiligt (Mülsch *et al.*, 1995).

Ko *et al.* (1994) beschrieben erstmals die pharmakologische Wirkung des NO-unabhängigen Aktivators der GC 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzylindazol (YC-1). YC-1 besitzt direkte, endothelunabhängige vasodilatierende Wirkung auf Ratten- und Kaninchenarterien und sensitiviert die GC schon in niedrigen Konzentrationen gegenüber NO (Mülsch *et al.*, 1997). Die biologischen Wirkungen von YC-1 wie Hemmung der glattmuskulären Kontraktion sowie Thrombozytenadhäsion und -aggregation werden über einen Anstieg des intrazellulären cGMP vermittelt (Galle *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1995 & 1997). Es wurde gezeigt, daß YC-1 und NO die GC synergistisch aktivieren (Friebe *et al.*, 1996; Mülsch *et al.*, 1997).

Schwefelsubstituierte Sulfonylamino-carbonsäure-N-arylamide (S973448 und HMR1766) sind Aktivoren der Häm-oxidierten GC. Es handelt sich um Substanzen,

die selektiv die Eisen (III)-Form der GC aktivieren und über eine Steigerung der cGMP-Produktion zu einer Vasorelaxation führen (Jannek, Dissertation in Vorbereitung).

#### 1.1.6 Akute Desensitivierung der GC

Die GC spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration. Daher muß ein physiologischer Mechanismus existieren, der das Enzym reguliert (Kharitonov *et al.*, 1997). Verschiedene Untersuchungen haben eine verminderte GC-Aktivität gezeigt, wenn das Gewebe oder die Zellen mit NO-freisetzenden Komponenten behandelt wurden und es konnte eine höhere Sensitivität nachgewiesen werden, wenn das endogene NO gehemmt wurde (Moncada *et al.*, 1991; Papapetropoulos *et al.*, 1996). An Mäusen, die aufgrund eines Gendefektes die endotheliale NO-Synthase nicht herstellen können, wurde gezeigt, daß die Sensitivität gegenüber Nitrovasodilatoren signifikant gesteigert, der weitere Signaltransduktionsweg jedoch nicht verändert ist. Endotheliales NO wie auch chronisch verabreichtes exogenes NO führen zu einer akuten Desensitivierung der GC bei unveränderter GC-Expression (Brandes *et al.*, 2000).

Eine mögliche Ursache für die Desaktivierung des Enzyms könnten Redoxreaktionen sein. Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird die GC durch NO schnell oxidiert. Dies führt zu einer NO-Insensitivität der GC (Mülsch, 2000). Durch die Bindung von NO an das Hämeisen der GC wird die Histidin-Eisen (II)-Bindung gelöst (Stone & Marletta, 1994) und das Häm in die Eisen (III)-Form überführt. In diesem Oxidationszustand kann es NO nicht binden. NO wird dann zu einem deutlich schwächerem Stimulator der cGMP-Produktion als bei der Eisen (II)-Form des Enzyms (Craven & DeRubertis, 1978). Inhibitoren der NO-abhängigen GC-Aktivität wie 1H-[1,2,4]-Oxadiazolo[4,3,-a]-Qinoxalin-1-One (ODQ) und Methylenblau führen zu einer Konversion des Eisen (II) der Hämgruppe zur Eisen (III)-Form (Dierks & Burstyn, 1998; Schrammel *et al.*, 1996) und zur Abnahme der NO-Sensitivität. Die GC in Rinderkoronarien unterliegt einer spontanen sauerstoffabhängigen Desensitivierung. Dies konnte durch den Einsatz des Flavoprotein-Hemmers Diphenyliodonium nachgewiesen werden (Iesaki *et al.*, 1999).

Die hämoxidierte GC kann durch starke Reduktionsmittel und Ascorbat reduziert und wieder für NO sensitiviert werden (Olesen *et al.*, 1998; Mülsch, 2000).

Es ist daher anzunehmen, daß die NO-Sensitivität der GC *in vivo* durch den Oxidationszustand des Hämeisens reguliert wird.

Es konnte auch gezeigt werden, daß der Redoxstatus der Proteinthiole eine wichtige Rolle in der Enzymregulation spielt (Papapetropoulos *et al.*, 1996; Dierks & Burstyn, 1998). Die Aktivierung der GC durch NO führt zu einer Disulfid-Bildung, die das Enzym reversibel inaktiviert (Brandwein *et al.*, 1981). Baltrons & Garcia konnten 1999 eine aktive Regulation des Enzyms nachweisen, indem sie zeigten, daß die Behandlung mit Lipopolysacchariden die GC-Aktivität und die Proteinlevel der  $\beta_1$ -Untereinheit in Astrogliazellen herabsetzt. Nach früheren Untersuchungen von Zwiller *et al.*, 1985 katalysiert die Proteinkinase C die Phosphorylierung der GC *in vitro* und führt dadurch zu einem Anstieg der GC-Aktivität. Inwieweit andere Proteinkinasen die GC-Aktivität und NO-Sensitivität beeinflussen, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

## 1.2 GC-Regulation in Tiermodellen mit vaskulären Störungen

### 1.2.1 Nitrattoleranz

Die vasodilatierende Wirkung von NO ist bei Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus deutlich herabgesetzt. Dies kann nicht auf eine verminderte NO-Bildung zurückgeführt werden, da die Expression der eNOS bei diesen Erkrankungen eher kompensatorisch gesteigert als abgeschwächt ist (Münzel *et al.*, 1997). In verschiedenen Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, daß die chronische *in vivo* Behandlung mit Nitroglycerol (NTG) zu einer Toleranzentwicklung gegenüber organischen Nitraten sowie zu einer Kreuztoleranz gegenüber anderen Nitrovasodilatoren und endogenem NO führt (Molina *et al.*, 1987).

NTG induziert die Vasorelaxation über die Freisetzung des vasoaktiven Metaboliten NO (Feelisch & Kelm, 1991). Obwohl die akute Gabe von NTG zu einer starken Vasodilatation führt, zeigt sich bei der chronischen Applikation von NTG ein schneller Wirkungsverlust in Form der Toleranzentwicklung (Münzel *et al.*, 1995). Die

Ursachen sind multifaktoriell. Sie umfassen neurohumorale Faktoren, wie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems sowie ansteigende Katecholamin- und Vasopressinspiegel im Plasma (Münzel & Harrison, 1997). Ebenso konnte die chronische Desensitivierung der GC (Molina *et al.*, 1987) und eine verminderte Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (Soff *et al.*, 1997) nachgewiesen werden. Die chronische Exposition von Zellen und Geweben *in vitro* mit hohen NO-Konzentrationen führt zu einer chronischen Desensitivierung der GC gegenüber Nitrovasodilatoren. Dieses Phänomen wird als *in vitro* Toleranz bezeichnet (Waldman *et al.*, 1986; Mülsch *et al.*, 1988) und ist möglicherweise auch für die *in vivo* Toleranz verantwortlich.

Im Tiermodell konnte an nitrattoleranten Kaninchen gezeigt werden (Münzel & Harrison, 1997; Münzel *et al.*, 1995), daß die Bioverfügbarkeit des NO durch erhöhte endotheliale und glattmuskuläre Bildung von Superoxidanionradikalen eingeschränkt ist. Superoxid ( $O_2^-$ ) ist ein reaktives und toxisches Sauerstoffradikal, das physiologisch in niedrigen Konzentrationen durch 1-Elektronenübertragung auf Sauerstoffmoleküle gebildet wird, wobei die Elektronen von verschiedenen Donoren (NAD(P)H, Xanthin, Hypoxanthin) stammen.  $O_2^-$  dismutiert spontan zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Dieser Vorgang wird durch die Superoxiddismutase (SOD) beschleunigt (Fridovich, 1978). Die Reaktion von  $O_2^-$  mit NO ist dreimal schneller als die Dismutation durch SOD (Huie & Padjama, 1993).

Die sehr schnelle Reaktion mit  $O_2^-$  zum ebenfalls kurzlebigen Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) ist ein wichtiger Mechanismus zur Begrenzung der Bioverfügbarkeit des NO (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Freeman *et al.*, 1995). Peroxynitrit wandelt sich spontan in das biologisch inaktive anorganische Nitrat ( $NO_3^-$ ) um und wird ausgeschieden. Es kann Tyrosinreste von Proteinen nitrieren und dadurch mit Tyrosinkinase- und G-Protein-abhängigen Signaltransduktionswegen interferieren (Lander *et al.*, 1993). Auch hemmt Peroxynitrit die Prostazyklinbildung (Zou *et al.*, 1999). Eine erhöhte Nitrotyrosinbildung läßt sich bei Atherosklerose (Beckman *et al.*, 1994) und Nitrattoleranz (Skatchkov *et al.*, 1997) nachweisen.

In nitrattoleranten Kaninchen wird  $O_2^-$  u.a. durch eine endotheliale NAD(P)H-Oxidase generiert, die der NAD(P)H-Oxidase in neutrophilen Granulozyten ähnelt (Rajagopalan *et al.*, 1996). In Bluthochdruck- und Postinfarktmodellen wurde eine NAD(P)H-Oxidase-Aktivität im glatten Gefäßmuskel für die endotheliale Dysfunktion verantwortlich gemacht (Bauersachs *et al.*, 1998).

Neuere Untersuchungen von Cosentino *et al.* (1998) zeigen, daß auch die eNOS selbst  $O_2^-$  bildet, wenn der Kofaktor Tetrahydrobiopterin oder das Substrat L-Arginin fehlen.

### 1.2.2 Bluthochdruck in Dahl-S-Ratten

Durch Bluthochdruck kommt es zu morphologischen und funktionellen Veränderungen in den Blutgefäßen. Das Renin-Angiotensin-System, Katecholamine und salzreiche Nahrung tragen zur Entstehung von Gefäßschädigungen beim Bluthochdruck bei (Hüttner & Gabbiani, 1983; Laragh *et al.*, 1972; Limas *et al.*, 1980). Dahl entwickelte zwei Rattenstämme mit verschiedenen Tendenzen zum Bluthochdruck. Der salzsensitive Stamm (DS) entwickelt einen Bluthochdruck, wenn er mit salzreicher Diät gefüttert wird und der salzresistente Stamm (DR) entwickelt keine Hypertonie auf die Diät (Dahl *et al.*, 1962). Das Modell weist Ähnlichkeiten zur Hypertonie des Menschen auf, bei welchem Natrium zur Entstehung des hohen Blutdruckes beiträgt (Nicholls, 1984).

Die meisten Hypertoniemodelle zeigen, daß ein erhöhter Blutdruck zu einer Abnahme der endothelabhängigen Relaxation führt (Lüscher & Vanhoutte, 1991). Im Modell der Salz-induzierten Hypertonie wird vermutlich weniger NO gebildet (Lüscher *et al.*, 1987a & b).

In der genetisch salzsensitiven Dahlratte mit Hypertonie ist der Einfluß des endothelialen NO auf die arteriellen Widerstandsgefäße in der Muskulatur herabgesetzt (Boegehold, 1992).

Andere Untersuchungen gehen davon aus, daß der Bluthochdruck mit einer gesteigerten Superoxidation- und Wasserstoffperoxidproduktion assoziiert ist. Diese wird durch zirkulierende Leukozyten und durch einen verminderten NO- sowie Antioxidanspiegel ausgelöst (Prabha *et al.*, 1990; Kumar & Das, 1993). Dahl-S-Ratten haben mehr Superoxid produzierende Leukozyten im Blut als die normotensiven Dahl-R-Ratten (Shen *et al.*, 1995). Auch Swei *et al.*, 1997, konnten feststellen, daß hypertensive DS eine höhere Wasserstoffperoxidkonzentration im Plasma aufweisen als normotensive Kontrolltiere.

Der erhöhte Blutdruck als Antwort auf die salzreiche Diät bei DS entsteht aufgrund des ansteigenden peripheren und renalen Gefäßwiderstandes (Simchon *et al.*, 1989

& 1991). Die Ursache für die defekte Gefäßantwort nach Gabe der salzreichen Diät kann eine veränderte Produktion oder Wirkungsweise von vasodilatierenden Faktoren sein. In Betracht kommen Veränderungen des Atrialen Natriuretischen Faktors (Simchon *et al.*, 1992; Nagase *et al.*, 1997), des Arachidonsäure Metabolismus (Roman *et al.*, 1997), des Kallikrein-Kinin-Systems (Wang *et al.*, 1996) und des L-Arginin / NO - Signaltransduktionswegs. Der veränderte NO-Metabolismus kann eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Hypertonie von DS spielen. Chen & Sanders (1991 & 1993) zeigten, daß die Salz-induzierte Hypertonie und Nephrosklerose durch die Gabe der NO-Vorstufe L-Arginin verhindert werden kann. He *et al.* (1997) konnten nachweisen, daß die Applikation von L-Arginin die abnorme renale Hämodynamik in DS normalisiert. In DS ist die renale Ausscheidung von NO-Metaboliten und cGMP reduziert, dies kann ebenfalls durch L-Arginin-Gabe normalisiert werden (Chen & Sanders, 1993). Die veränderte NO-Bildung und -Wirkung ist außerdem erkennbar an einer Abnahme der ACh-, Thrombin-, ADP-induzierten endothelabhängigen Relaxation in Aortenringen von DS (Lüscher *et al.*, 1987 a & b).

DS zeigen vor dem Beginn der Hypertonie und dem Ansteigen des gesamten peripheren Gefäßwiderstandes einen gesteigerten renalen Gefäßwiderstand als Antwort auf salzreiche Diät (Simchon *et al.*, 1989 & 1991). Die Veränderungen in der Antwort der renalen Gefäße sind assoziiert mit einer verminderten NO-Produktion (Simchon *et al.*, 1992 & 1996) und einer verminderten renalen NOS Aktivität (Ikeda *et al.*, 1995).

Simchon *et al.* (1996) zeigten, daß die renalen Gefäße von DS hyperreaktiv auf Vasokonstriktoren und hyporeaktiv auf Vasodilatoren reagieren. Diese Studie unterstützt die Hypothese, daß die veränderte cGMP-Produktion eine primäre Rolle spielen könnte bei dem Unvermögen der Nierengefäße von DS auf salzreiche Diät zu relaxieren. Solche Veränderung können zur Salzretention und Entwicklung der Hypertonie beitragen. DS können cGMP nicht in ausreichender Menge herstellen. Ob die veränderte cGMP-Exkretion das Ergebnis einer verminderten cGMP-Produktion oder NO-Produktion ist, ist noch unklar.

Durch Nierentransplantationen zwischen DS und DR wurde nachgewiesen, daß der Genotyp der Nieren eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Salz-induzierten Bluthochdruckes spielt (Churchill *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1990). Es wurde gezeigt, daß die Expression der  $\beta$ -Einheit der GC in Nieren von DS verändert ist. Die  $\beta_1$ -

Untereinheit des Enzyms ist vermindert, die  $\beta_2$ -Untereinheit ist verstärkt exprimiert. Die  $\beta_2/\alpha_1$ -Untereinheiten bilden ein Heterodimer, welches eine verminderte NO-Sensitivität aufweist und die NO-stimulierte cGMP Akkumulation in den Zellen hemmt (Gupta *et al.*, 1997). Azam *et al.* (1998) konnten den Zusammenhang zwischen NO-Signalweg, Blutdruck und Salzsensitivität aufzeigen. Die verminderte NO-Sensitivität und NO-stimulierte cGMP-Bildung lassen darauf schließen, daß eine verminderte GC-Aktivität zur Salzsensitivität beiträgt.

### 1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war es, den Mechanismus der akuten und chronischen Desensitivierung der GC gegenüber NO aufzuklären. Dazu sollte zunächst die akute Desensitivierung der glattmuskulären GC bei intakter Gefäßfunktion durch die Messung der isometrischen Kontraktion von Gefäßringen in Organbadversuchen untersucht werden. Hierbei sollte die NO-Sensitivität und der Häm-Redox-Status der GC analysiert werden. Das Kontraktions- und Relaxationsverhalten von isolierten Aorten, die aus gesunden Ratten präpariert wurden, diente als Maß für die Aktivität der GC. Um die Signaltransduktionsmechanismen der GC-Desensitivierung näher zu charakterisieren, sollte die Wirkung von endogenem und exogenem NO sowie dem Atrialen Natriuretischen Faktor auf die GC untersucht werden.

Mit Hilfe neu entwickelter Aktivatoren der GC sollte die akute und die chronische Aktivierung der Häm-oxidierten GC analysiert und der Einfluß der NO-Sensitivität, des Häm-Redox-Status und der Proteinexpression auf die Regulation der GC ermittelt werden. Hierzu wurden neu entwickelte schwefelsubstituierte Sulfonylamino-carbonsäure-N-arylamide (S973448 und HMR1766) verwendet, die selektiv die Eisen (III)-Form der GC aktivieren und aus diesem Grund geeignet sind, mögliche Verschiebungen des Redoxgleichgewichtes der GC nachzuweisen.

Mit Hilfe von isometrischen Kontraktionsmessungen an isolierten Gefäßringen im Organbad sollte außerdem untersucht werden, ob diese Pharmaka - ähnlich wie die organischen Nitrate - bei längerer Applikation zu einer Toleranzentwicklung und Wirkungsabschwächung führen und ob sie geeignet wären, die organischen Nitrate bei der Behandlung von Krankheitsbildern mit endothelialer Dysfunktion, wie

Atherosklerose und Bluthochdruck, zu ersetzen. Hierzu sollten Ratten über einen Zeitraum von drei Tagen bzw. vier Wochen mit diesen Substanzen behandelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Aortensegmente aus Ratten verwendet werden, die eine experimentell induzierte Störung der Gefäßfunktion aufweisen. Es wurden das Tiermodell der nitratoleranten Ratte und des Salz-induzierten Bluthochdrucks der Dahl-S-Ratte gewählt, um zu untersuchen, ob bei diesen vaskulären Störungen eine chronische GC-Desensitivierung vorliegt. Um zu ermitteln, auf welcher Ebene die GC-Funktion gestört ist, sollten die NO-Sensitivität, der Häm-Redox-Status und die Proteinexpression analysiert werden. Hierbei sollten ebenfalls die neu entwickelten Aktivatoren der Häm-oxidierten GC eingesetzt werden.

## II Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Substanzen

Die Bezugsquellen für die Substanzen waren:

Acetylcholin, Atrialer Natriuretischer Faktor, Benzamidin, BSA, Diclofenac, EDTA, DTT, Leupletin, TEMED, N $\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methylester, N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin, Phenylephrin, Natriumnitroprussid, Sucrose von Sigma (Deisenhofen).

Calciumchlorid-Dihydrat, Ca-EDTA, Glucose, Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumnitrit von Merck (Darmstadt).

Bromphenolblau, Glycin, HEPES, Ponceau S-Lösung, Tween 20 von Serva (Heidelberg).

Bradford-Lösung, Acrylamid von Roth (Karlsruhe).

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Natriumchlorid, TEMED von AppliChem (Darmstadt).

Cremophor, HMR1766, Hydroxyethylcellulose 0,5 %, Polyethylenglykol 400, S973448, YC-1 von Aventis (Frankfurt/M.).

Ketamin (Exalgon 1000<sup>®</sup>) von Rhône Merieux (Laupheim).

Xylazin (Rompun TS<sup>®</sup>), polyklonaler  $\alpha_1$  (GC)-Antikörper (IgG Kaninchen) von Bayer (Leverkusen).

polyklonaler  $\beta_1$  (GC)-Antikörper (IgG Kaninchen) von Dr. P. Yuen (Memphis, USA).

SDS, anti-Kaninchen-IgG (IgG Ziege) von Calbiochem (Bad Soden).

polyklonaler Peptid-Antikörper (IgY Huhn) gegen  $\alpha_1/\beta_1$ -Untereinheiten der GC,

polyklonaler Antikörper anti-Huhn-IgY (IgG Kaninchen) von BioGenes (Berlin).

Dimethylsulfoxid von Fluka (Neu-Ulm).

AMPS von BioRad (München).

Pferdeserum (Seromed<sup>®</sup>) von Biochrom (Berlin).

Heparin-Natrium (Liquemin N 25.000<sup>®</sup>) von Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen).

Nitroglycerol 2,25 % in Glucose Monohydrat von Pohl-Boskamp (Hohenlockstedt).

Nitroglycerol-Lösung 9,6 % von Unikem (Kopenhagen, Dänemark).

Tris-Base von United States Biochemical (Cleveland, USA).

## 2.1.2 Zusammensetzung der Lösungen

2.1.2.1 Die Präparation der Aorten wurde in Hepes-Tyrode-Pufferlösung durchgeführt. Diese wies folgende Zusammensetzung auf:

NaCl	132,0	mM
Hepes	9,4	mM
Glucose	5,0	mM
KCl	4,0	mM
MgCl <sub>2</sub>	0,49	mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0	mM

2.1.2.2 Für die Organbadversuche wurde eine Krebs-Henseleit-Pufferlösung verwendet. Sie war wie folgt zusammengesetzt:

NaCl	119,0	mM
KCl	4,7	mM
CaCl <sub>2</sub>	1,6	mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2	mM
NaHCO <sub>3</sub>	21,0	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	mM
Ca-EDTA	0,026	mM
Glucose	12,0	mM
Diclofenac	0,02	mM

Für die Vorkontraktionen der Aorten im Organbad wurde eine kaliumreiche Krebs-Henseleit-Pufferlösung angesetzt. Diese bestand je nach Versuchsansatz aus 40,0 mM KCl und 45,0 mM NaCl oder 80,0 mM KCl und 45,0 mM NaCl und wies ansonsten die gleiche Zusammensetzung wie die bereits beschriebene Krebs-Henseleit-Pufferlösung auf.

## 2.1.2.3 Lösungen für Proteinaufarbeitung, SDS-Page und Immunoblot

a) Homogenisationspuffer

Tris/HCl pH 7	20	mM
Sucrose	250	mM
EDTA	0,2	mM
Leupeptin	10	µg/ml
Benzamidin	2	mM
DTT	10	mM

b) Trenngel 8 %

2,7 ml Acrylamidlösung	
(30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylen-bisacrylamid)	
3,7 ml Tris 1 M (pH 8,8)	
3,4 ml Aqua bidest	
100 µl SDS	10 %
80 µl AMPS	10 %
10 µl TEMED	

c) Sammelgel 4 %

390 µl Acrylamidlösung	
375 µl Tris 1 M (pH 6,8)	
2,2 ml Aqua bidest	
30 µl SDS	10 %
20 µl AMPS	10 %
4 µl TEMED	

d) Elektrophoresepuffer

Tris	250	mM
Glycin	192	mM
SDS	0,1	%

e) Probenpuffer (modifiziert nach Laemmli, 1970)

SDS	2 %
Glycin	10 %
Bromphenolblau	0,01 %
Tris/HCl (pH 6,8)	62,5 mM
DTT	25 mM

f) Transferpuffer

Glycin	160 mM
Tris	25 mM
Methanol	20 %

g) Waschpuffer I

Tween 20	0,3 %
NaCl	20 mM
Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM

h) Blockingpuffer

Pferdeserum	10 %
BSA	3 %
Tween 20	0,05 %
NaCl	20 mM
Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM

i) Waschpuffer II

NaCl	20 mM
Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM

## 2.1.3 Lösungsvorschriften

- 1.) YC-1 (3-(5-Hydroxymethyl-2-Furyl)-1-Benzylindazol)  
MG = 304,35 g/mol

Für die Organbadversuche wurde YC-1 in dem Lösungsmittel Glycopherol/Cremophor RH 40 75:25 (1:4 in Aqua bidest) nach folgender Vorschrift gelöst:

- 1 mg YC-1 wurde in 100 µl Glycopherol/Cremophor RH 40 75:25 bei 40° C aufgelöst, in 20 µl Aliquots überführt und bei - 20° C aufbewahrt.
- Am Versuchstag wurde eine Stammlösung von 8,3 mM hergestellt, indem jeweils ein Aliquot mit 60 µl Aqua bidest verdünnt wurde.
- Für die Organbadkonzentrationen 0,1 µM und 1 µM wurde die Stammlösung entsprechend 1:10 mit Aqua bidest verdünnt. Für Organbadkonzentrationen ab 10 µM wurde die Stammlösung unverdünnt verwendet.

- 2.) Schwefelsubstituierte Sulfonylamino-carbonsäure-N-arylamide

- a) S973448 MG = 612,15 g/mol  
b) HMR1766 MG = 598,50 g/mol

Für die Organbadversuche wurden diese Substanzen in dem Lösungsmittel DMSO nach folgender Vorschrift gelöst:

- Es wurde zunächst eine 10 mM Stammlösung mit DMSO hergestellt.
- Anschließend wurde die Stammlösung mit 37° C warmer Krebs-Henseleit-Pufferlösung auf 100 µM verdünnt.
- Für die Organbadkonzentrationen von 0,1 µM und 1 µM wurde die verdünnte Lösung und für Konzentrationen ab 10 µM die Stammlösung verwendet.

Alle anderen verwendeten Substanzen wurden in Aqua bidest gelöst.



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierspezies und Haltungsbedingungen

Es wurden männliche und weibliche Wistar Ratten (Harlan Winkelmann, Borken), männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) sowie männliche Dahl-S-Ratten (Möllegaard, Ry, Dänemark) verwendet. Die Tiere wurden auf staubfreiem Holzgranulat (Altrominfaser, Altromin Tier-Labor-Service, Lage) in 550x330x200 mm großen Makrolon-Käfigen (Erich Becker, Castrop-Rauxel) gehalten. Die Fütterung erfolgte mit der Altromin-Standard-Diät Nr. 1320 (Altromin Tier-Labor-Service, 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.

### 2.2.2 Tiermodelle

#### 2.2.2.1 Behandlung mit der Substanz S973448 für 3 Tage

Männliche Sprague-Dawley-Ratten, ca. 350 - 400 g Körpergewicht (KG), wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit der Substanz S973448 oder dem Lösungsmittel Polyethylenglykol 400 (PEG 400) behandelt. Die Substanz wurde dreimal täglich in einer Dosierung von 10 mg/kg KG subkutan injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich das Lösungsmittel, was einer subkutan injizierten Menge von 1 ml/kg KG entsprach. Am 4. Tag wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg KG Ketamin (Exalgon 1000<sup>®</sup>) und 5 mg/kg KG Xylazin (Rompun TS<sup>®</sup>) anästhesiert. Durch Punktion der *A. abdominalis* wurden die Ratten entblutet. Danach wurde die *A. thoracalis* unter Vermeidung von Zug und Druck entnommen.

#### 2.2.2.2 Behandlung mit der Substanz HMR1766 für 3 Tage

Männliche Sprague-Dawley-Ratten, ca. 350 - 400 g KG, erhielten drei Tage lang zweimal täglich 10 mg/kg KG HMR1766 bzw. das Lösungsmittel PEG 400 1 ml/kg KG subkutan injiziert. Am 4. Tag wurden die Tiere wie unter Kap. 2.2.2.1 beschrieben anästhesiert und durch Punktion der *A. abdominalis* entblutet. Die *A. thoracalis* wurde entnommen und das gewonnene Blut für die Bestimmung der Plasmaspiegelkonzentration von HMR1766 verwendet (Fa. Aventis, Frankfurt/M.).

#### 2.2.2.3 Behandlung mit der Substanz HMR1766 für 4 Wochen

Männlichen Sprague-Dawley-Ratten, ca. 350 - 400 g KG, wurde über einen Zeitraum von vier Wochen einmal täglich 30 mg/kg KG HMR1766 (Charge HT1) bzw. 2 ml/kg KG der Trägersubstanz Hydroxyethylcellulose 0,5 % oral über eine Schlundsonde eingegeben. Zwei Stunden nach der letzten Applikation wurden die Tiere wie bereits beschrieben narkotisiert, entblutet und das gewonnene Blut für die Bestimmung der Plasmaspiegelkonzentration von HMR1766 verwendet (Fa. Aventis, Frankfurt/M.). Die *A. thoracalis* wurde für die nachfolgenden isometrischen Relaxationsmessungen entnommen.

#### 2.2.2.4 Implantation der osmotischen Minipumpe

Zur Erzielung einer Nitrattoleranz *in vivo* wurden bei männlichen Wistar Ratten, ca. 300 g Körpergewicht (KG), osmotische Minipumpen (Alzet 2ML1, Charles River, Sulzfeld) implantiert. Die Minipumpen wurden mit 2 ml Nitroglycerol-Lösung 9,6 % in Ethanol (Unikem A/S, Kopenhagen, Dänemark) oder nur mit dem Lösungsmittel Ethanol 98 % gefüllt. Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg KG Ketamin (Exalgon 1000<sup>®</sup>) und 5 mg/kg KG Xylazin (Rompun TS<sup>®</sup>) anästhesiert. Die Minipumpe wurde nach Rasur und Desinfektion der Haut zwischen den Schulterblättern in einer subkutanen Tasche implantiert. Die Freisetzung der Substanzen aus der Minipumpe erfolgte in einer kontinuierlichen Pumprate von 10 µl/h. Dies entsprach einer Freisetzungsrate von 1 mg/h Nitroglycerol (NTG). Am

3. Tag wurden die Ratten wie beschrieben narkotisiert. Nach Injektion von 1.000 IE Heparin (Liquemin N 25.000<sup>®</sup>) in die *V. cava caudalis* wurden die Tiere mittels Durchtrennung der *A. abdominalis* entblutet. Danach wurde die *A. thoracalis* vorsichtig entnommen.

#### 2.2.2.5 Fütterung mit salzreicher Diät

Männliche Dahl-S-Ratten wurden im Alter von 3 Wochen für 10 Wochen mit einer salzreichen Diät (Altromin Standard Diät Nr. 1324 plus 4 % NaCl, Altromin Tier-Labor-Service, Lage) gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt für denselben Zeitraum die gleiche Diät ohne NaCl-Zusatz. Im Alter von 13 Wochen (Körpergewicht ca. 300 g) wurden die Tiere wie bereits beschrieben anästhesiert. Die *A. thoracalis* wurde nach der intravenösen Injektion von 1.000 IE Heparin in die *V. cava caudalis* und dem Entbluten der Tiere entnommen.

#### 2.2.3 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-Pufferlösung gefüllten, eisgekühlten Petrischale von umgebenden Fett- und Bindegewebe gelöst. Das Gefäßlumen wurde mit Hepes-Tyrode-Pufferlösung durchspült und 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 (Eigenbau) sowie einem Kraftaufnehmer (Isometrischer Transducer GM2, FMI GmbH, Seeheim) eingespannt. Das mit Krebs-Henseleit-Pufferlösung gefüllte Organbad wurde 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 (Eigenbau) verstärkt und mit einem Vier-Kanal-Schreiber (Linseis L 2200, Fa. Linseis GmbH, Selb) bei einer Papiergeschwindigkeit von 10 - 50 cm/h aufgezeichnet. Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung mit Eichgewichten (Eigenbau).

#### 2.2.4 Durchführung der isometrischen Kontraktionsmessungen im Organbad

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

##### 2.2.4.1 Methode A

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-Pufferlösung (40 mM K<sup>+</sup>) getestet. Hierfür wurde die Organbadlösung vollständig ausgetauscht. Alle Versuche fanden in Gegenwart von Diclofenac (0,02 mM in der Krebs-Henseleit-Pufferlösung) statt, um die Prostaglandinsynthese zu hemmen. Die Überprüfung der Endothelintegrität erfolgte im Anschluß an die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktion mit Hilfe einer Acetylcholin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Konzentrationen: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM). Durch die Kontraktion mit kaliumreicher Krebs-Henseleit-Pufferlösung wurde gewährleistet, daß nur die NO-medierte Vasorelaxation selektiv erfaßt wurde, nicht jedoch die durch den endothelialen hyperpolarisierenden Faktor-induzierte Kontraktionshemmung. Nach anschließender Waschung der Gefäße mit Krebs-Henseleit-Pufferlösung und einer Ruhephase auf dem Ausgangsniveau für 10 - 20 min, erfolgte die Kontraktion mit dem  $\alpha$ -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (300 nM). Nach dem Erreichen eines stabilen Tonus erfolgten durch die Zugabe der entsprechenden Dilatoren kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) bis zur maximal erreichbaren Gefäßrelaxation. Wurden verschiedene Dilatoren verwendet, erfolgte nach mehrmaligem Waschen der Gefäße und einer

Ruhephase von 10 - 15 min eine erneute Kontraktion mit Phenylephrin (300 nM) mit nachfolgender KWK für die zu untersuchende Substanz. Die Zugabe der nächst höheren Konzentration erfolgte sofort nach der maximal erreichbaren Relaxation der vorherigen Konzentration. Da sich jedoch bei den Substanzen S973448, HMR1766 und YC-1 nach der Zugabe der einzelnen Konzentrationen kein stabiles Relaxationsniveau einstellte, wurden diese Wirkstoffe, um vergleichbare Kurven zu erhalten, im Abstand von 20 min hinzugegeben und die maximale Relaxation der Gefäße nach diesem Zeitraum ermittelt.

#### 2.2.4.2 Methode B

Nach dem Einbringen in das Organbad wurden die Gefäßsegmente in einer Zeitspanne von 40 - 50 min schrittweise auf 1 g vorgespannt. Die Kontraktilität der Gefäße wurde mit 80 mM kaliumreicher Krebs-Henseleit-Pufferlösung überprüft. Auch hier fanden die Versuche in Gegenwart von 0,02 mM Diclofenac statt. Die Vorkontraktionen wurden dreimal durchgeführt, dazwischen wurden die Gefäße ausgewaschen und für 15 min im Ruheniveau belassen. Die Überprüfung des Endothels erfolgte wie unter Kap. 2.2.4.1 beschrieben. Anschließend wurde die endotheliale NO-Synthase durch die Gabe von N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin (300 µM oder 30 µM jeweils für 30 min) ausgeschaltet, um eine durch endotheliales NO hervorgerufene Relaxation zu verhindern. Die nachfolgenden Kontraktionen wurden durch die Zugabe einer entsprechenden Konzentration des  $\alpha$ -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin ausgelöst, so daß alle Gefäßstücke einer Organbadserie ein vergleichbares Kontraktionsniveau von ca. 80 % der letzten K<sup>+</sup>-induzierten Vorkontraktion aufwiesen. Nach dem Erreichen eines stabilen Tonus erfolgten kumulative KWK wie unter Kap. 2.2.4.1 beschrieben.

#### 2.2.5 Isolierung der nativen Proteine

Die Rattenaorten wurden unter flüssigem Stickstoff mit einem Pistill fein gemörsert, in ein gekühltes Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Je nach Probengewicht wurde die fünffache Menge (g/Vol) des Homogenisationspuffers hinzugefügt und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Die aufgeschlossenen Proben wurden bei 10000 g für 10 min zentrifugiert und aus dem Überstand wurde der Gesamtproteingehalt nach Bradford (1976) ermittelt. Die Aufbewahrung der Proteinproben erfolgte bei - 70° C.

#### 2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zur Proteinauftrennung

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

Für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970) wurde die BIORAD Mini Protein II Apparatur (BioRad, München) verwendet. Zur Auftrennung der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten der GC wurden SDS-Polyacrylamidgele mit einem 4 %-igem Sammelgel und einem 8 %-igem Trenngel verwendet. Die Trenngellösung (ca. 5 ml/Gel) wurde in die Plattenapparatur (0,75 mm, 6 x 9,5 cm) gegossen. Für den anschließenden Gellauf wurde der Elektrophoresepuffer verwendet. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 - 10 min bei 96° C aufgeköcht, um eine komplette Denaturierung der Proteine zu erreichen. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (30 sec, 10000 g) und auf das Proteingel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 10 mA (Sammelgel) bzw. 20 mA (Trenngel).

### 2.2.7 Immunoblot (Western Blot)

Zur weiteren Analyse der Proteine nach SDS-Page wurden diese auf eine Membran (Nitrozellulose, Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Dadurch wurden die Proteine immobilisiert und besser zugänglich für einen immunologischen Nachweis, da sie nur auf die Oberfläche der Membran geblottet wurden.

Zum elektrophoretischen Transfer der Proteine wurde eine Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Apparatur (BioRad, München) verwendet. Die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurden in Transferpuffer auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Der Proteintransfer (60 min, 4° C) erfolgte bei einer Spannung von 100 - 150 Volt bei einer maximalen Stromstärke von 250 mA.

Anschließend wurden die Nitrozelluloseblots zweimal mit Wasser gewaschen und 1 min in 0,2 % Ponceau S-Lösung angefärbt. Hierdurch konnte der Erfolg des Transfers und die gleichmäßige Beladung des Gels überprüft werden.

Zum Entfärben der Proteinbanden wurden die Blots in Waschpuffer I geschwenkt und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 40 min mit Blockingpuffer behandelt. Bei 4° C erfolgte die 12-stündige Inkubation des Blots mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper (AK) (IgY-AK aus Huhn Kap. 3.1.4 bzw. IgG-AK aus Kaninchen Kap. 3.2.1.6 / Kap. 3.2.3.1) gegen die  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten der GC, um eine Antigen-AK-Bindung zu erhalten. Hierbei waren die AK im Blockingpuffer 1:500 verdünnt. Um den ungebundenen AK zu entfernen, wurden die Blots fünfmal mit Waschpuffer I (je 2 min) und zweimal mit Waschpuffer II (je 20 min) gewaschen und erneut 20 min mit Blockingpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation (1 h, Raumtemperatur) mit einem sekundären Peroxidase-konjugierten polyklonalen AK (IgG-AK aus Kaninchen, 1:10000 im Blockingpuffer, Kap. 3.1.4), der die IgY-AK des Huhnes erkennt bzw. anti-Kaninchen-IgG-AK aus Ziege Kap. 3.2.1.6 / Kap. 3.2.3.1). Der ungebundene AK wurde wie der 1. AK durch Waschen entfernt. Die Detektion des sekundären AK-Enzym Konjugats erfolgte mit dem ECL<sup>®</sup>-System (Amersham-Buchler), das über die von der Meerrettich-Peroxidase katalysierte Spaltung ein fluoreszierendes Signal erzeugt. Nach dem Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji RX-Film, Du Pont) konnten die Proteinbanden als Schwärzung des Films erkannt werden. Zur semi-quantitativen Bestimmung der relativen Proteinmengen wurden die Filme densitometrisch ausgewertet (Scion Image Beta II).

### 2.2.8 Statistische Auswertung

Die deskriptive Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die agonisteninduzierte Kontraktion und Relaxation der Gefäße im Organbad wurde als Veränderung der isometrischen Kontraktion [in Gramm] registriert und die Relaxation prozentual bezogen auf die Vorkontraktion angegeben (Relaxation [%]). Soweit angegeben, wurden die molaren Konzentrationen der Substanzen, die die halbmaximale Kontraktion bzw. Relaxation ( $EC_{50}$ ) erzeugten, für jede Konzentrations-Wirkungs-Kurve errechnet. Die Kurvenanpassung der graphischen Darstellung erfolgte mit dem Programm Slide Write Plus<sup>™</sup> V2.0 (Advanced Graphics Software Inc., Carlsbad, USA). Um die statistische Signifikanz von Unterschieden zu prüfen, wurde der Student-t-test für gepaarte Daten angewandt (Graph Pad InStat tm, Graph Pad Software, San Diego, USA). Nachfolgend wurde eine Bonferroni-Korrektur für den multiplen Vergleich durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

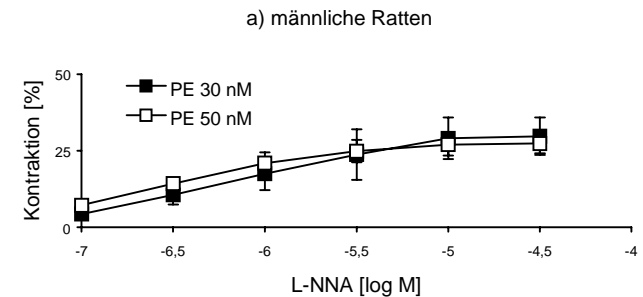
### III Ergebnisse

#### 3.1 GC-Regulation bei intakter Gefäßfunktion

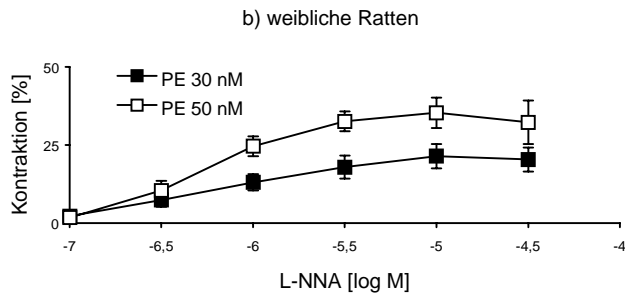
##### 3.1.1 Akute Desensitivierung der glattmuskulären GC gegenüber NO durch das Endothel

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, zu klären, durch welchen Mechanismus das Endothel die akute Desensitivierung der löslichen Guanylylcyclase (GC) gegenüber NO in den Rattenaorten, die durch exogenes NO relaxiert wurden, bewirkt. Es wurde untersucht, ob die GC der glatten Gefäßmuskulatur beeinflusst wird und - falls dies zutrifft - durch welchen Mechanismus ihre Empfindlichkeit gegenüber NO geändert wird. Weiterhin wurde ermittelt, ob die GC direkt durch NO desensitiviert wird, oder ob die Desensitivierung die Folge einer gesteigerten cGMP-Bildung ist.

##### 3.1.1.1 Nachweis der Wirkung des bei isometrischer Kontraktion aus Rattenaorten *in vitro* freigesetzten endothelialen NO



**Abb. 1a** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von  $N^G$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA) für die Kontraktion von endothelintakten Aortensegmenten der *A. thoracalis* von männlichen Ratten nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin (PE). Die L-NNA-induzierte Kontraktion wurde relativ zur maximalen (80 mM  $K^+$ -induzierten) Kontraktion [%] dargestellt. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 1 (PE 30 nM) und 2 (PE 50 nM) Tieren, pro Tier wurden 2 - 4 Aortenringen gleichzeitig untersucht.



**Abb. 1b** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von  $N^G$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA) für die Kontraktion von endothelintakten Aortensegmenten der *A. thoracalis* von weiblichen Ratten nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin (PE). Die L-NNA-induzierte Kontraktion wurde relativ zur maximalen (80 mM  $K^+$ -induzierten) Kontraktion [%] dargestellt. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 1 (PE 30 nM) und 2 Tieren (PE 50 nM), pro Tier wurden 2 - 4 Aortenringen gleichzeitig untersucht.

Zunächst wurde festgestellt, unter welchen experimentellen Bedingungen die basale endotheliale NO-Freisetzung den Gefäßtonus am stärksten beeinflusst. Die Voraussetzung zum Nachweis der kontraktionshemmenden Wirkung des basal freigesetzten NO ist, daß ein aktiver Gefäßtonus vorliegt, ähnlich der *in vivo* Situation. Die Rattenaroten wurden daher mit dem  $\alpha$ -Adrenozeptor Agonisten Phenylephrin (PE) aktiv, aber submaximal kontrahiert und die basale NO-Freisetzung durch die nach Hemmung der NO-Synthase mit  $N^G$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA) erzielte Tonussteigerung demaskiert.

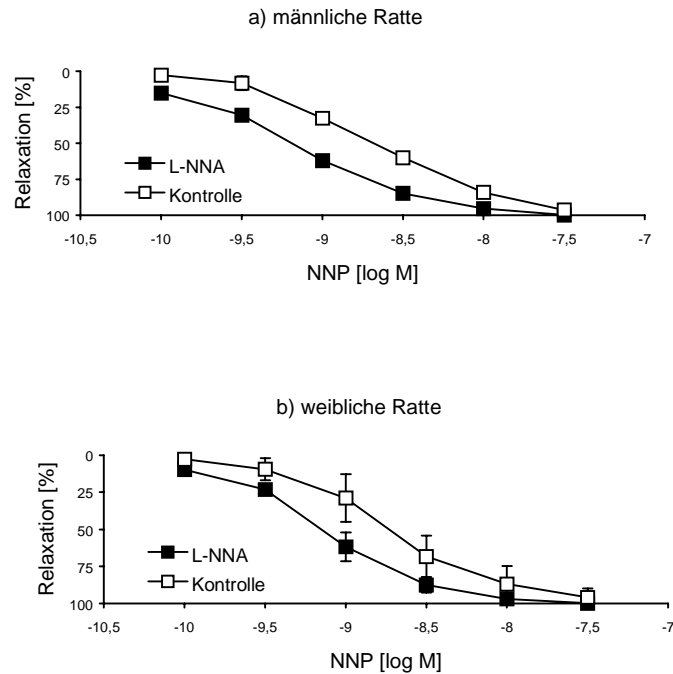
Da es in der Literatur Hinweise auf Geschlechtsunterschiede in der basalen NO-Freisetzung gibt (Stallone, 1993), wurden für diese Versuche sowohl männliche als auch weibliche Ratten verwendet. Die Versuche wurden nach der Methode B (Kap. 2.2.4.2) durchgeführt. Die Endothelintegrität wurde durch Stimulation der endothelabhängigen Relaxation mit Acetylcholin (ACh), das in kumulativen Konzentrationen (1 nM - 10  $\mu$ M) zugesetzt wurde, nachgewiesen. Bei den männlichen Tieren lag die maximale Relaxation nach Zugabe von 10  $\mu$ M ACh bei 33 % ( $EC_{50}$  300 nM) und bei den weiblichen Tieren bei 40 % ( $EC_{50}$  340 nM) (ohne Abb.). Anschließend wurden die Gefäßsegmente mit PE (30 - 50 nM) kontrahiert. Zum Nachweis des endothelialen NO wurde nach 15 min der NO-Synthase-Hemmer

L-NNA in kumulativen Konzentrationen zugegeben (100 nM - 30  $\mu$ M) und jeweils die zusätzliche maximal erzielte Tonussteigerung ermittelt. Wie in Abb. 1a dargestellt, betrug bei den männlichen Tieren die durch 30  $\mu$ M L-NNA induzierte Kontraktion nach Tonisierung mit 30 nM PE 30 % ( $EC_{50}$  660 nM L-NNA) und nach Tonisierung mit 50 nM PE 27 % ( $EC_{50}$  295 nM L-NNA). Es war demnach ein Unterschied zwischen mit 30 nM und mit 50 nM PE-tonisierten Gefäßen hinsichtlich der kontraktile Potenz, nicht aber der Effizienz (Maximaleffekt) des L-NNA festzustellen. Nur im unteren Konzentrationsbereich trat eine geringfügig stärkere Kontraktion bei den mit 50 nM PE kontrahierten Segmenten auf. Somit scheint die basale NO-Freisetzung den mit 30 nM PE als auch den mit 50 nM PE induzierten Tonus in gleichem Ausmaß herabzusetzen.

Bei den weiblichen Tieren (Abb. 1b) wurde nach Tonisierung mit 30 nM PE eine maximale Kontraktion von 21 % mit 10  $\mu$ M L-NNA erreicht ( $EC_{50}$  870 nM L-NNA). Bei stärkerer Tonisierung mit 50 nM PE betrug die maximale Tonussteigerung durch L-NNA 35 % ( $EC_{50}$  590 nM L-NNA). L-NNA zeigte eine stärkere kontraktile Wirkung bei 50 nM PE gegenüber den mit 30 nM PE kontrahierten Segmenten. Bei 30  $\mu$ M L-NNA war hingegen eine leichte Abnahme der Kontraktion auf 20 % (30 nM PE) bzw. 32 % (50 nM PE) zu beobachten. Die basale NO-Freisetzung ließ sich bei den weiblichen Tieren am besten bei einer Konzentration von 50 nM PE und 10  $\mu$ M L-NNA nachweisen. Beim Nachweis der basalen NO-Freisetzung zeigten die Aortenringe der weiblichen Tiere eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit von PE (30 nM oder 50 nM), während dies bei den männlichen Tieren nur hinsichtlich der kontraktile Potenz von L-NNA, nicht jedoch der Effizienz, erfolgte. In Bezug auf die Gesamtmenge des basal nachzuweisenden NO bestand jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen den männlichen und den weiblichen Tieren.

Bei gleicher Vortonisierung mit PE wurden ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung des eNOS-Inhibitors  $N^G$ -Nitro-L-Arginin-Methylester erzielt. Es konnte kein Unterschied im Ausmaß der durch eNOS-Hemmung induzierten zusätzlichen Kontraktion und der  $EC_{50}$  im Vergleich zu L-NNA festgestellt werden. Auch konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

### 3.1.1.2 Einfluß des endothelialen NO auf die Natriumnitroprussid-induzierte Relaxation Phenylephrin-kontrahierter Rattenaorten *in vitro*



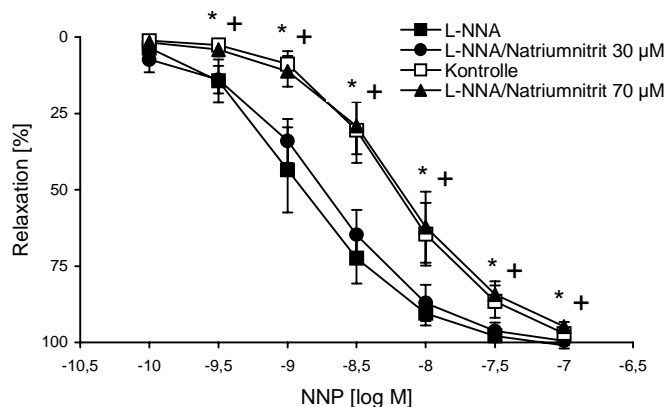
**Abb. 2** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Natriumnitroprussid (NNP; 0,1 nM - 30 nM) auf Phenylephrin- (PE) und  $N^G$ -Nitro-L-Arginin- (L-NNA; 30  $\mu$ M) kontrahierte endothelintakte Aortensegmente der *A. thoracalis* von einer männlichen (a) und einer weiblichen (b) Ratte. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte von je 2 Gefäßringen. Die Standardabweichung ist kleiner als die Symbolgröße (a).

In diesen Versuchen wurde unter den zuvor ermittelten Versuchsbedingungen (30  $\mu$ M L-NNA) der Einfluß von basal freigesetztem endothelialen NO auf die Sensitivität der Aorten gegenüber exogen appliziertem NO analysiert. Die Versuche wurden nach der Methode B durchgeführt. Die Endothelintegrität wurde mit Acetylcholin (1 nM - 10  $\mu$ M) überprüft. Die maximale Relaxation betrug bei dem männlichen Tier 33 % ( $EC_{50}$  320 nM) und bei dem weiblichen Tier 58 %

( $EC_{50}$  230 nM). Danach wurden die Gefäße mit Phenylephrin kontrahiert. Es wurden die zuvor ermittelten optimalen PE-Konzentrationen verwendet, d.h. die Aortenringe des männlichen Tieres wurden mit 30 nM PE tonisiert und die Aortenringe des weiblichen Tieres mit 50 nM PE. Danach wurde ein Teil der Gefäßsegmente mit 30  $\mu$ M L-NNA kontrahiert, um die basale NO-Bildung auszuschalten. Die nicht mit L-NNA-behandelten Kontrollsegmente wurden mit PE auf das gleiche Kontraktionsniveau wie die L-NNA-inkubierten Aortensegmente gebracht, dies entsprach ca. 70 % der mit 80 mM  $K^+$ -induzierten Kontraktion. Hierfür waren bei dem männlichen Tier 60 nM PE und bei dem weiblichen Tier 100 nM PE notwendig. Nach dem Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus wurde eine kumulative Natriumnitroprussid- (NNP) Konzentrations-Wirkungskurve (0,1 nM - 30 nM) aufgenommen. Der NO-Donor NNP bewirkte ab einer Konzentration von 0,1 nM eine konzentrationsabhängige Relaxation der Gefäßringe. Bei den Aortensegmenten der männlichen Ratte lag die  $EC_{50}$  bei 2,1 nM NNP (Abb. 2a), bei der weiblichen Ratte lag die  $EC_{50}$  bei 1,9 nM NNP (Abb. 2b). Die maximale Relaxation (100 %) wurde bei beiden Tieren bei einer NNP-Konzentration von 30 nM erreicht. Die Hemmung der NO-Synthase durch L-NNA (30  $\mu$ M) bewirkte sowohl bei der männlichen als auch bei der weiblichen Ratte eine Linksverschiebung der NNP-KWK. Bei dem männlichen Tier lag die  $EC_{50}$  bei 0,7 nM und bei dem weiblichen Tier bei 0,8 nM. Die maximale Relaxation der Gefäßsegmente wurde bei einer NNP-Konzentration von 10 nM erreicht. Der Versuch zeigte, daß - unabhängig vom Geschlecht des Tieres - der glatte Gefäßmuskel der Rattenaorta durch die basale endotheliale NO-Bildung gegenüber der relaxierenden Wirkung von NNP desensitiviert wurde.

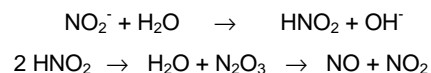
Mit den in Abb. 1 und Abb. 2 gezeigten Vorversuchen wurden die Versuchsbedingungen für die nachfolgenden Experimente festgelegt.

### 3.1.1.3 Einfluß von exogen zugeführtem NO auf die Natriumnitroprussid-induzierte Relaxation von Rattenaorten *in vitro*



**Abb. 3** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Natriumnitroprussid (NNP; 0,1 - 100 nM) auf Phenylephrin- (PE) kontrahierte endothelintakte Aortensegmente männlicher Ratten. Vor der PE-Kontraktion wurden die Aortensegmente für 30 min entweder mit  $N^G$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA; 30  $\mu$ M) oder mit L-NNA (30  $\mu$ M) in Anwesenheit von Natriumnitrit (30  $\mu$ M oder 70  $\mu$ M) inkubiert. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 - 7 Tieren, pro Tier wurden 2 - 4 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  L-NNA vs. Kontrolle; +  $p < 0,05$  L-NNA vs. L-NNA/Natriumnitrit 70  $\mu$ M).

Um zu überprüfen, ob es sich bei der endothelabhängigen Desensitivierung der Rattenaorten gegenüber der NNP-induzierten Relaxation um einen NO-medierten Prozeß handelt, oder ob ein anderer endothelvermittelter Mechanismus zugrunde liegt, wurden die Rattenaortensegmente nach Ausschaltung der endothelialen NO-Synthase durch L-NNA mit exogenem NO inkubiert, um die endogene NO-Bildung zu substituieren. Als exogener NO-Donor wurde Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) gewählt, da dieses gleichmäßig spontan und langsam zu NO umgesetzt wird. Über das chemische Gleichgewicht mit salpetriger Säure ( $\text{HNO}_2$ , pKs 4,3) wird nach der Formel:



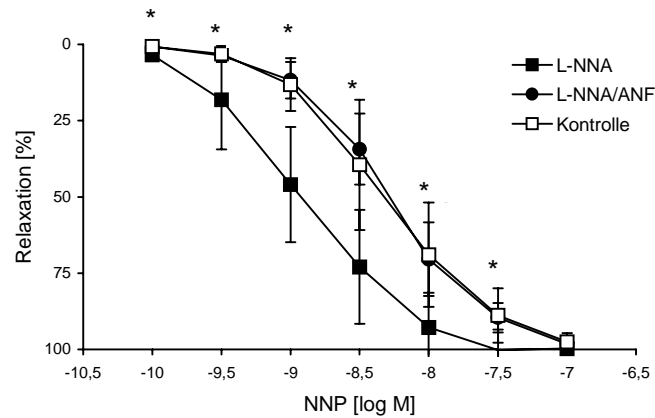
auch bei neutralem pH ständig in geringem Umfang NO aus Natriumnitrit gebildet.

Die Versuche wurden nach der Methode B durchgeführt. Im Anschluss an die ACh-KWK wurden die Gefäßsegmente für 30 min mit 30  $\mu$ M L-NNA oder mit 30  $\mu$ M L-NNA in Anwesenheit von 30  $\mu$ M bzw. 70  $\mu$ M Natriumnitrit inkubiert. Anschließend wurden die Gefäße mit Phenylephrin auf ca. 80 % der mit  $\text{K}^+$ -induzierten Kontraktion kontrahiert. Bedingt durch die Hemmung der endothelialen NO-Synthase kam es bei den L-NNA-behandelten Segmenten zu einer Verstärkung der vasokonstriktorisches Potenz von Phenylephrin. Diese Gefäßringe benötigten weniger PE (30 - 90 nM) als die nicht mit L-NNA-behandelten Ringe (70 - 200 nM), um den gleichen Tonus zu erreichen. Durch  $\text{NaNO}_2$  wurde die vasokonstriktorisches Potenz von PE wieder herabgesetzt. Je nach Konzentration des zugesetzten Natriumnitrits variierte die benötigte PE-Konzentration zur Einstellung von 80 % der  $\text{K}^+$ -induzierten Kontraktionsniveaus zwischen 40 - 100 nM in Gegenwart von 30  $\mu$ M Natriumnitrit und 100 - 500 nM PE bei 70  $\mu$ M Natriumnitrit.

Abb. 3 zeigt die Veränderungen der Potenz des NNP nach Hemmung der NO-Synthase durch L-NNA und bei gleichzeitiger Zugabe von Natriumnitrit. Bei den Gefäßringen mit intakter endothelialer NO-Bildung lag die  $\text{EC}_{50}$  bei 6,3 nM NNP, die maximale Relaxation (100 %) der Gefäßsegmente erfolgte bei 100 nM NNP. Die Hemmung der NO-Synthase durch L-NNA führte ab einer Konzentration von 0,3 nM NNP zu einer signifikanten Linksverschiebung der KWK. Die  $\text{EC}_{50}$  betrug nur 1,4 nM NNP und die maximale Relaxation wurde schon nach Zugabe von 30 nM NNP erreicht. Durch Zugabe von Natriumnitrit wurde dieser Effekt wieder aufgehoben. 30  $\mu$ M Natriumnitrit bewirkten keine deutliche Verschiebung der mit L-NNA aufgenommenen NNP-KWK ( $\text{EC}_{50}$  1,9 nM NNP, maximale Relaxation bei 100 nM). Der Effekt des NO-Synthase-Inhibitors auf die vasokonstriktorisches Potenz von NNP wurde durch die Zugabe von 70  $\mu$ M Natriumnitrit vollständig aufgehoben. Die  $\text{EC}_{50}$  lag in Gegenwart von L-NNA und 70  $\mu$ M Natriumnitrit bei 6,8 nM NNP, die maximale Relaxation wurde nach Zugabe von 100 nM NNP erreicht und zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit intakter NO-Synthase. Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, daß exogen zugeführtes NO die glatte Gefäßmuskulatur der Ratte gegenüber der relaxierenden Wirkung von NNP in gleichem Maße desensitiviert wie endogen gebildetes NO.



### 3.1.1.4 Einfluß des Atrialen Natriuretischen Faktors auf die Natriumnitroprussid-induzierte Relaxation von Rattenaorten *in vitro*



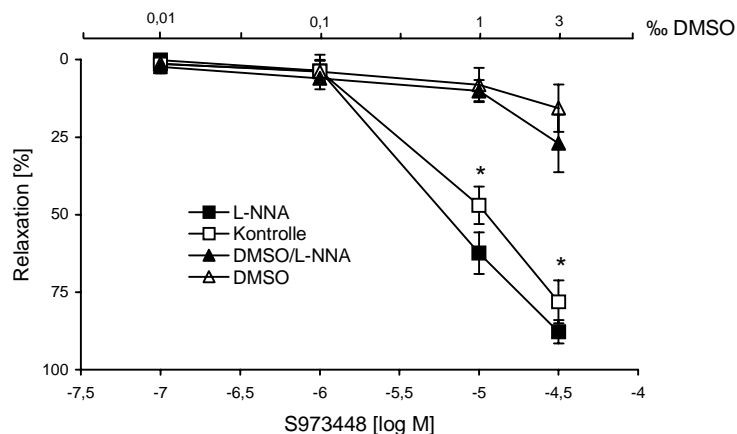
**Abb. 4** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Natriumnitroprussid (0,1 nM - 100 nM) auf Phenylephrin- (PE) kontrahierte endothelintakte Aorten-segmente männlicher Ratten. Vor der Kontraktion wurden die Aortenringe 30 min mit  $N^G$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA; 30  $\mu$ M) oder mit L-NNA (30  $\mu$ M) in Anwesenheit des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF; 1 nM) inkubiert. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Tieren, pro Tier wurden 2 - 4 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  L-NNA vs. L-NNA/ANF).

In dieser Versuchsserie wurde die Frage geklärt, ob es sich bei der Desensitivierung der GC gegenüber exogenem NO um einen cGMP-vermittelten Mechanismus handelt. Hierzu wurden die Aorten-segmente mit dem Atrialen Natriuretischen Faktor (ANF) inkubiert. ANF aktiviert die partikuläre Guanylylcyclase und führt über den Anstieg von cGMP und Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase zu einer Vasorelaxation (Murad *et al.*, 1987). Die Versuche wurden nach der Methode B durchgeführt. Nach Überprüfung der Endothelintegrität mit ACh wurden die Gefäß-segmente 30 min mit 30  $\mu$ M L-NNA oder mit 30  $\mu$ M L-NNA in Anwesenheit des ANF (1 nM) inkubiert. In dieser Konzentration löste ANF noch keine Relaxation aus. Die Kontraktion erfolgte mit PE auf ca. 80 % der maximal erreichten  $K^+$ -induzierten Kontraktion. Die dafür notwendige PE-Konzentration lag wie in Abb. 3 gezeigt bei 30 - 90 nM für die eNOS-gehemmten und bei 80 - 200 nM für die unbehandelten Kontrollen, während die mit L-NNA- und ANF-behandelten Aorten-segmente zwischen

70 und 200 nM PE benötigten. Die KWK der L-NNA-behandelten Aorten-segmente wies eine signifikante Linksverschiebung gegenüber der KWK der mit L-NNA und ANF gleichzeitig behandelten Aortenringe auf. Die  $EC_{50}$  lag bei 1,2 nM NNP. Die maximale Relaxation von 100 % wurde nach Zugabe von 30 nM NNP erreicht. Demgegenüber zeigten die mit L-NNA und ANF behandelten Segmente eine  $EC_{50}$  von 5,3 nM NNP und die maximale Relaxation erfolgte bei 100 nM NNP. Bei den Aorten-segmenten der Kontrollgruppe lag die  $EC_{50}$  bei 4,9 nM NNP und die maximale Relaxation wurde nach Zugabe von 100 nM NNP erreicht. Somit konnten keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppe gegenüber den gleichzeitig mit L-NNA und ANF behandelten Aorten-segmenten festgestellt werden. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß ANF sehr wahrscheinlich über eine Steigerung der cGMP-Bildung zur Desensitivierung der Rattenaorten gegenüber der NNP-induzierten Vasorelaxation führt.

### 3.1.2 Einfluß von endogenem NO auf den Oxidationszustand des Hämeisens der GC in isolierten Rattenarterien

Mit diesen Untersuchungen wurde geklärt, ob die Desensitivierung der GC durch endothelial gebildetes NO zu einer Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zugunsten der Häm-oxidierten GC führt. Dazu wurde die Substanz S973448 eingesetzt, die selektiv die Häm-eisen-oxidierte Form der GC aktiviert (Jannek, Dissertation in Vorbereitung).



**Abb. 5** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von S973448 (100 nM - 30  $\mu$ M) und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle (0,01 - 3 %) auf Phenylephrin- (PE) kontrahierte (60 - 200 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* der Ratte. Vor der Kontraktion wurden die Aortenringe 30 min mit N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA; 30  $\mu$ M) inkubiert. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 Tieren, pro Tier wurden 3 Aortenringe (DMSO je 1 Ring) gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  L-NNA vs. Kontrolle).

Die Versuche wurden nach der Methode B - wie bereits beschrieben - durchgeführt. Um die vermutete Oxidation der GC durch endothelial gebildetes NO zu verhindern, wurde ein Teil der Aortenringe mit L-NNA (30  $\mu$ M) inkubiert. Die Ausschaltung der endothelialen NO-Synthase bewirkte wie zuvor beschrieben eine Verstärkung der vasokonstriktorisches Potenz von PE. Die L-NNA-behandelten Gefäßsegmente benötigten nur 60 - 90 nM PE, während die Kontrollgefäße erst mit 200 nM PE auf

das Kontraktionsniveau von 80 % der K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktion gebracht werden konnten. Bei den unbehandelten Aorten löste S973448 nach der Zugabe von 0,1  $\mu$ M noch keinen relaxierenden Effekt aus (Abb. 5). Eine deutliche Relaxation war erst ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M zu erkennen (3,6 % Relaxation). Die EC<sub>50</sub> von S973448 lag bei 8,9  $\mu$ M und die maximale Relaxation dieser Aortensegmente betrug 78 %. Die Antwort der L-NNA-behandelten Gefäßringe war bei niedrigen Konzentrationen mit 1 % Relaxation (0,1  $\mu$ M S973448) und 3,7 % Relaxation (1  $\mu$ M S973448) vergleichbar mit dem Ergebnis der unbehandelten Aorten und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu diesen. Nach Zugabe von 10  $\mu$ M S973448 war jedoch ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen den L-NNA-behandelten und unbehandelten Gefäßen deutlich. Die EC<sub>50</sub> der unbehandelten Gefäßsegmente betrug 8,9  $\mu$ M, die maximale Relaxation lag bei 78 %. Bei den L-NNA-behandelten Segmenten betrug die EC<sub>50</sub> nur 6,8  $\mu$ M. Die Maximalantwort dieser Segmente lag bei 88 %. Diese im Vergleich zu den Kontrollsegmenten verstärkte Relaxation der L-NNA-behandelten Aortenringe läßt darauf schließen, daß die GC offenbar nicht durch das endothelial gebildete NO oxidiert wurde.

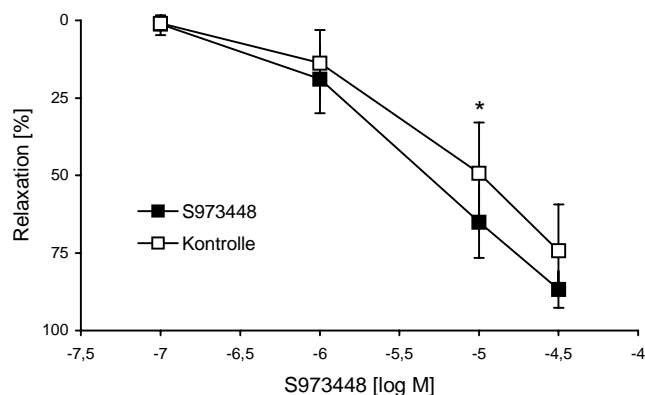
Bei jedem Versuch wurden mit zwei Aortenringen Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) erstellt. DMSO zeigte eine vasorelaxierende Wirkung, die nach Zugabe von 3 % bei den Kontrollgefäßen bei 16 % und bei den L-NNA-behandelten Segmenten bei 27 % lag.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß die Substanz S973448 über die Aktivierung der Häm-oxidierten GC eine signifikante Relaxation der Aortensegmente bewirkte. Jedoch konnte kein Hinweis auf eine mögliche Desensitivierung der GC durch ein verändertes Redoxgleichgewicht gefunden werden. Im Gegenteil, auch in diesem Fall führte die Hemmung der endogenen NO-Bildung mit L-NNA zu einer schwachen, aber signifikanten Steigerung der vasorelaxierenden Potenz dieses neuartigen, NO-unabhängigen GC-Aktivators.

### 3.1.3 Einfluß einer chronischen Aktivierung der Häm-oxidierten GC *in vivo* auf die NO-Sensitivität des Enzyms in isolierten Rattenaorten

Mit Hilfe dieser Versuche wurde die chronische Wirkung von S973448 und HMR1766 auf die vasorelaxierende Funktion der löslichen Guanylylcyclase an Rattenaorten untersucht. Es wurde ermittelt, ob es in der *A. thoracalis* der Ratte nach chronischer Exposition (3 Tage oder 4 Wochen) mit Aktivatoren der Häm-oxidierten GC zu einer Wirkungsabschwächung gegenüber diesen Substanzen (Eigentoleranz) und gegenüber organischen Nitraten sowie endogenem NO (Kreuztoleranz) kommt.

#### 3.1.3.1 Akute relaxierende Wirkung von S973448 *in vitro* auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage)

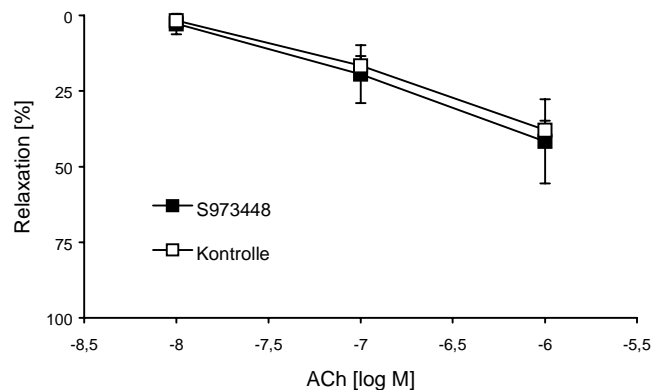


**Abb. 6** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von S973448 (100 nM - 30 µM) auf Phenylephrin- (PE) kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von S973448-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 - 4 Tieren, pro Tier wurden 6 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\* $p < 0,05$  S973448 vs. Kontrolle).

Mit diesen Untersuchungen wurde überprüft, ob es durch die chronische *in vivo* Applikation von S973448 bei Ratten zu einem Wirkungsverlust gegenüber dieser Substanz in den Aorten kommt. Die Ratten wurden drei Tage lang 2 x täglich mit 10 mg/kg KG S973448 s.c. behandelt (Volumen 1 ml/kg KG). Die Kontrollratten erhielten entsprechend 1 ml/kg KG des Lösungsmittels Polyethylenglykol 400 (PEG 400) s.c. (Kapitel 2.2.2.1). Am 4. Tag wurden die Tiere wie bereits beschrieben anästhesiert und die thorakalen Aorten für die isometrischen Kontraktionsmessungen im Organbad eingespannt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Methode A. Nach Überprüfung der ACh- (10 nM - 1 µM) und NTG- (1 nM - 10 µM) Sensitivität der Gefäße erfolgte nach Kontraktion mit PE (300 nM) die Erstellung der S973448-KWK (100 nM - 30 µM). Wie in Abb. 6 dargestellt, führte S973448 ab einer Konzentration von 1 µM zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Relaxation sowohl der S973448-vorbehandelten Gefäße als auch der Kontrollringe. Die Aortensegmente der Kontrolltiere wiesen eine  $EC_{50}$  von 3,6 µM S973448 auf. Die Zugabe von 30 µM S973448 bewirkte eine maximale Relaxation von 74 %. Die Aortensegmente der S973448-behandelten Ratten wiesen eine  $EC_{50}$  von 5,1 µM auf. Die maximale Relaxation dieser Segmente lag bei einer Konzentration von 30 µM S973448 bei 87 %. Die Aortenringe der S973448-behandelten Ratten zeigten nach der Zugabe von 10 µM und 30 µM S973448 eine deutlich verstärkte Relaxation gegenüber den Kontrollsegmenten. Diese war bei einer Konzentration von 10 µM S973448 signifikant.

Es konnte damit gezeigt werden, daß die dreitägige Applikation des Aktivators der Häm-oxidierten GC (S973448) zu keiner Wirkungsabschwächung (Eigentoleranz) gegenüber dieser Substanz führte. Im Gegenteil: es war sogar bei der akuten Gabe von 10 µM und 30 µM S973448 eine Verstärkung der glattmuskulären Relaxation zu beobachten.

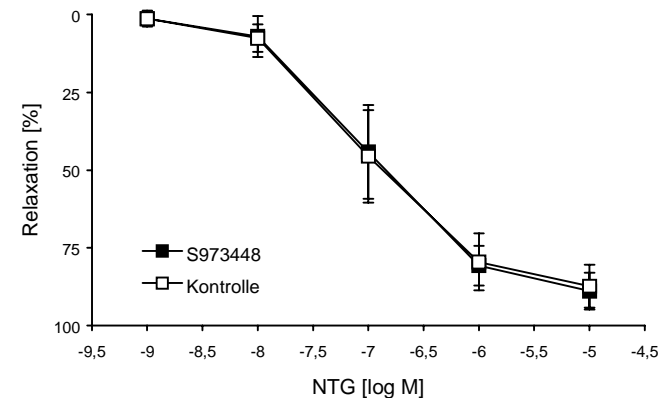
### 3.1.3.2 Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin *in vitro* auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage)



**Abb. 7** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Acetylcholin (10 nM - 1  $\mu$ M) auf  $K^+$ -kontrahierte (40 mM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von S973448-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 - 4 Tieren, pro Tier wurden 6 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

Das Ziel dieser Versuche war es, festzustellen, ob eine dreitägige Behandlung von Ratten mit S973448 die Wirkung des endothelabhängigen Vasodilatators Ach auf die isolierten Rattenaorten beeinflusst. Um den endothelialen hyperpolarisierenden Faktor auszuschalten und die NO-medierte Relaxation selektiv zu erfassen, wurden die Gefäße mit kaliumreicher ( $K^+$  40 mM) Krebs-Henseleit-Pufferlösung kontrahiert (Methode A). Nach dem Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus wurde, wie in Abb. 7 dargestellt, die KWK von ACh (10 nM - 1  $\mu$ M) aufgenommen. ACh induzierte in beiden Behandlungsgruppen eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation. Die  $EC_{50}$  der Kontrollaorten lag bei 110 nM ACh und die maximale Relaxation betrug 38 % (1  $\mu$ M ACh). Bei den S973448-behandelten Rattenaorten zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Die  $EC_{50}$  lag hier bei 100 nM ACh, die maximale ACh-induzierte Relaxation betrug 42 %. Signifikante Unterschiede zwischen den S973448-behandelten Gefäßen und den Kontrollgefäßen konnten nicht beobachtet werden. Eine Kreuztoleranz von S973448 gegenüber endogenem NO (ACh) war in den Rattenaorten bei diesen Versuchen somit nicht nachzuweisen.

### 3.1.3.3 Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol *in vitro* auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage)

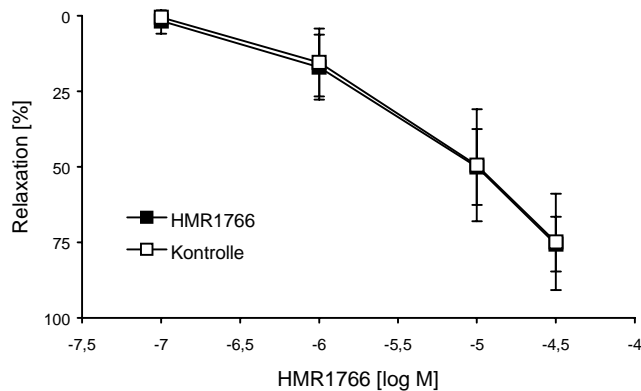


**Abb. 8** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nitroglycerol (NTG; 1 nM - 10  $\mu$ M) auf Phenylephrin- (PE) kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von S973448-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 - 4 Tieren, pro Tier wurden 6 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

Die Versuche wurden nach der Methode A durchgeführt. Um festzustellen, ob es durch die dreitägige Zufuhr von S973448 bei den Ratten zu einer Toleranzentwicklung, d.h. zu einem Wirkungsverlust gegenüber exogenem NO in Form von organischen Nitraten kommt (Kreuztoleranz), wurde im Anschluß an die ACh-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung eine Nitroglycerol (NTG)-KWK (1 nM - 10  $\mu$ M) aufgenommen. Die  $EC_{50}$  der Aortenringe der Kontrollratten lag bei 130 nM, während die  $EC_{50}$  der S973448-behandelten Aortensegmente 104 nM NTG betrug (Abb. 8). Die durch 10  $\mu$ M NTG-induzierte Maximalantwort der Kontrollsegmente lag bei 87 %, die der S973448-behandelten Segmente bei 89 % Relaxation. Im gesamten Kurvenverlauf konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die NTG-induzierte Relaxation der Gefäße festgestellt werden. Ein Wirkungsverlust gegenüber NTG konnte in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, d. h. die dreitägige chronische Aktivierung der Häm-oxidierten GC *in vivo* führte zu keiner Kreuztoleranz gegenüber exogenem NO (NTG) in den Rattenaorten.

### 3.1.3.4 Akute relaxierende Aktivierung von HMR1766 *in vitro* auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage)

Mit Hilfe dieser Untersuchungen wurde ermittelt, ob es durch die chronische Verabreichung von HMR1766 (3 Tage) bei Ratten *in vivo* zu einem Wirkungsverlust gegenüber dieser Substanz kommt. HMR1766 zählt wie die Leitsubstanz S973448 zu den Aktivator der Häm-oxidierten GC und induziert wie diese eine konzentrationsabhängige Relaxation der Rattenaorten.

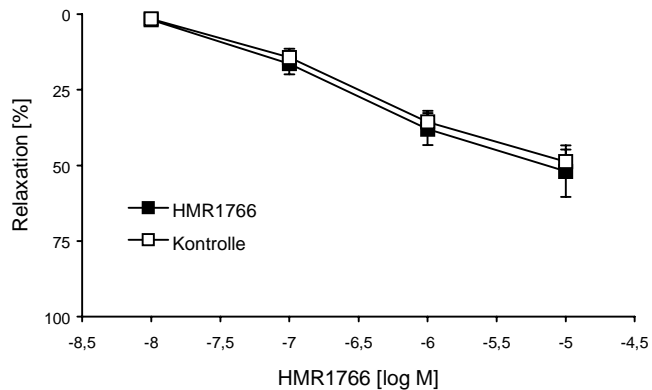


**Abb. 9** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von HMR1766 (100 nM - 30  $\mu$ M) auf Phenylephrin-(PE) kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der A. thoracalis von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Tieren, pro Tier wurden 6 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

Für diese Versuche erhielten die Ratten über einen Zeitraum von drei Tagen zweimal täglich 10 mg/kg KG HMR1766 s.c. injiziert. Die Kontrollratten bekamen das entsprechende Volumen (1 ml/kg KG) PEG 400 s.c. verabreicht. Am 4. Tag wurden die Ratten narkotisiert und durch Punktion der A. abdominalis entblutet. Anschließend wurden die thorakalen Aorten entnommen. Das gewonnene Blut wurde zur Bestimmung der Plasmakonzentration von HMR1766 verwendet. Es konnten  $12,0 \pm 3,5$   $\mu$ g/ml Mittelwert  $\pm$  Standardfehler HMR1766 im Plasma nachgewiesen werden (Fa. Aventis, unveröffentlicht). Nach Überprüfung der ACh- (10 nM - 10  $\mu$ M)

und NTG- (1 nM – 30  $\mu$ M) Sensitivität wurden die Gefäße mit 300 nM PE kontrahiert. Danach wurde die HMR1766-Konzentrations-Wirkungsbeziehung (100 nM - 30  $\mu$ M) ermittelt. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach der Methode A. Wie in Abb. 9 dargestellt, führte HMR1766 zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation der Aorten aus HMR1766-behandelten und PEG 400-behandelten Ratten (Kontrolltiere). Der kontraktionshemmende Effekt von HMR1766 war ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M sowohl bei den Substanz- als auch bei den PEG 400-behandelten Tieren signifikant. Die Aortensegmente der Kontrollratten wiesen eine halbmaximale Relaxation bei 10  $\mu$ M HMR1766 auf. Bei den Gefäßringen der HMR1766-behandelten Ratten war die  $EC_{50}$  mit 11  $\mu$ M fast identisch. Nach Zugabe von 30  $\mu$ M HMR1766 betrug die Relaxation der Aortenringe in beiden Gruppen 75 %. Im gesamten Verlauf der KWK war zwischen den Aortensegmenten der HMR1766-behandelten Ratten und der Kontrollratten kein Unterschied in Bezug auf die relaxierende Wirkung auf HMR1766 zu erkennen. Somit war auch bei diesem Aktivator der Häm-oxidierten GC nach dreitägiger Applikation keine Eigentoleranzentwicklung festzustellen.

### 3.1.3.5 Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin *in vitro* auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage)

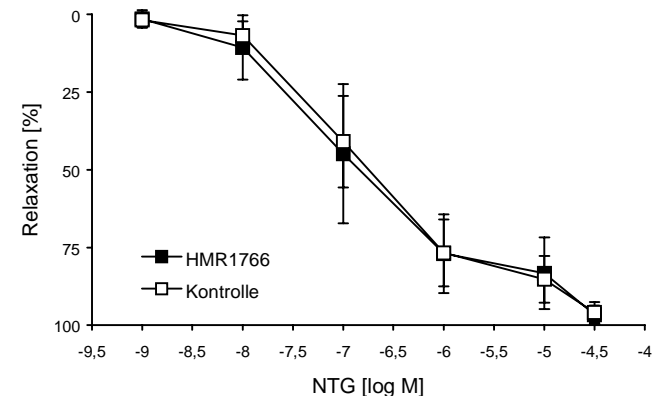


**Abb. 10** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Acetylcholin (10 nM - 10 µM) auf  $K^+$ -kontrahierte (40 mM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Tieren, pro Tier wurden 6 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

Um zu überprüfen, ob eine Vorbehandlung der Ratten *in vivo* mit HMR1766 über einen Zeitraum von drei Tagen zu einer Abnahme der endogenen NO-Sensitivität in den Rattenaorten *in vitro* führt, wurde die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von ACh (10 nM – 10 µM) ermittelt. Wie in Methode A dargestellt, wurden die Gefäße mit 40 mM  $K^+$ -reicher Krebs-Henseleit-Lösung kontrahiert und die ACh-KWK durchgeführt. Abb. 10 zeigt die Agonisten-induzierte Vasorelaxation der HMR1766- und PEG 400-behandelten Rattenaortenringe. Zwischen den beiden Gruppen waren im gesamten Verlauf der KWK keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Eine deutliche Relaxation der Segmente beider Gruppen war ab einer Konzentration von 100 nM ACh zu beobachten. Die  $EC_{50}$  der Kontrollratten lag bei 310 nM ACh, die maximale Relaxation betrug 49 %. Die  $EC_{50}$  der HMR1766-behandelten Ratten betrug 280 nM ACh, die maximale Relaxation nach Zugabe von 10 µM ACh war mit 52 % fast identisch zu der Relaxation der Kontrollaorten. Wie auch nach der Behandlung mit dem Aktivator der Häm-oxidierten GC S973448 über drei Tage kam

es nach der Behandlung mit HMR1766 über einen Zeitraum von drei Tagen zu keiner Kreuztoleranz gegenüber endogenem NO.

### 3.1.3.6 Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol *in vitro* auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage)



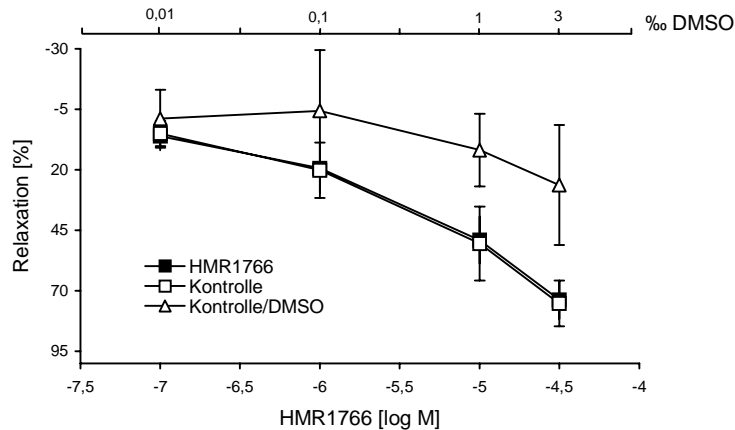
**Abb. 11** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NTG (1 nM - 30 µM) auf Phenylephrin- (PE) kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Tieren, pro Tier wurden 6 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

In diesen Versuchen wurde untersucht, ob die dreitägige Applikation von HMR1766 *in vivo* zu einer Kreuztoleranz gegenüber exogenem NO führt. Als organischer NO-Donor wurde Nitroglycerol verwendet. Die Versuche wurden wie bereits unter Abb. 9 beschrieben durchgeführt. In Abb. 11 ist die konzentrationsabhängige Relaxation der Rattenaorten auf NTG (1 nM – 30 µM) dargestellt. Die Aortensegmente der Kontrollratten wiesen eine  $EC_{50}$  von 160 nM NTG und eine maximale vasorelaxierende Antwort von 96 % bei einer Konzentration von 30 µM NTG auf. Demgegenüber wurde bei den HMR1766-behandelten Ratten eine  $EC_{50}$  von 130 nM NTG ermittelt. Der maximale Effekt von NTG von 97 % wurde wie auch bei den Kontrollringen nach einer Zugabe von 30 µM NTG erreicht. Die NTG-induzierte Vasorelaxation wies bei den Konzentrationen von 1 nM bis 30 µM keine signifikanten

Unterschiede zwischen den HMR1766-behandelten und den Kontrollratten auf. Auch bei diesem Aktivator der Häm-oxidierten GC ist nach dreitägiger Behandlung der Ratten *in vivo* keine Kreuztoleranz der Rattenaorten gegenüber exogenem NO nachzuweisen.

### 3.1.3.7 Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 *in vitro* auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen)

Ziel dieser Untersuchungen war es, zu ermitteln, ob die chronische Exposition der Ratten mit HMR1766 *in vivo* über einen Zeitraum von vier Wochen zu einer Abschwächung der vasorelaxierenden Wirkung dieser Substanz in den Rattenaorten führt (Eigentoleranz).



**Abb. 12** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von HMR1766 (100 nM - 30  $\mu$ M) und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle (0,01 - 3 ‰) auf Phenylephrin-(PE) kontrahierte (300 nM - 800 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 5 Tieren, pro Tier wurden 5 - 8 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

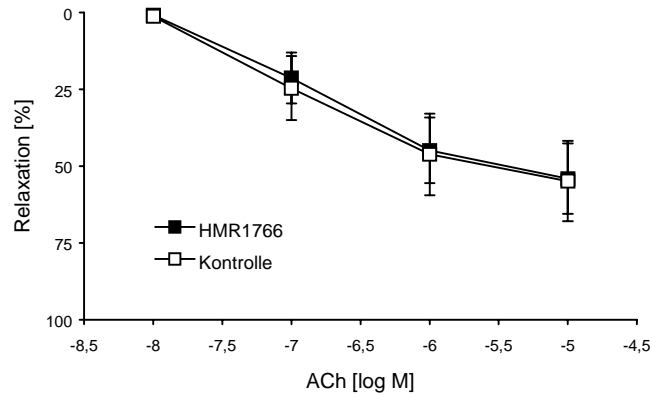
Die Ratten erhielten über einen Zeitraum von vier Wochen einmal täglich 30 mg/kg KG HMR1766 bzw. 2 ml/kg KG der Trägersubstanz Hydroxyethylcellulose 0,5 % oral verabreicht. Zwei Stunden nach der letzten Applikation wurden die Tiere

anästhesiert, durch Punktion der *A. abdominalis* entblutet und die thorakalen Aorten wurden entnommen. Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen ergab einen Gehalt von  $9,4 \pm 3,7 \mu\text{g/ml MW} \pm$  Standardfehler HMR1766 im Plasma (Fa. Aventis, unveröffentlicht). Die Versuche wurden nach der Methode A - wie unter Abb. 9 beschrieben - ausgeführt. Abb. 12 zeigt die HMR1766-induzierte konzentrationsabhängige Relaxation der Rattenaorten. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung war zwischen den HMR1766- und Hydroxyethylcellulose-behandelten Rattenaorten annähernd identisch, es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M führte HMR1766 zu einer deutlichen Relaxation der Gefäßringe. Die Aortensegmente sowohl der mit HMR1766-behandelten Ratten als auch der Kontrolltiere wiesen eine  $EC_{50}$  von 12  $\mu$ M HMR1766 auf. Bei der Zugabe von 30  $\mu$ M HMR1766 relaxierten die Gefäße in beiden Gruppen maximal auf 75 %.

Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) bewirkte bei einer Konzentration von 3 ‰ eine Vasorelaxation von 26 %.

Wie schon bei der Überprüfung der Eigentoleranz nach drei Tagen ist auch hier nach vier Wochen Vorbehandlung mit HMR1766 keine Eigentoleranzentwicklung zu beobachten. Die Kurven verlaufen deckungsgleich zu den KWK der Aortensegmente der drei Tage HMR1766-behandelten Ratten (Abb. 9).

### 3.1.3.8 Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin *in vitro* auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen)

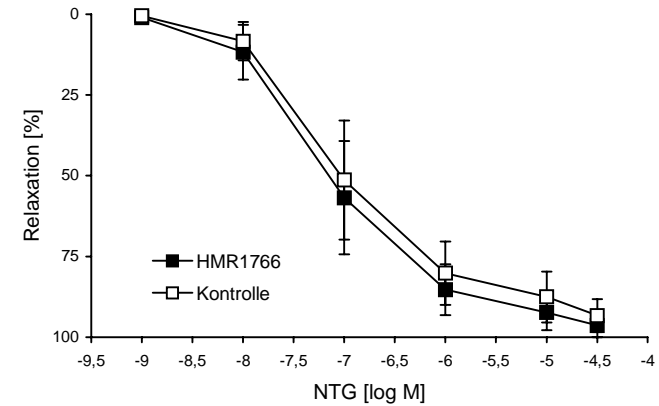


**Abb. 13** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Acetylcholin (10 nM - 10  $\mu$ M) auf  $K^+$ -kontrahierte (40 mM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 5 Tieren, pro Tier wurden 5 - 8 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

Mit Hilfe dieser Versuchsreihe wurde nachgewiesen, daß eine Behandlung von Ratten über einen Zeitraum von vier Wochen mit HMR1766 zu einer Abschwächung der endogenen NO-Sensitivität führt. Als endothelabhängiger Vasodilatator wurde ACh in den Konzentrationen von 10 nM – 10  $\mu$ M verwendet. Der Versuchsablauf erfolgte wie unter Abb. 9 beschrieben. Die Agonisten-induzierte Kontraktionshemmung war bei beiden Gruppen ab einer Konzentration von 100 nM ACh signifikant. Die maximale Kontraktionshemmung der HMR1766-behandelten Rattenaorten bzw. der Kontrollgruppe betrug 54 % (Abb. 13). Ein geringer Unterschied war in der  $EC_{50}$  zu erkennen. Die Aorten aus den Hydroxyethylcellulose-behandelten Kontrollratten wiesen eine  $EC_{50}$  von 130 nM ACh auf, während Aorten aus den HMR1766-behandelten Ratten eine  $EC_{50}$  von 170 nM ACh zeigten. Somit ließ sich nachweisen, daß bezüglich der ACh-induzierten endothelabhängigen Relaxation auch nach der Applikation über einen Zeitraum von vier Wochen kein Unterschied zwischen den HMR1766- und Hydroxyethylcellulose-behandelten

Rattenaorten bestand. Eine Kreuztoleranzentwicklung gegenüber endogenem NO konnte auch nach vierwöchiger Applikation von HMR1766 nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.3.9 Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol *in vitro* Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen)



**Abb. 14** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NTG (1 nM - 30  $\mu$ M) auf Phenylephrin- (PE) kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 5 Tieren, pro Tier wurden 5 - 8 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

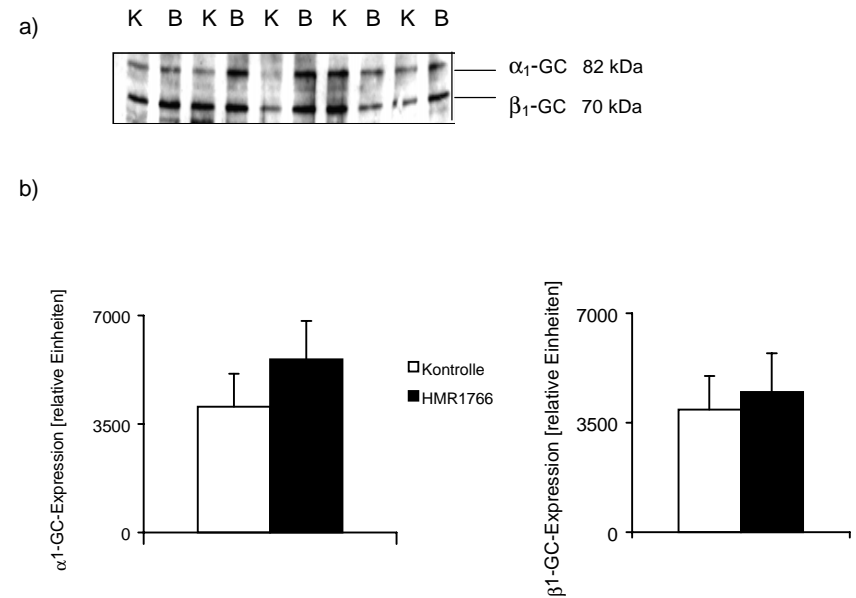
Um festzustellen, ob es nach vierwöchiger Zufuhr von HMR1766 bei den Ratten zu einer Kreuztoleranz gegenüber exogenem NO in Form von organischen Nitraten kommt, wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von NTG an den HMR1766- und Hydroxyethylcellulose-behandelten Rattenaorten ermittelt. Die Versuche wurden wie unter Abb. 9 beschrieben durchgeführt. NTG führte bei beiden Gruppen ab einer Konzentration von 10 nM zu einer konzentrationsabhängigen signifikanten Relaxation der Gefäßsegmente (Abb. 14). Die  $EC_{50}$  der Aortenringe der Kontrollratten lag bei 89 nM. Die  $EC_{50}$  der HMR1766-behandelten Aortensegmente betrug 72 nM. Die durch 30  $\mu$ M NTG-induzierte Maximalantwort der Gefäße betrug



bei den Kontrollratten 93 % und bei den HMR1766-behandelten Ratten 96 % Relaxation. Ab einer Konzentration von 10 nM zeigten die HMR1766-behandelten Aorten eine gegenüber den Kontrollen verstärkte Vasorelaxation. Eine Kreuztoleranz der HMR1766-behandelten Aorten gegenüber exogenem NO konnte somit nicht nachgewiesen werden. Diese Aorten zeigten sogar eine verbesserte Relaxation auf den NO-Donor im Vergleich zu den Kontrollaorten.

### 3.1.4 Western Blot Analyse der Expression der $\alpha_1$ - und der $\beta_1$ -Untereinheit der GC von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen)

In diesem Experiment wurde untersucht, inwieweit die Behandlung von Ratten mit dem Aktivator der Häm-oxidierten GC HMR1766 über einen Zeitraum von vier Wochen zu einer Veränderung der Expression der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC in den Rattenaorten führt.



**Abb. 15** Vergleich der GC-Expression aus Aortenextrakten von HMR1766-behandelten Ratten (B) und Kontrollratten (K). Jeweils 40  $\mu$ g Protein des 10000 g Überstandes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die  $\alpha_1$ - und die  $\beta_1$ -Untereinheit der GC detektiert.

a) Aufnahme des Immunoblots

b) Densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 5 Tieren.

Für diesen Versuch wurde aus den thorakalen Aorten nach dem im Methodenteil (Kap. 2.2.5) beschriebenen Verfahren ein Proteinextrakt präpariert. Die Proteine wurden mit SDS (Natriumdodezylsulfat) denaturiert, elektrophoretisch auf einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit und die  $\beta_1$ -Untereinheit der GC wurden mittels eines spezifischen IgY-Antikörpers (Huhn) und eines anti-IgY-Antikörpers (Kaninchen) detektiert. Wie in Abb. 15 dargestellt, war die Expression beider Untereinheiten der GC bei den Aortenextrakten der HMR1766-behandelten Ratten nicht signifikant verändert im Vergleich zu den Kontrollratten, obwohl HMR1766-behandelte Tiere tendenziell einen Anstieg der GC-Expression erkennen ließen.

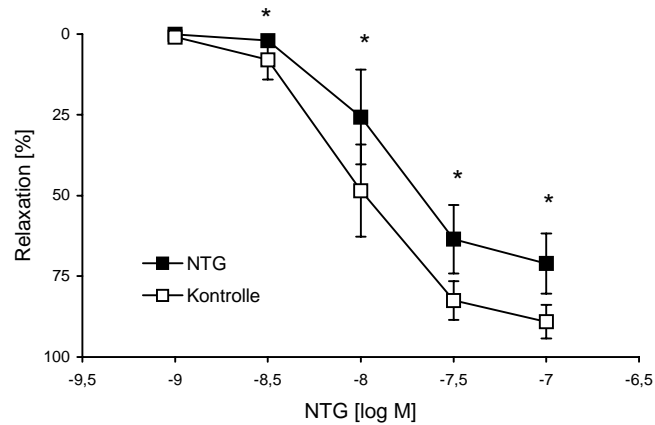
### 3.2 GC-Regulation bei vaskulären Störungen

Zur Untersuchung der chronischen GC-Desensitivierung bei vaskulären Störungen wurden zwei Tiermodelle untersucht. Im Tiermodell der nitrattoleranten Ratte führt die chronische Applikation von Nitroglycerol zu einer Toleranzentwicklung und endothelialen Dysfunktion (Molina *et al.*, 1987). Im Modell des salzinduzierten renalen Bluthochdrucks bei Dahl-S-Ratten entwickeln die Tiere aufgrund eines Gendefektes nach der Gabe einer salzreichen Diät eine Hypertonie (Dahl *et al.*, 1962).

#### 3.2.1 Einfluß von Nitrattoleranz auf NO-Sensitivität, Häm-Redox-Zustand und Expression der GC

Es wurde untersucht, ob es durch die dreitägige Exposition von Ratten mit Nitroglycerol-Lösung (9,6 %) *in vivo* zu einer verminderten glattmuskulären Antwort der Aorten gegenüber exogen zugeführten organischen Nitraten kommt (Eigentoleranzentwicklung). Außerdem wurde überprüft, ob eine Kreuztoleranz zu anderen NO-abhängigen Relaxationsmechanismen wie anorganische, exogen zugeführte Nitrate (NNP) und endogenem NO (ACh) sowie S973448 und HMR1766 besteht. Zur Erzielung der Nitrattoleranz wurden den Ratten osmotische Minipumpen implantiert (Kap. 2.2.2.4), aus welchen kontinuierlich 1 mg/h Nitroglycerol freisetzt wurde. Die Kontrollratten bekamen Minipumpen, die nur mit dem Lösungsmittel Ethanol 98 % gefüllt waren, implantiert. Am 3. Tag nach der Implantation der Pumpen wurden die Ratten wie bereits beschrieben narkotisiert und die thorakalen Aorten entnommen.

### 3.2.1.1 Akute relaxierende Wirkung von Nitroglycerol *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage)

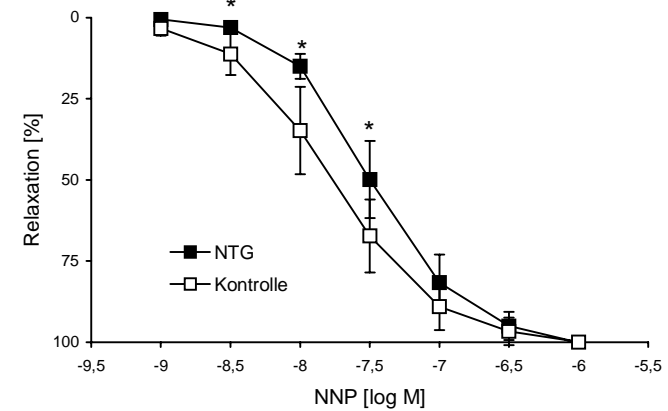


**Abb. 16** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nitroglycerol (1 nM - 100 nM) auf Phenylephrin-kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der A. thoracalis von NTG-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Tieren, pro Tier wurden 3 - 4 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  NTG vs. Kontrolle).

Um festzustellen, ob die Aortensegmente der NTG-behandelten Ratten eine Toleranz gegenüber akut appliziertem NTG *in vitro* aufweisen, wurden KWK der Aortenringe mit NTG angefertigt (Münzel *et al.*, 1995). Die Versuche wurden nach der Methode A durchgeführt. Die NTG-KWK (1 nM - 30  $\mu$ M) wurde im Anschluß an die Überprüfung der Endothelintegrität mit ACh und dem Nachweis der NNP-Sensitivität durchgeführt. NTG induzierte in beiden Gruppen ab einer Konzentration von 3 nM eine Kontraktionshemmung der Gefäße (Abb. 16). Die  $EC_{50}$  der Aortenringe der Kontrollratten lag bei 9,3 nM NTG. Bei einer Konzentration von 100 nM NTG betrug die maximale Relaxation 89 %. Demgegenüber wiesen die Aortensegmente der NTG-behandelten Ratten eine  $EC_{50}$  von 13 nM auf und eine maximale Relaxation von 71 % bei 100 nM NTG. Nach Zugabe von 3 nM - 100 nM NTG war eine signifikante Abschwächung der Relaxation der NTG-behandelten Rattenaortenringe im Vergleich zu den Gefäßen der Kontrollratten zu beobachten. Der Versuch belegte

daher, daß die Vorbehandlung mit NTG an der glatten Gefäßmuskulatur der Aorten eine Verminderung der vasorelaxierenden Potenz des NO-Donors NTG bewirkte (Eigentoleranz).

### 3.2.1.2 Akute relaxierende Wirkung von Natriumnitroprussid *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage)

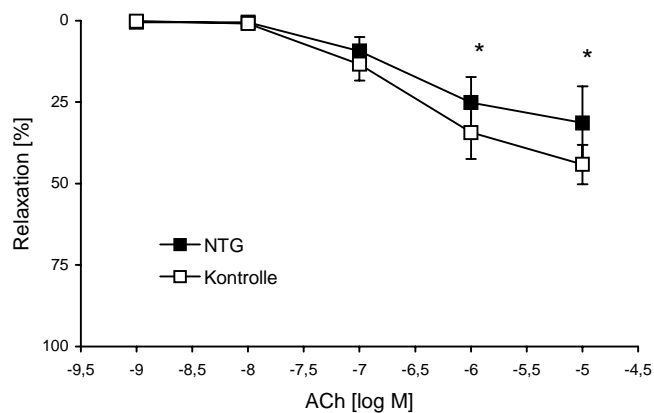


**Abb. 17** Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von Natriumnitroprussid (1 nM - 1  $\mu$ M) auf Phenylephrin-kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der A. thoracalis von NTG-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Tieren, pro Tier wurden 3 - 4 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  NTG vs. Kontrolle).

Es wurde untersucht, ob es nach dreitägiger *in vivo* Behandlung von Ratten mit Nitroglycerol zu einer Kreuztoleranzentwicklung gegenüber dem anorganischen NO-Donor NNP kommt. Die Versuche wurden nach der Methode A durchgeführt. Die NNP-KWK (1 nM - 1  $\mu$ M) wurde im Anschluß an die Überprüfung der Endothelintegrität mit ACh aufgenommen. NNP bewirkte eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation. Wie in Abb. 17 dargestellt, lag die  $EC_{50}$  bei den Aortensegmenten der Kontrollratten bei 17 nM NNP, die maximale Relaxation von 100 % wurde nach Zugabe von 1  $\mu$ M NNP erreicht. Bei den Aortenringen der NTG-behandelten Ratten lag die  $EC_{50}$  bei 33 nM NNP und die maximale Relaxation von 100 % wurde

ebenfalls nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  NNP erreicht. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren lediglich nach Zugabe von 3 nM, 10 nM und 30 nM NNP zu erkennen. Bei höheren Konzentrationen des NO-Donors (100 nM, 300 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) konnte die verminderte Ansprechbarkeit der Gefäßsegmente der NTG-behandelten Ratten hingegen nicht beobachtet werden, die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren hier nicht signifikant. Eine Kreuztoleranz zwischen NTG und NNP konnte somit nur bei den niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden.

### 3.2.1.3 Akute relaxierende Wirkung von Acetylcholin *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage)



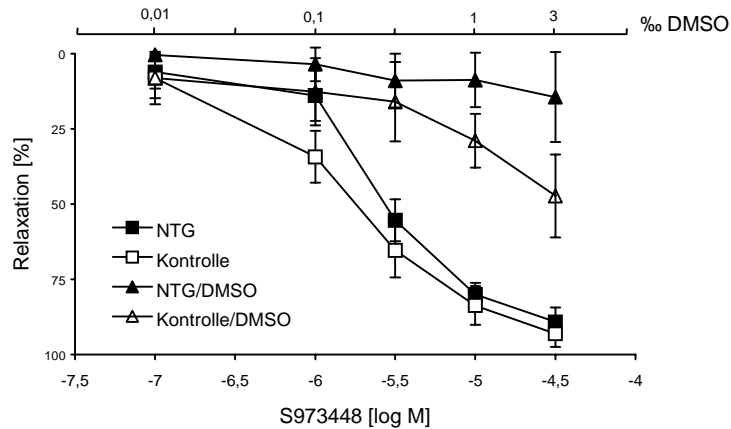
**Abb. 18** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ACh (1 nM - 10  $\mu\text{M}$ ) auf  $\text{K}^+$ -kontrahierte (40 mM) endothelintakte Segmente der A. thoracalis von NTG-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 - 7 Tieren, pro Tier wurden 3 - 6 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  NTG vs. Kontrolle).

Mit diesen Untersuchungen wurde überprüft, ob es durch die dreitägige *in vivo* Vorbehandlung von Ratten mit Nitroglycerol (NTG) zu einer Kreuztoleranz der Aortensegmente gegenüber endothelial gebildetem NO kommt. Aus diesem Grund wurde der endothelabhängige Vasodilatator ACh verwendet. Die Kontraktion der Gefäße fand mit 40 mM kaliumreicher Krebs-Henseleit-Pufferlösung statt, um die

Ausschaltung des endothelialen hyperpolarisierenden Faktors zu gewährleisten und ausschließlich die NO-induzierte Kontraktionshemmung zu erfassen. Die Versuche wurden nach der Methode A durchgeführt. ACh induzierte in beiden Behandlungsgruppen ab einer Konzentration von 100 nM eine Vasorelaxation (Abb. 18). Die  $\text{EC}_{50}$  lag bei den Aortenringen der Kontrollratten bei 213 nM und die maximale Relaxation betrug 44 %. Im Vergleich dazu war die Wirkung von ACh auf die Gefäßsegmente der NTG-behandelten Ratten abgeschwächt. Hier betrug die  $\text{EC}_{50}$  269 nM und die maximal erreichte Relaxation betrug nur 31 % bei 10  $\mu\text{M}$  ACh. Im Bereich 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  war die Antwort der Gefäßsegmente auf den endothelabhängigen Vasodilatator bei den NTG-behandelten Ratten signifikant vermindert.

Mit dieser Versuchsreihe konnte nachgewiesen werden, daß die *in vivo* Behandlung von Ratten mit dem organischen NO-Donor NTG zu einer Kreuztoleranzentwicklung der glatten Gefäßmuskulatur gegenüber dem endothelabhängigen Dilatator ACh führte.

### 3.2.1.4 Akute relaxierende Wirkung von S973448 *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage)

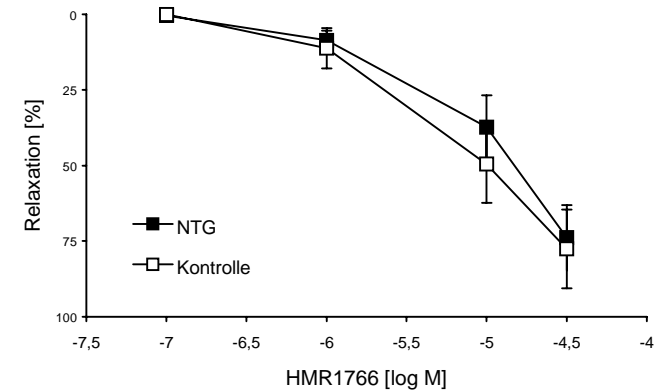


**Abb. 19** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von S973448 (100 nM - 30  $\mu$ M) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,01 – 3 ‰) auf Phenylephrin-kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von NTG-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Tieren, pro Tier wurden 2 - 3 Aortensegmente gleichzeitig untersucht.

Mit dieser Versuchsreihe wurde ermittelt, ob die *in vivo* induzierte Nitratoleranz (Abb. 16) eine Kreuztoleranz gegenüber dem spezifischen Aktivator der Hämoxidierten GC - S973448 - auslöst. Die Versuche wurden wie in Methode A beschrieben durchgeführt. Die S973448-medierte Gefäßrelaxation (100 nM - 30  $\mu$ M) wurde an den Aorten nach Testung der Endothelintegrität und der NO-Sensitivität untersucht. S973448 induzierte eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation (Abb. 19). Die Gefäßsegmente der Kontrollratten zeigten eine  $EC_{50}$  von 2,3  $\mu$ M. Die maximale Relaxation lag bei 89 %. Die Ergebnisse bei den Aortensegmenten der NTG-behandelten Ratten waren ähnlich, hier betrug die  $EC_{50}$  2,8  $\mu$ M und die maximale Relaxation lag wie bei den Kontrollratten bei 89 %. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu erkennen.

Die durch die höchste DMSO-Konzentration (3 ‰) induzierte Relaxation der Aortenringe der Kontrollratten betrug 47 % und die der nitratoleranten Ratten 14 %. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte festgestellt werden, daß die *in vivo* induzierte Nitratoleranz in den Rattenaorten zu keiner Kreuztoleranz gegenüber S973448 führte.

### 3.2.1.5 Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten (3 Tage)



**Abb. 20** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von HMR1766 (100 nM - 30  $\mu$ M) auf Phenylephrin-induzierte Kontraktion (300 nM) endothelintakter Segmente der *A. thoracalis* von NTG-behandelten Ratten (3 Tage) und Kontrollratten. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 Tieren, pro Tier wurden 2 Aortenringe gleichzeitig untersucht.

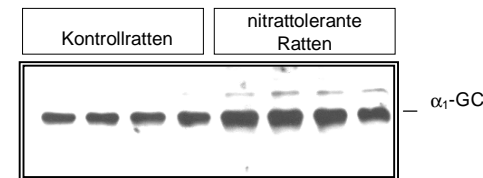
Mit dieser Versuchsserie wurde untersucht, ob es zu einer Kreuztoleranz zwischen dem Aktivator der oxidierten GC, HMR1766, und organischen Nitraten kommt. Die Experimente wurden analog der Methode A - wie unter Abb. 19 beschrieben - durchgeführt. HMR1766 induzierte in beiden Gruppen eine konzentrationsabhängige Relaxation der Gefäße. Ein deutlicher Effekt der Substanz war ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M zu beobachten. Die  $EC_{50}$  lag bei den Gefäßsegmenten der NTG-behandelten Ratten bei 11  $\mu$ M und bei den Segmenten der Kontrollratten bei 6  $\mu$ M. Die maximale Relaxation war bei beiden Gruppen fast identisch. Sie betrug bei

einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  HMR1766 bei den Aortensegmenten der Kontrollratten 78 % und bei den Aortenringen der NTG-behandelten Ratten 74 % (Abb. 20). Im gesamten Verlauf der Konzentrations-Wirkungsbeziehung waren die Unterschiede zwischen den Aortenringen der beiden Gruppen nicht signifikant. Diese Ergebnisse belegen, daß auch bei der akuten Zugabe dieses Aktivators der Hämoxiderten GC HMR1766 - wie bereits bei S973448 gezeigt wurde - keine Kreuztoleranz zu Nitroglycerol nachzuweisen ist.

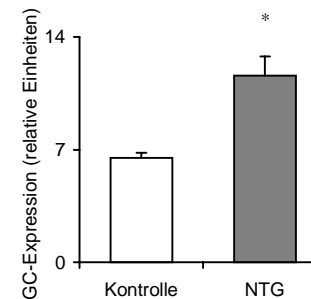
### 3.2.1.6 Western Blot Analyse der Expression der $\alpha_1$ - und der $\beta_1$ -Untereinheit der GC von NTG-behandelten Ratten (3 Tage)

In diesem Experiment wurde untersucht, inwieweit die *in vivo* induzierte Nitrattoleranz zu einer Veränderung der Expression der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC in den Rattenaorten führt. Die Western Blot Analyse erfolgte wie bereits im Methodenteil (Kap.2.2.7) beschrieben. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit und die  $\beta_1$ -Untereinheit der GC wurden jeweils mit polyklonalen IgG-Antikörpern (Kaninchen) und einem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege) detektiert.

a)



b)

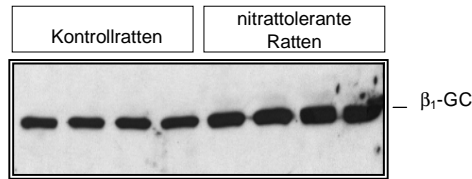


**Abb. 21** Effekt der chronischen Nitroglycerol (NTG) Behandlung auf die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit der GC in Aorten von NTG-toleranten Ratten und Kontrollratten. Jeweils 40  $\mu\text{g}$  Protein des 10000 g Überstandes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die  $\alpha_1$ -Untereinheit der GC detektiert.

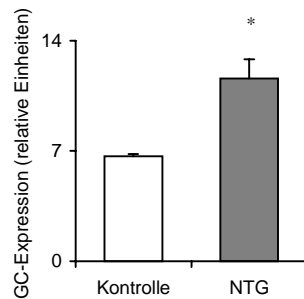
a) Aufnahme des Immunoblots

b) Densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 Tieren (\*  $p < 0,05$  NTG vs. Kontrolle).

a)



b)



**Abb. 22** Effekt der chronischen Nitroglycerol (NTG) Behandlung auf die Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC in Aorten von NTG-toleranten Ratten und Kontrollratten. Jeweils 40  $\mu$ g Protein des 10000 g Überstandes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die  $\beta_1$ -Untereinheit der GC detektiert.

a) Aufnahme des Immunoblots

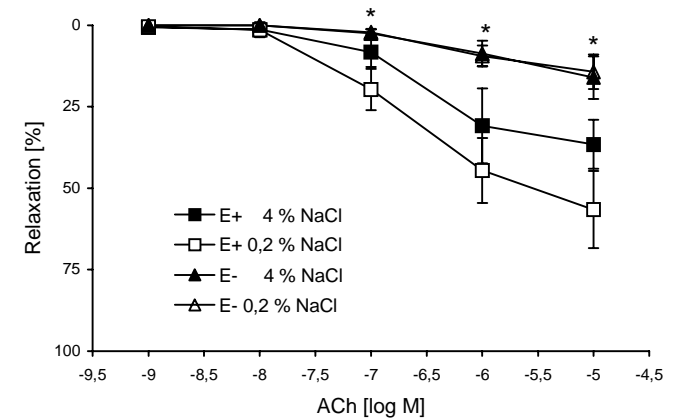
b) Densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 Tieren (\*  $p < 0,05$  NTG vs. Kontrolle).

Die Expression der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC war bei den NTG-toleranten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten signifikant um das ca. 2-fache verstärkt (Abb. 21 und Abb. 22).

### 3.2.2 Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf NO-Sensitivität und Häm-Redox-Zustand der löslichen Guanylylcyclase in Dahl-S-Ratten

Mit dieser Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob es bei Dahl-S-Ratten, die über einen Zeitraum von 10 Wochen mit einer salzreichen Diät (4 % NaCl) gefüttert wurden, zu einer Veränderung der Endothelfunktion und der Sensitivität gegenüber exogen zugeführten Nitraten sowie Aktivatoren der Häm-oxidierten GC kommt. Die Tieren wiesen nach der 10-wöchigen Fütterung einen systolischen arteriellen Blutdruck von 223 mm Hg und eine Herzfrequenz von 428 Schlägen/min auf. Die Kontrollratten erhielten über den gleichen Zeitraum eine Standarddiät (0,2 % NaCl). Diese Tiere wiesen einen systolischen arteriellen Blutdruck von 129 mm Hg und eine Herzfrequenz von 327 Schlägen/min auf. Die Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen wurden von der Fa. Aventis, Frankfurt/M. durchgeführt.

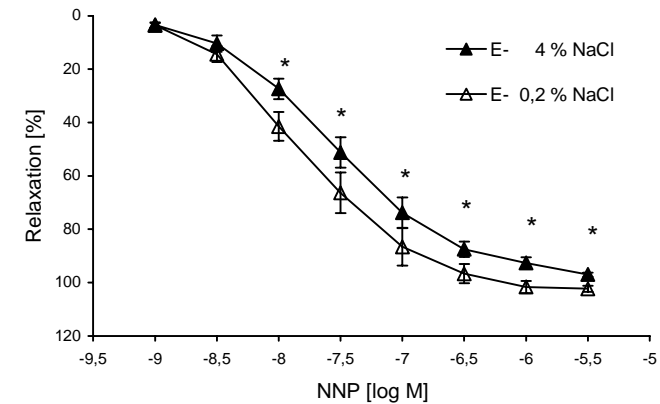
#### 3.2.2.1 Akute relaxierende Wirkung von ACh *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten



**Abb. 23** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Acetylcholin (1 nM - 10  $\mu$ M) auf  $K^+$ -kontrahierte (40 mM) endothelintakte (E+) und deendothelialisierte Segmente (E-) der A. thoracalis von Dahl-S-Ratten, die mit einer salzreichen Diät (4 % NaCl) oder mit einer Standarddiät (0,2 % NaCl) gefüttert wurden. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 - 4 Tieren (\*  $p < 0,05$  E+ 4 % NaCl vs. E+ 0,2 % NaCl).

Mit diesen Versuchen wurde ermittelt, ob sich bei Dahl-S-Ratten mit Salz-induziertem Bluthochdruck die endothelabhängige Relaxation der Aortenringe verändert und ob es zu einer Abnahme der NO-Sensitivität der GC kommt. Aus diesem Grund wurde der endothelabhängige Vasodilatator Acetylcholin (ACh) verwendet. Die Versuche wurden nach der Methode A durchgeführt. Ab einer Konzentration von 100 nM induzierte ACh in allen Aortenringen eine konzentrationsabhängige Relaxation (Abb. 23). Diese war nach Zugabe von 100 nM, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M ACh bei den endothelintakten Aorten der mit salzreicher Diät gefütterten (hypertensiven) Ratten im Vergleich zu den mit Standarddiät gefütterten (normotensiven) Ratten signifikant abgeschwächt. Die maximale Relaxation lag bei den endothelintakten Aorten-segmenten der normotensiven Ratten nach Zugabe von 10  $\mu$ M ACh bei 57 % ( $EC_{50}$  239 nM) und bei den hypertensiven Ratten bei nur 37 % ( $EC_{50}$  288 nM). Bei den deendothelialisierten Aortenringen wurde die halbmaximale Relaxation nach Zugabe von 562 nM ACh bei den normotensiven und 831 nM ACh bei den hypertensiven Ratten erreicht. Die maximale Relaxation war mit 14 % bei den mit Standarddiät gefütterten Ratten und 16 % bei den mit salzreicher Diät gefütterten Ratten fast identisch. Signifikante Unterschiede konnten zwischen diesen beiden Gruppen im gesamten Kurvenverlauf nicht festgestellt werden. Es konnte somit gezeigt werden, daß es durch die Gabe einer salzreichen Diät über 10 Wochen und dem damit verbundenen renalen Bluthochdruck zu einer Abnahme der ACh-induzierten endothelabhängigen Relaxation in Rattenaorten kommt.

### 3.2.2.2 Akute relaxierende Wirkung von NNP *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten



**Abb. 24** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Natriumnitroprussid (1 nM - 3  $\mu$ M) auf Phenylephrin-kontrahierte (300 nM) deendothelialisierte (E-) Segmente der *A. thoracalis* von Dahl-S-Ratten, die mit einer salzreichen Diät (4 % NaCl) oder mit einer Standarddiät (0,2 % NaCl) gefüttert wurden. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 - 4 Tieren, pro Tier wurden 2 - 3 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  E- 4 % NaCl vs. E- 0,2 % NaCl).

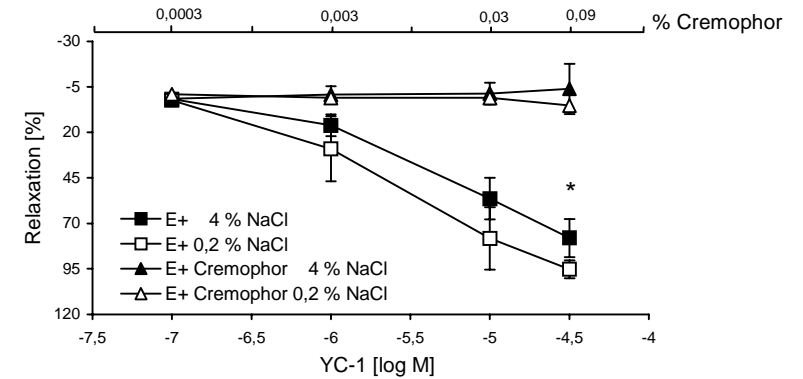
Mit Hilfe dieser Experimente wurde nachgewiesen, daß die Fütterung der salzreichen Diät und der dadurch induzierte renale Bluthochdruck in Dahl-S-Ratten zu einer Veränderung der NO-Sensitivität der Aorten führt. Die Versuche wurden nach der Methode A durchgeführt. Im Anschluß an die kumulative ACh-WK wurden die deendothelialisierten Aortenringe mit 100  $\mu$ M L-NNA inkubiert, um die Ausschaltung der endothelialen NO-Synthase zu gewährleisten. Nach der Kontraktion mit 300 nM PE wurde die vasorelaxierende Antwort auf die Gabe von NNP in ansteigenden Konzentrationen (1 nM - 3  $\mu$ M) gemessen (Abb. 24). Die Aortensegmente der mit Standarddiät gefütterten Dahl-S-Ratten wurden durch 16 nM NNP halbmaximal relaxiert. Die maximale Relaxation (100 %) wurde bei einer NNP-Konzentration von 1  $\mu$ M erreicht. Demgegenüber lag die  $EC_{50}$  bei den Aortenringen der mit salzreicher Diät gefütterten Ratten bei 30 nM NNP. Die maximale Relaxation von 97 % wurde bei diesen Segmenten erst nach der Gabe von 3  $\mu$ M NNP erreicht. Die Aorten der hypertensiven Ratten zeigten somit eine signifikante Rechtsverschiebung der NNP-



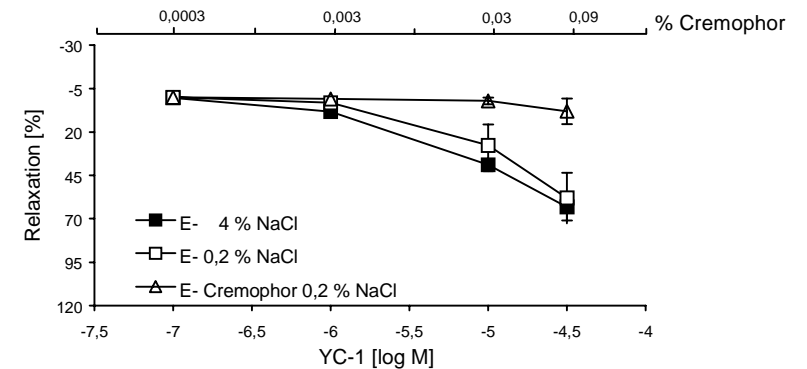
KWK. Die verminderte vasorelaxierende Wirkung von NNP war jedoch nicht so ausgeprägt wie bei ACh (Abb. 23).

Die endothelintakten Aorten beider Gruppen wiesen einen ähnlichen Kurvenverlauf auf wie die in Abb. 24 gezeigten deendothelialisierten Aortenringe. Bei den endothelintakten Gefäßen der normotensiven Ratten betrug die  $EC_{50}$  14 nM, die maximale Relaxation von 100 % wurde nach Zugabe von 1  $\mu$ M NNP erreicht. Die Gefäße der hypertensiven Ratten wiesen eine  $EC_{50}$  von 25 nM auf und die maximale Relaxation von 96 % wurde wie auch bei den deendothelialisierten Segmenten erst nach Zugabe von 3  $\mu$ M erreicht (Daten nicht dargestellt).

### 3.2.2.3 Akute relaxierende Wirkung von YC-1 *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten



a)



b)

**Abb. 25** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von YC-1 (100 nM - 30  $\mu$ M) und Cremophor als Lösungsmittelkontrolle (0,0003 - 0,09 %) auf Phenylephrin-kontrahierte (300 nM) endothelintakte (a) und deendothelialisierte (b) Segmente der A. thoracalis von Dahl-S-Ratten, die mit einer salzreichen Diät (4 % NaCl) oder mit einer Standarddiät (0,2 % NaCl) gefüttert wurden. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 - 3 Tieren, pro Tier wurden 2 - 3 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  E+ 4 % NaCl vs. E+ 0,2 % NaCl).

Mit dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob es bei Dahl-S-Ratten durch die Fütterung einer salzreichen Diät und dem damit verbundenen renalen Bluthochdruck zu einer direkten Störung der Aktivierung der GC - unabhängig von NO - kommt, d.h. ob die Häm-abhängige Aktivität der GC beeinträchtigt wird. Für die Untersuchungen

wurde der direkte, NO-unabhängige GC-Aktivator YC-1 verwendet. Die Versuche wurden wie bereits unter Abb. 24 beschrieben durchgeführt und nach der PE-induzierten Kontraktion wurde die YC-1-Konzentrations-Wirkungsbeziehung (100 nM - 30 µM) aufgenommen. YC-1 induzierte in allen Gefäßringen eine konzentrationsabhängige Relaxation (Abb. 25).

Bei den endothelintakten Gefäßen war die Agonisten-induzierte Kontraktionshemmung der Aorten sowohl bei den mit Standarddiät gefütterten Ratten (normotensive Ratten) als auch bei den mit salzreicher Diät gefütterten Ratten (hypertensive Ratten) ab einer Konzentration von 1 µM YC-1 signifikant (Abb. 25a).

Bei den endothelintakten Aorten der mit Standarddiät gefütterten Ratten lag die  $EC_{50}$  bei 2,9 µM. Die maximale Relaxation von 95 % wurde bei einer Konzentration von 30 µM YC-1 erreicht. Die endothelintakten Aorten der mit salzreicher Diät gefütterten Ratten wiesen eine  $EC_{50}$  von 6 µM und eine maximale Relaxation von nur 78 % auf. Diese Aortenringe zeigten bei einer Konzentration 30 µM eine signifikante Rechtsverschiebung der YC-1-KWK gegenüber den Aorten der normotensiven Ratten. Die YC-1-abhängige Aktivierung der GC war demnach bei den endothelintakten Aorten der hypertensiven Ratten abgeschwächt.

Die deendothelialisierten Gefäße (Abb. 25b) zeigten bei den normotensiven Ratten erst nach Zugabe von 10 µM YC-1 eine signifikante Relaxation, die Gefäße der hypertensiven Tiere relaxierten jedoch wie auch die endothelintakten Ringe schon nach Zugabe von 1 µM YC-1.

Die deendothelialisierten Aortenringe (Abb. 25b) der normotensiven Ratten wurden durch 17 µM YC-1 halbmaximal relaxiert und zeigten eine maximale Relaxation von 67 % bei einer Konzentration von 30 µM YC-1. Bei den deendothelialisierten Aortensegmenten der hypertensiven Ratten war der Verlauf der YC-1-KWK ähnlich. Hier war eine  $EC_{50}$  von 11 µM nachzuweisen und die maximale Relaxation lag bei nur 63 %. Die Unterschiede zwischen den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der deendothelialisierten Aorten waren im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich nicht signifikant.

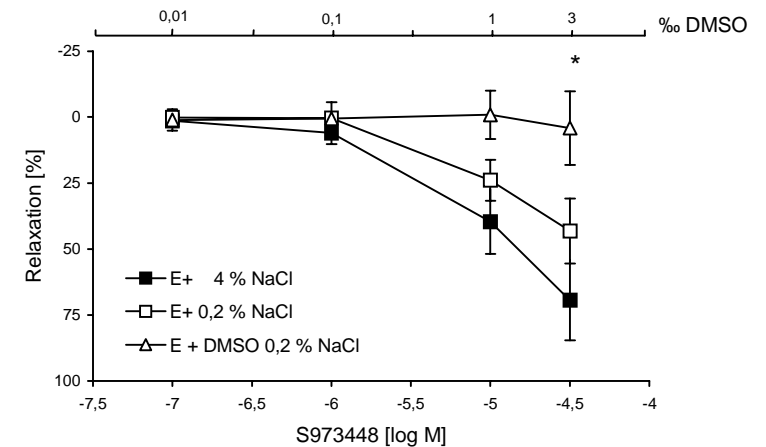
Auffallend war jedoch, daß bei den endothelintakten Aorten der normotensiven Ratten eine signifikante Potenzierung der relaxierenden Wirkung von YC-1 gegenüber den deendothelialisierten Gefäßen festzustellen war (Abb. 25a/b). Dies war bei den endothelintakten Aorten der hypertensiven Ratten nicht in diesem Ausmaß zu beobachten. Die KWK der endothelintakten Segmente war hier

gegenüber den deendothelialisierten Aortenringen zwar signifikant nach links verschoben, jedoch nicht so deutlich wie bei den normotensiven Dahl-S-Ratten. Der Einfluß des Endothels schien somit bei den Aortensegmenten der hypertensiven Ratten weniger stark ausgeprägt zu sein wie bei den Segmenten der normotensiven Ratten.

Das Lösungsmittel Cremophor bewirkte auch in der höchsten applizierten Konzentration von 0,09 % nur einen schwachen Effekt. Wie in Abb. 25a dargestellt, löste er bei den endothelintakten Aorten der normotensiven Ratten eine Relaxation von 5 % und bei den endothelintakten Aorten der hypertensiven Ratten eine schwache Kontraktion von 4 % aus.

In den deendothelialisierten Aorten der mit Standarddiät gefütterten Dahl-S-Ratten (Abb. 25b) verursachte Cremophor eine Relaxation von 8 %.

### 3.2.2.4 Akute relaxierende Wirkung von S973448 *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten



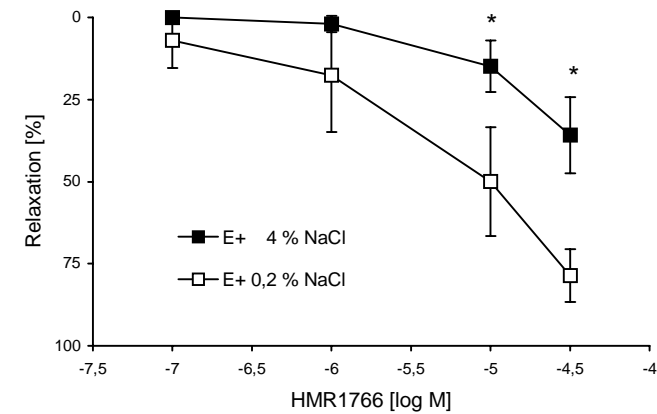
**Abb. 26** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von S973448 (100 nM - 30 µM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,01 - 3 %) auf Phenylephrin-kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der A. thoracalis von Dahl-S-Ratten, die mit einer salzreichen Diät (4 % NaCl) oder mit einer Standarddiät (0,2 % NaCl) gefüttert wurden. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 - 4 Tieren, pro Tier wurden 2 - 3 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  E+ 4 % NaCl vs. E+ 0,2 % NaCl).

In dieser Versuchsserie wurde geklärt, ob es bei den hypertensiven Ratten zu einer Änderung des Redoxgleichgewichtes der löslichen Guanylylcyclase zugunsten der oxidierten Form kommt. Aus diesem Grund wurde als spezifischer Aktivator für die oxidierte Form der GC die Substanz S973448 eingesetzt. Die Versuche wurden wie unter Abb. 24 beschrieben durchgeführt. S973448 induzierte bei beiden Gruppen eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation (Abb. 26), die bei den normotensiven Tieren ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  S973448, bei den hypertensiven Ratten jedoch schon nach der Gabe von 1  $\mu\text{M}$  S973448 signifikant war. Bei den Aorten der normotensiven Ratten lag die  $\text{EC}_{50}$  bei 9,5  $\mu\text{M}$ . Die maximale Relaxation von nur 43 % wurde nach Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  S973448 erreicht. Die Aortenringe der hypertensiven Ratten wiesen hingegen eine  $\text{EC}_{50}$  von 11,4  $\mu\text{M}$  auf, die maximale Relaxation lag bei 69 %. Die Aortensegmente der hypertensiven Ratten reagierten empfindlicher auf S973448 als die Aortensegmente der normotensiven Ratten. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  S973448 signifikant.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß bei den hypertensiven Dahl-S-Ratten die GC zum größeren Teil in der oxidierten Eisen (III)-Form vorliegt als bei den normotensiven Ratten.

Das Lösungsmittel DMSO führte auch in der höchsten Konzentration von 3 ‰ nur zu einer schwachen Relaxation der Gefäßsegmente von 4 %.

### 3.2.2.5 Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten



**Abb. 27** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von HMR1766 (100 nM - 30  $\mu\text{M}$ ) auf Phenylephrin-kontrahierte (300 nM) endothelintakte Segmente der *A. thoracalis* von Dahl-S-Ratten, die mit einer salzreichen Diät (4 % NaCl) oder mit einer Standarddiät (0,2 % NaCl) gefüttert wurden. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 - 4 Tieren, pro Tier wurden 2 - 3 Aortenringe gleichzeitig untersucht (\*  $p < 0,05$  E+ 4 % NaCl vs. E+ 0,2 % NaCl).

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, zu ermitteln, ob der spezifische Aktivator der oxidierten Form der GC HMR1766 - wie S973448 - zu einer verstärkten glattmuskulären Antwort bei Aorten von hypertensiven Ratten führt. Die Versuche wurden nach der Methode A durchgeführt. Die Erstellung der HMR1766-KWK erfolgte im Anschluß an die Überprüfung der NO-Sensitivität. Wie in Abb. 27 dargestellt, führte HMR1766 sowohl bei den normotensiven als auch bei den hypertensiven Dahl-S-Ratten zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation, die bei den Aorten der normotensiven Ratten nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  signifikant war. Diese Gefäße relaxierten bei 6  $\mu\text{M}$  HMR1766 halbmaximal, die maximale Relaxation von 79 % wurde nach Gabe von 30  $\mu\text{M}$  HMR1766 erreicht. Demgegenüber war die Vasorelaxation der Aorten der hypertensiven Ratten erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  HMR1766 signifikant. Die  $\text{EC}_{50}$  lag bei 12  $\mu\text{M}$  und die maximale Relaxation betrug nur 36 %. Die Relaxation der Aortenringe der hypertensiven Ratten war somit

signifikant abgeschwächt und wies im Bereich von 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  eine signifikante Rechtsverschiebung der HMR1766-KWK auf.

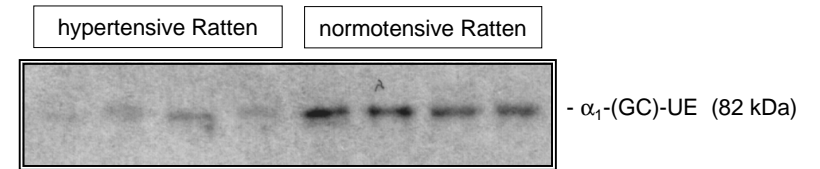
### 3.2.3 Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf die Expression der GC in Dahl-S-Ratten

#### 3.2.3.1 Western Blot Analyse der Expression der $\alpha_1$ - und der $\beta_1$ -Untereinheit der GC in Dahl-S-Ratten

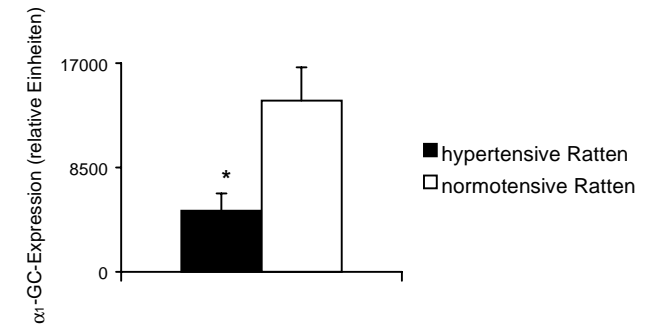
In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Expression der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC in den Proteinextrakten von Aorten der mit salzreicher Diät gefütterten, hypertensiven Dahl-S-Ratten gegenüber den mit Standarddiät gefütterten, normotensiven Dahl-S-Ratten verändert ist. Dies wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse nachgewiesen (Methode Kap. 2.2.7).

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit und die  $\beta_1$ -Untereinheit der GC wurden jeweils mit polyklonalen IgG-Antikörpern (Kaninchen) und einem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege) detektiert.

a)



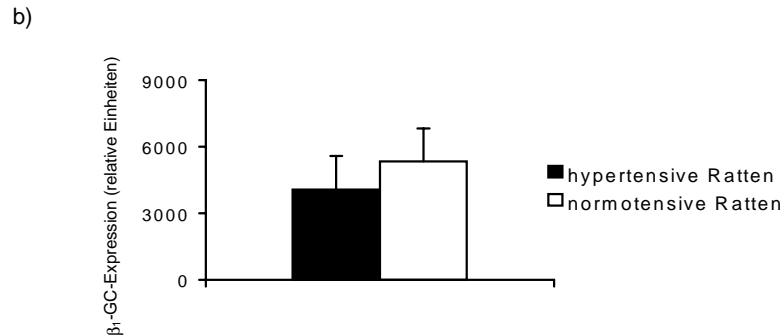
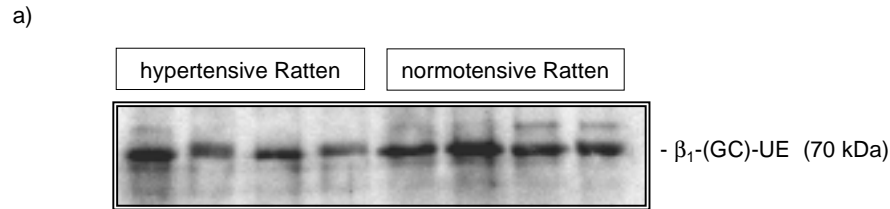
b)



**Abb. 28** Vergleich der  $\alpha_1$ -GC-Expression aus Aortenextrakten der mit salzreicher Diät (4 % NaCl) gefütterten, hypertensiven Ratten gegenüber den mit Standarddiät (0,2 % NaCl) gefütterten, normotensiven Ratten. Jeweils 40  $\mu\text{g}$  Protein des 10000 g Überstandes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die  $\alpha_1$ -Untereinheit der GC detektiert.

a) Immunoblot der  $\alpha_1$ -Untereinheit der GC

b) Densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 Tieren (\*  $p < 0,05$  4 % NaCl vs. 0,2 % NaCl).



**Abb. 29** Vergleich der  $\beta_1$ -GC-Expression aus Aortenextrakten der mit salzreicher Diät (4 % NaCl) gefütterten, hypertensiven Ratten gegenüber den mit Standarddiät (0,2 % NaCl) gefütterten, normotensiven Ratten. Jeweils 40  $\mu$ g Protein des 10000 g Überstandes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die  $\beta_1$ -Untereinheit der GC detektiert.

a) Immunoblot der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC

b) Densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 Tieren.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit der GC der hypertensiven Ratten gegenüber den normotensiven Kontrolltieren um das 2,8-fache signifikant vermindert war.

Die Untersuchung der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC erbrachte jedoch eine nur tendenzielle, nicht signifikante Erniedrigung der Expression bei den hypertensiven Ratten im Vergleich zu den normotensiven Kontrolltieren.

Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden des Röntgenfilmes ergab eine nur 1,3-fache Verminderung der  $\beta_1$ -Expression.

## V Diskussion

Die vaskuläre Dysfunktion tritt bei verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Bluthochdruck, Atherosklerose und Thrombose auf. Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung manifestiert sich diese Störung der Gefäßfunktion in einer Beeinträchtigung der NO-abhängigen Gefäßrelaxation auf endothelabhängige Agonisten und exogene NO-Donoren (Adams *et al.*, 1998; Schachinger & Zeiher, 2000; Mülsch, 2000). Eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der NO-abhängigen Gefäßrelaxation nimmt die lösliche Guanylylcyclase (GC) ein. Es ist zu vermuten, daß es bei der vaskulären Dysfunktion zu einer Störung auf der Ebene dieses wichtigen NO-Rezeptors kommt.

In Tiermodellen mit vaskulärer Dysfunktion wurde eine reduzierte m-RNA- und Proteinexpression (Klöß *et al.*, 2000) und NO-Sensitivität der GC (Robinson *et al.*, 1982) beschrieben. Andererseits wurde eine Steigerung der vaskulären GC-Expression (Bauersachs *et al.*, 1999) oder NO-Sensitivität (Sadoff *et al.*, 1996) bei Tiermodellen mit chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen.

Mit dieser Arbeit wurden folgende Ziele verfolgt:

Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, über welchen Mechanismus die akute Desensitivierung der glattmuskulären GC bei intakter Gefäßfunktion durch endotheliales oder exogenes NO moduliert wird. Es ist bekannt, daß eine akute Hemmung der endothelialen NO-Freisetzung eine höhere Sensitivität der GC gegenüber NO in Rattenaorten verursacht. Der dafür verantwortliche Mechanismus auf molekularer Ebene konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden (Moncada *et al.*, 1991). Papapetropoulos *et al.* (1996) stellten bei Untersuchungen an glatten Gefäßmuskulzellen von Ratten fest, daß nach der Behandlung mit hohen Konzentrationen von exogenem NO möglicherweise die Oxidation des Hämeisens der GC zu einer verminderten NO-Empfindlichkeit führt.

Ergänzend hierzu sollte die akute und chronische Aktivierung der Häm-oxidierten GC analysiert werden. Dies wurde mit Hilfe der neu entwickelten, selektiven Aktivatoren der Eisen (III)-Form der GC S973448 und HMR1766 *in vitro* untersucht.

Weiterhin sollte in entsprechenden Tiermodellen die Entstehung von Toleranzentwicklungen dieser neuartigen Pharmaka charakterisiert werden. Hierbei sollte insbesondere die Fragestellung geklärt werden, ob die Substanzen langfristig

geeignet wären, organische Nitrate in der Behandlung vaskulärer Dysfunktionen zu ersetzen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob in Tiermodellen mit einer Störung der Funktion des glatten Gefäßmuskels die chronische Desensitivierung der GC zu einer Veränderung der NO-Empfindlichkeit, des Oxidationsstatus und der Expression dieses NO-Rezeptor-Proteins führt. In früheren Untersuchungen konnte im Tiermodell der nitrattoleranten Ratte die chronische Desensitivierung der GC (Molina *et al.*, 1987) und eine verminderte Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (Soff *et al.*, 1997) nachgewiesen werden.

Im Hypertoniemodell der genetisch salzsensitiven Dahratte konnten Azam *et al.* (1998) eine verminderte NO-Sensitivität und NO-stimulierte cGMP-Bildung zeigen. Dies läßt darauf schließen, daß eine verminderte GC-Aktivität zur Salzsensitivität beiträgt. Es konnte nachgewiesen werden, daß in Nieren von Dahl-S-Ratten die Expression der  $\beta$ -Untereinheiten der GC verändert ist. Die  $\beta_1$ -Untereinheit ist vermindert, die  $\beta_2$ -Untereinheit ist verstärkt exprimiert (Gupta *et al.*, 1997).

## 5.1 GC-Regulation bei intakter Gefäßfunktion

### 5.1.1 Akute Desensitivierung der glattmuskulären GC gegenüber exogenem NO durch das endotheliale NO

In diesen Versuchen wurde die akute Desensitivierung der löslichen Guanylylcyclase durch das endotheliale NO analysiert. Es wurde untersucht, durch welchen Mechanismus die GC ihre Empfindlichkeit gegenüber NO ändert und ob es sich hierbei um einen direkten NO vermittelten Mechanismus handelt oder ob die Desensitivierung eine Folge der gesteigerten cGMP-Bildung ist.

Zum Nachweis der basalen endothelialen NO-Freisetzung *in vitro* wurden isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Gefäßringen von Rattenaorten durchgeführt. Zunächst wurde festgestellt, unter welchen experimentellen Bedingungen die basale endotheliale NO-Freisetzung den Gefäßtonus am stärksten beeinflusst. Die endotheliale NO-Bildung wurde durch den Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS)  $N^G$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA) unterdrückt und die Rattenaorten

mit dem  $\alpha$ -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin (PE) submaximal kontrahiert. Die so erzielte Tonussteigerung der Aorten diente als Maß für die basale NO-Freisetzung. Initiale Untersuchungen zum Einfluß der basalen NO-Bildung auf die NO-Sensitivität der Gefäßmuskulatur wurden an Aorten von männlichen Ratten durchgeführt, die mit der gleichen PE-Konzentration kontrahiert wurden, unabhängig von ihrem durch Kalium ( $80 \text{ mM K}^+$ )-induzierten maximalen Kontraktionsniveau. Diese Gefäßsegmente wiesen somit keinen einheitlichen Tonus auf. Unter diesen Bedingungen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen L-NNA-behandelten und unbehandelten Gefäßringen bezüglich der NO-Sensitivität nachweisen. Die gefäßrelaxierende Antwort auf den NO-Donor Natriumnitroprussid (NNP) war bei beiden Gruppen gleich. Als mögliche Erklärung wurde in der Literatur einerseits beschrieben, daß bei der basalen NO-Freisetzung erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen (Stallone, 1993; Kauser & Rubanyi, 1994) und andererseits Unterschiede in der basalen endothelialen NO-Bildung nur bei gleichem Tonus der Gefäßsegmente vor der Gabe des NO-Donors nachzuweisen sind und nicht bei gleicher Konzentration des Agonisten Phenylephrin (Moncada *et al.*, 1991). Der gleiche Tonus ist nur durch unterschiedliche PE-Konzentrationen zwischen den mit einem Hemmer der endothelialen NO-Synthase behandelten und unbehandelten Aortenringen zu erreichen (Moncada *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurden männliche und weibliche Ratten verwendet, um die endothelinduzierte Desensitivierung der Rattengefäße bei gleichem Tonus der Aortenringe mit unterschiedlicher PE-Konzentration nachzuweisen.

Die Wirkung der basalen NO-Freisetzung durch das Endothel war bei den weiblichen Tieren abhängig von der PE-Konzentration (30 nM und 50 nM), während dies bei den männlichen Tieren nur hinsichtlich der kontraktiven Potenz, nicht jedoch der Effizienz (Maximaleffekt) von L-NNA der Fall war (Abb. 1a & 1b). Diese Befunde ähneln früheren Untersuchungen von Stallone (1993) in welchen nachgewiesen wurde, daß der NO-Synthase-Inhibitor  $N^G$ -Monomethyl-L-Arginin die Sensitivität und auch die maximale Antwort auf PE bei Aorten von weiblichen Tieren stärker beeinflusst als bei männlichen Ratten. Die Antwort auf PE lag bei den Untersuchungen dieser Autoren bei den weiblichen Tieren um 40 % höher als bei den männlichen Tieren.

Kauser & Rubanyi (1994) konnten Geschlechtsunterschiede bei der Bildung von endothelialelem NO feststellen. Sie wiesen in Organbadversuchen nach, daß das Endothel die Kontraktion von isolierten Aorten auf Serotonin (100 nM – 10  $\mu\text{M}$ ) und

Phenylephrin (1 nM – 10 µM) in weiblichen Ratten signifikant stärker vermindert als in männlichen Ratten. Die endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin (1 nM – 10 µM) war bei den weiblichen Ratten größer als bei den männlichen Ratten.

Wir konnten jedoch in unseren Untersuchungen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in Bezug auf die Gesamtmenge des basal freigesetzten NO nachweisen (maximale Kontraktion der männlichen Ratten 30 %, der weiblichen Ratten 35 %).

Für die nachfolgenden Versuche wurden 30 nM PE bzw. 50 nM PE und 30 µM L-NNA verwendet (Abb. 2). Hierbei wurde der Einfluß von basal freigesetztem endothelialen NO auf die Sensitivität der Aorten gegenüber dem exogenen NO-Donor Natriumnitroprussid (NNP) analysiert. Die maximale Relaxation von 100 % wurde bei einer NNP-Konzentration von 30 nM erreicht. Sowohl bei der männlichen als auch bei der weiblichen Ratte bewirkte die Hemmung der NO-Synthase eine Zunahme der NO-Sensitivität. Die NNP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte eine deutliche Linksverschiebung, d.h. die eNOS-gehemmten Segmente relaxierten auf den NO-Donor deutlich stärker als die unbehandelten Kontrollen. Es konnte demnach eine Desensitivierung des glatten Gefäßmuskels der Rattenaorta gegenüber der relaxierenden Wirkung von NNP nachgewiesen werden. Dies erfolgte aufgrund der basalen endothelialen NO-Freisetzung. Es wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt.

#### 5.1.2 Akute Desensitivierung der GC durch exogene NO-Donoren

Um zu überprüfen, ob es sich bei der endothelabhängigen Desensitivierung der Aorten gegenüber der NNP-induzierten Relaxation um einen NO-medierten Prozeß handelt, oder ob ein anderer endothelvermittelter Mechanismus zugrunde liegt, wurden die Rattenaortensegmente nach Ausschaltung der endothelialen NO-Synthase durch L-NNA mit exogenem NO inkubiert, um die endogene NO-Bildung zu substituieren.

Die eNOS-gehemmten Aortensegmente zeigten eine Verstärkung der vasokonstriktorischen Potenz von PE. Sie benötigten weniger PE (30 - 90 nM) als die Kontrollen (70 - 200 nM), um den gleichen Tonus zu erreichen. Durch den exogenen NO-Donor Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>) wurde die vasokonstriktorische Potenz von PE

herabgesetzt. Je nach Konzentration (30 µM oder 70 µM) des zugesetzten NaNO<sub>2</sub> mußte die Konzentration des PE gesteigert werden, um den gleichen Gefäßtonus zu induzieren (80 % der K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktion).

30 µM Natriumnitrit bewirkten noch keine deutliche Verschiebung der NNP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve, jedoch führte die Gabe von 70 µM Natriumnitrit zur vollständigen Aufhebung der durch den eNOS-Hemmer bewirkten NO-Sensitivierung des Gefäßmuskels (Abb. 3). Durch 70 µM Natriumnitrit wurde offensichtlich die basale endotheliale NO-Freisetzung vollständig substituiert.

Es konnte somit gezeigt werden, daß exogen zugeführtes NO (Natriumnitrit) die glatte Gefäßmuskulatur der Ratte gegenüber der relaxierenden Wirkung von NNP in gleichem Maße desensitiviert wie endogen gebildetes NO.

#### 5.1.3 Einfluß des Atrialen Natriuretischen Faktors auf die Desensitivierung der GC

Um zu überprüfen, ob die durch endotheliales und exogenes NO induzierte Desensitivierung der GC auf einem cGMP-vermittelten Mechanismus beruht, wurden die Aorten mit dem Atrialen Natriuretischen Faktor (ANF) inkubiert, um unabhängig von NO über die Aktivierung der partikulären GC die cGMP-Bildung zu steigern (Murad *et al.*, 1987). Die Relaxation der Aortenringe auf NNP war bei den mit ANF- und L-NNA-behandelten Ringen im Vergleich zu den ausschließlich mit L-NNA-behandelten Aorten signifikant herabgesetzt (Abb. 4). Dieser Befund zeigt, daß ANF in Rattenaorten mit blockierter endogener NO-Synthase zur Desensitivierung gegenüber der NNP-induzierten Vasorelaxation führt.

Bellamy *et al.* (2000) zeigten, daß die GC in zerebellären Zellen *in situ* nach NO-Stimulation innerhalb von Sekunden desensitiviert wird. Nach einigen Minuten verschwand dieser Effekt wieder.

Ferrero *et al.* (2000) fanden in chromaffinen Zellen aus der Nebenniere von Rindern, daß ein intrazellulärer Anstieg von cGMP und die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (PKG) zu einer Hemmung der NNP-stimulierten cGMP-Bildung führen. Andererseits konnten diese Autoren zeigen, daß eine Hemmung der PKG eine höhere NNP-induzierte cGMP-Akkumulation bewirkt. Die Autoren vermuten daher, daß die NO-Sensitivität der GC durch PKG-abhängige Phosphorylierung an

einem Serinrest der  $\beta$ -Untereinheit der GC reguliert werden kann. Ob dieser Mechanismus, wie er für andere PKG-Substrate gezeigt wurde (Lincoln & Cornwell, 1993; Francis & Corbin, 1994), auch für die GC zutrifft, bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine cGMP-abhängige Phosphorylierung der GC zur Regulation der NO-Sensitivität würde mit unseren Befunden zur Desensitivierung der GC durch EDRF, Natriumnitrit und ANF übereinstimmen.

#### 5.1.4 Akute Aktivierung der GC durch Aktivatoren der Häm-oxidierten GC

Für diese Untersuchungen wurden die Leitsubstanz der neu entwickelten schwefelsubstituierten Sulfonylamino-carbonsäure-N-arylamide - S973448 - verwendet. S973448 ist ein Aktivator der Häm-oxidierten GC. Es handelt sich um eine Substanz, die selektiv die Eisen (III)-Form der GC aktiviert und über eine Steigerung der cGMP-Bildung zu einer Gefäßrelaxation führt (Jannek, Dissertation in Vorbereitung). Sie ist aus diesem Grund geeignet, den Einfluß von endogenem NO auf den Oxidationszustand des Hämeisens der GC und mögliche Verschiebungen im Verhältnis der Redoxformen der GC zueinander nachzuweisen.

Um die vermutete Oxidation der GC durch endotheliales NO zu verhindern, wurde ein Teil der Aortenringe 30 min mit 30  $\mu$ M L-NNA inkubiert. Diese Gefäßstücke zeigten im Vergleich zu den Kontrollen (78 %) jedoch eine verstärkte maximale Relaxation (88 %) auf S973448 (Abb. 5).

Dies läßt darauf schließen, daß die GC nicht durch das endothelial gebildete NO oxidiert wird. Die Oxidation der GC hätte bei den mit dem eNOS-Inhibitor behandelten Segmenten zu einer schwächeren Relaxation durch den Aktivator der Häm-oxidierten GC führen müssen. Es konnte demnach kein Hinweis auf eine mögliche Desensitivierung der GC durch eine Verschiebung im Verhältnis der Redoxformen gefunden werden. Im Gegenteil: die Hemmung des endothelialen NO führte zu einer schwachen, aber signifikanten Steigerung der gefäßrelaxierenden Potenz des neuartigen NO-unabhängigen Aktivators der GC.

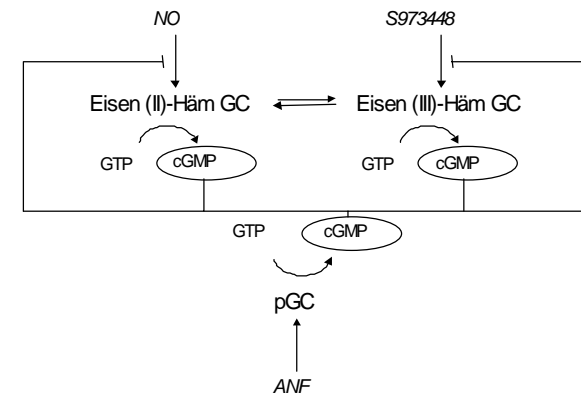
Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die akute Desensitivierung der GC durch physiologische Konzentrationen von NO nicht auf einer Oxidation des GC Hämeisens beruht.

Dieser Befund deckt sich auch mit unseren Beobachtungen, daß eine gesteigerte cGMP-Bildung die NO-Sensitivität der GC herabsetzt. Offenbar wird durch NO bzw. cGMP die GC-Aktivierung unabhängig von der Art des Aktivierungsmechanismus akut gehemmt (Abb. 30).

Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) bewirkte in einer Konzentration von 3 % bei den unbehandelten Kontrollen eine maximale Relaxation von 16 % und bei den L-NNA-behandelten Aorten von 27 %.

DMSO ist ein Antioxidans, welches frei durch biologische Membranen diffundieren kann. Es wird sowohl als transmembranes Trägermolekül als auch, wie in unseren Untersuchungen, als Lösungsmittel für Pharmaka verwendet (Jacob & Herschler, 1986). Bereits Sams *et al.* konnten 1966 zeigen, daß DMSO die kontraktile Eigenschaften des isolierten Diaphragmas aus Meerschweinchen herabsetzt. In neueren Untersuchungen konnten Reid & Moody (1994) an isolierten Muskelbündeln aus dem Diaphragma von Sprague-Dawley-Ratten nachweisen, daß DMSO eine direkte Hemmung der Kontraktilität der Myozyten bewirkt.

Mit S973448 konnten wir jedoch eine deutlich über den Lösungsmittelleffekt des DMSO hinausgehende relaxierende Wirkung nachweisen (Abb. 5).



**Abb. 30** cGMP desensitiviert die Eisen (II)-Häm GC sowie die Eisen (III)-Häm GC und blockiert auf diese Weise die Aktivierung der beiden GC-Formen durch NO und S973448.



### 5.1.5 Chronische Aktivierung der GC durch Aktivatoren der Häm-oxidierten GC

In dieser Arbeit wurde erstmals die chronische Wirkung von neuartigen Aktivatoren der Häm-oxidierten GC an Rattenaorten *in vivo* untersucht. Neben der Leitsubstanz S973448 wurde die daraus neu entwickelte chemisch etwas abgewandelte Verbindung HMR1766 verwendet. Diese Substanzen haben einen spiegelbildlichen Wirkungsmechanismus im Vergleich zu NO. Sie aktivieren im Gegensatz zu NO nicht die Eisen (II)-Form der GC sondern die Eisen (III)-Form und führen über die Aktivierung der GC zu einer Gefäßrelaxation (Jannek, Dissertation in Vorbereitung). Zur pharmakologischen Stimulation der GC wurden bisher fast ausschließlich Verbindungen verwendet, deren Wirkung auf einer intermediären NO-Freisetzung beruht, wie beispielsweise organische Nitrate. Der Nachteil dieser Pharmaka liegt in der Toleranzentwicklung (Wirkungsabschwächung) bei chronischer Anwendung und der deshalb erforderlichen höheren bzw. intermittierenden Dosierung (Abrams, 1988; Elkayam, 1991). Da S973448 und HMR1766 eine starke Aktivierung der Häm-oxidierten, NO-insensitiven GC bewirken, könnten sie zur Therapie von Krankheiten geeignet sein, die mit einer verminderten NO-Wirkung und einem erniedrigten cGMP-Spiegel verbunden sind, wie z. B. die endotheliale Dysfunktion bei Atherosklerose und Bluthochdruck. Langfristig könnten diese neu entwickelten Pharmaka organische Nitrate ersetzen.

Weiterhin können sie nicht nur als Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin, sondern auch als wissenschaftliches Hilfsmittel eingesetzt werden, um den Oxidationszustand des Hämeisens der GC in Zellhomogenaten, intakten Zellen und Geweben und im lebenden Organismus - wie in unseren Untersuchungen - anzuzeigen.

Mit Hilfe der Versuche sollte ermittelt werden, ob es nach der chronischen Exposition der Ratten mit S973448 und HMR1766 zu einer Wirkungsabschwächung dieser Substanzen (Eigentoleranz) oder von organischen Nitraten sowie endogenem NO (Kreuztoleranz) kommt.

### 5.1.5.1 Akute relaxierende Wirkung von S973448, ACh und NTG *in vitro* auf Aorten von S973448-behandelten Ratten (3 Tage)

Die dreitägige Applikation von S973448 führte an den Rattenaorten *in vitro* zu keiner Wirkungsabschwächung (Eigentoleranz) dieser Substanz. Im Gegenteil: es war im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollratten nach der akuten Zugabe von 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M S973448 eine Verstärkung der glattmuskulären Gefäßrelaxation zu beobachten (Abb. 6).

Auch die akute relaxierende Wirkung des endothelabhängigen Vasodilatators ACh war durch die Behandlung mit S973448 nicht abgeschwächt. Sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Aortensegmente zeigten eine  $EC_{50}$  von ca. 100 nM ACh. Die maximale Relaxation lag bei den unbehandelten Aorten bei 38 %, die der behandelten Gefäße bei 42 %. Es war demnach keine Kreuztoleranz gegenüber endogenem NO nachzuweisen (Abb. 7).

Die Versuche zur Ermittlung einer Kreuztoleranz gegenüber exogenem NO in Form von organischen Nitraten wurden mit NTG durchgeführt. Es zeigten sich bei den isometrischen Kontraktionsmessungen bei beiden Gruppen fast identische Befunde (Abb. 8). Der Verlauf der KWK war annähernd deckungsgleich. Die maximale Antwort nach der Zugabe von 10  $\mu$ M NTG betrug bei den Aortenringen der Kontrollratten 87 % ( $EC_{50}$  130 nM) und bei den Aortenringen der S973448-behandelten Ratten 89 % ( $EC_{50}$  104 nM). Es konnte somit keine Kreuztoleranz der Aorten von S973448-behandelten Ratten gegenüber NTG nachgewiesen werden.

Diese Befunde lassen die Schlußfolgerung zu, daß eine dreitägige chronische Stimulation der Häm-oxidierten GC die Sensitivität dieser Redoxform der GC im Gefäßmuskel gegenüber einer akuten Stimulation mit der gleichen Substanzgruppe nicht beeinträchtigt.

Weiterhin zeigt die unveränderte Sensitivität der vaskulären GC auf exogene NO-Donoren, daß der Redoxstatus der Häm-haltigen GC durch eine chronische Aktivierung der oxidierten Form nicht verändert wird. Der Anteil der NO-sensitiven Eisen (II)-Form der GC bleibt erhalten.

Durch die chronische Anwendung von Aktivatoren der Eisen (III)-Form der GC wird die endogene, endotheliale NO-Bildung und Bioverfügbarkeit nicht beeinträchtigt. Dies wird an der unveränderten Relaxation der isolierten Rattenaorten auf die akute Gabe von ACh deutlich. In den meisten Blutgefäßen wirkt ACh als ein klassischer

muskarinerges Agonist der endothelabhängigen Relaxation (Furchgott & Zawadzki, 1980; Lüscher & Vanhoutte, 1991). Indirekt ergibt sich hieraus die Folgerung, daß die chronische dreitägige Aktivierung der Eisen (III)-Form der GC nicht zur Induktion einer vermehrten vaskulären Superoxidbildung führt, wie dies z. B. bei organischen Nitraten der Fall ist (Münzel *et al.*, 1995).

Insgesamt besitzen die Aktivoren der Eisen (III)-Form der GC wesentliche Vorteile gegenüber den NO-Donoren.

#### 5.1.5.2 Akute relaxierende Wirkung von HMR1766, ACh und NTG *in vitro* auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (3 Tage)

Die Experimente mit der Substanz HMR1766 führten zu annähernd gleichen Ergebnissen wie die Untersuchungen mit der Leitsubstanz S973448.

Wie in Abb. 9 dargestellt, konnte nach dreitägiger Applikation von HMR1766 an den Rattenaorten *in vitro* keine Wirkungsabschwächung (Eigentoleranz) gegenüber dieser Substanz nachgewiesen werden. Die akute relaxierende Wirkung des selektiven Aktivators der Häm-oxidierten GC lag sowohl bei den Hydroxyethylcellulose- als auch bei den HMR1766-behandelten Aorten nach der Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  bei 75 %. Die halbmaximale Gefäßrelaxation lag bei beiden Gruppen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 11  $\mu\text{M}$  HMR1766.

Wir konnten mit diesen Befunden zeigen, daß die Aktivität der Eisen (III)-Form der GC im Gefäßmuskel der Ratten nicht verändert ist.

Die akute relaxierende Wirkung des endothelabhängigen Vasodilatators ACh war durch die Behandlung der Ratten mit HMR1766 im Vergleich zu den Kontrollen nicht abgeschwächt (Abb. 10). Im gesamten Verlauf der KWK war zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die maximale Antwort von 49 % bzw. 52 % wurde nach der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ACh erreicht. Die dreitägige Behandlung mit HMR1766 *in vivo* führte somit zu keiner Kreuztoleranz gegenüber endogenem NO.

Mit diesen Ergebnissen konnte, wie auch bei S973448, gezeigt werden, daß die chronische Anwendung von Aktivoren der Eisen (III)-Form der GC die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und die NO-Bioverfügbarkeit nicht beeinflussen.

Die Versuche zur Ermittlung einer Kreuztoleranz gegenüber exogenem NO in Form von organischen Nitraten wurden ebenfalls mit NTG durchgeführt. Auch hier war der Verlauf der KWK der beiden Tiergruppen annähernd deckungsgleich. Die maximale Antwort nach der Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  NTG betrug bei den Aortenringen der Kontrollratten 96 % ( $\text{EC}_{50}$  160 nM) und bei den Aortensegmenten der S973448-behandelten Ratten 97 % ( $\text{EC}_{50}$  130 nM). Somit konnte keine Kreuztoleranz der HMR1766-behandelten Aortenringe gegenüber NTG nachgewiesen werden. Hieraus ist zu schließen, daß die NO-Sensitivität der vaskulären GC durch die chronische Aktivierung der Eisen (III)-Form der GC nicht verändert wurde. Das Verhältnis und die Aktivität der Eisen (II)-Form gegenüber der Eisen (III)-Form blieben konstant.

#### 5.1.5.3 Akute relaxierende Wirkung von HMR1766, ACh und NTG *in vitro* auf Aorten von HMR1766-behandelten Ratten (4 Wochen)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß einer noch längeren chronischen Stimulation der Häm-oxidierten GC auf das Verhältnis der Redoxform der GC und die NO-Bioverfügbarkeit untersucht.

Wie nach Überprüfung der Eigentoleranz nach drei Tagen war auch hier nach vier Wochen Vorbehandlung mit HMR1766 keine Wirkungsabschwächung (Eigentoleranzentwicklung) zu beobachten (Abb. 12). Die Kurven verliefen deckungsgleich zu den KWK der Aortenringe der drei Tage HMR1766-behandelten Ratten (Abb. 9). HMR1766 zeigte bei beiden Gruppen eine gleich potente ( $\text{EC}_{50}$  12  $\mu\text{M}$  HMR1766) und effiziente Wirkung (maximale Antwort 75 %).

Die durch DMSO-induzierte Gefäßrelaxation betrug bei einer Konzentration von 3 % 26 %. Obwohl DMSO diese vasorelaxierende Eigenschaften aufwies, konnten wir die Wirksamkeit der Substanz HMR1766 zeigen (Abb. 12).

Die Sensitivität gegenüber endogenem NO war ebenfalls nicht abgeschwächt. Die ACh-induzierte endothelabhängige Kontraktionshemmung lag bei beiden Gruppen bei 54 %. Auch die  $\text{EC}_{50}$  war mit 130 nM ACh bei den Hydroxyethylcellulose-behandelten Aorten und 170 nM ACh bei den HMR1766-behandelten Gefäßen nur geringfügig verändert (Abb. 13).

Wie in Abb. 14 dargestellt, konnte eine Kreuztoleranz gegenüber NTG nicht festgestellt werden. Die Vasorelaxation war sogar ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  des NO-Donors NTG verbessert im Vergleich zu den Kontrollaorten.

Insgesamt wurde die endotheliale NO-Bildung, die Bioverfügbarkeit und Wirkung von NO auf die glattmuskuläre GC durch die vierwöchige Aktivierung der Häm-oxidierten GC *in vivo* genauso wenig beeinflusst wie durch die dreitägige Aktivierung. Da auch die Aktivität der Eisen (III)-Form der GC nicht vermindert wurde, blieb das Verhältnis und die Aktivierbarkeit beider GC-Redoxformen unverändert.

#### 5.1.5.4 GC-Expression in HMR1766-behandelten Rattenaorten (4 Wochen)

Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurde untersucht, inwieweit die Behandlung von Ratten mit dem Aktivator der Häm-oxidierten GC HMR1766 über einen Zeitraum von vier Wochen zu einer Veränderung der Expression der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten der GC in den Rattenaorten führt.

Die Proteinexpression der beiden Untereinheiten der GC war bei den Aortenextrakten der HMR1766-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten nicht signifikant verändert. Es konnte jedoch ein tendenzieller Anstieg der GC-Expression bei den mit HMR1766-behandelten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 15).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die neuen, selektiven Aktivatoren der Häm-oxidierten GC nicht die Nachteile der NO-Donoren zeigen. Sie bewirken weder eine akute noch eine chronische Desensitivierung der GC. Auch induzieren sie keine Eigentoleranz und keine Kreuztoleranz zu endogenem oder exogenem NO. S973448 und HMR1766 scheinen zu keiner Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und damit zu keiner Induktion der Superoxidbildung zu führen (Kap. 5.2). Sie sollten daher günstigere therapeutische Eigenschaften als die organischen Nitrate besitzen und können möglicherweise therapeutisch bei vaskulären Dysfunktionen eingesetzt werden.

## 5.2 GC-Regulation bei vaskulären Störungen

Zur Untersuchung der chronischen GC-Desensitivierung bei vaskulären Störungen wurden zwei verschiedene Tiermodelle gewählt. Zum einen das Tiermodell der nitrattoleranten Ratte (Molina *et al.*, 1987), in welchem die endotheliale Dysfunktion vermutlich durch eine gesteigerte Superoxidbildung verursacht wird (Münzel *et al.*, 1995) und zum anderen das Modell der Salz-induzierten renalen Hypertonie bei Dahl-S-Ratten, die aufgrund eines Gendefektes nach Gabe einer salzreichen Diät einen Bluthochdruck entwickeln (Dahl *et al.*, 1962). Hierbei führt die Hypertonie zu einer Endothelschädigung (Lüscher *et al.*, 1987a & b).

Wir analysierten den Einfluß von Nitrattoleranz und Salz-induziertem Bluthochdruck auf die NO-abhängige und NO-unabhängige GC-Aktivität und glattmuskuläre Relaxation sowie GC-Expression.

### 5.2.1 Einfluß von Nitrattoleranz auf NO-Sensitivität, Häm-Redox-Zustand und GC-Expression

Im Tiermodell der nitrattoleranten Ratte wurde durch eine dreitägige Nitroglycerol (NTG)-Applikation mit Hilfe von osmotischen Minipumpen (NTG-Freisetzung 1 mg/h) die Nitrattoleranz *in vivo*, d.h. die vaskuläre Dysfunktion pharmakologisch induziert. Die Kontrollratten bekamen Minipumpen, die nur mit dem Lösungsmittel Ethanol 98 % gefüllt waren, implantiert. Nach drei Tagen wurden die thorakalen Aorten entnommen und die isometrischen Kontraktionsmessungen im Organbad und die Western Blot Analysen durchgeführt.

#### 5.2.1.1 Akute relaxierende Wirkung von NTG *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten

Zunächst wurde nachgewiesen, daß die Aortensegmente tatsächlich eine Toleranz gegenüber dem akut applizierten NO-Donor NTG zeigen. Münzel *et al.* (1997) beschrieben, daß bei Patienten bereits nach 24 Stunden kontinuierlicher

Nitratinfusion ein Verlust der hämodynamischen Wirkung von organischen Nitraten als unerwünschte klinische Nebenwirkung zu beobachten ist.

Wie in Abb. 16 dargestellt, lag die  $EC_{50}$  der Aortenringe der nicht-toleranten Kontrollratten bei 9,3 nM NTG. Demgegenüber wiesen die Aorten der nitratoleranten Ratten eine  $EC_{50}$  von 13 nM auf und zeigten somit eine signifikante Verminderung der vasodilatatorischen Potenz des NO-Donors. Auch die maximale Relaxation durch 100 nM NTG war bei den toleranten Aorten gegenüber den Kontrollaorten signifikant vermindert (71 % vs. 81 %). Aufgrund dieser Befunde konnte eine NTG-Toleranz in den Aorten der NTG-behandelten Ratten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen von Molina *et al.* (1987) und Münzel *et al.* (1995) überein. Sie konnten zeigen, daß die Behandlung von Ratten und Kaninchen mit NTG zu einer deutlichen Verminderung der gefäßrelaxierenden Potenz von NTG wie auch von anderen NO freisetzenden Agonisten führt. Die *in vivo* Toleranz ist mit einem verminderten basalen und NO-induzierten cGMP-Spiegel in den Gefäßen verbunden, woraus Molina *et al.* (1987) schließen, daß die GC in glatten Gefäßmuskelzellen durch die chronische Applikation von NTG desensitiviert wird. Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, daß die chronische NTG-Behandlung die Superoxidbildung in den Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen verstärkt. Die mechanische Entfernung des Endothels wie auch die Behandlung der Zellen mit Superoxiddismutase bewirken eine Verstärkung der NTG-induzierten Relaxation in tolerantem Gewebe (Münzel *et al.*, 1995 & 2000). Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß sowohl die endotheliale als auch die glattmuskuläre Superoxidbildung für die Nitratoleranz verantwortlich sind.

#### 5.2.1.2 Akute relaxierende Wirkung von NNP *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten

Ein Phänomen, welches eng mit der Nitratoleranz verbunden ist, ist die Kreuztoleranz von NTG gegenüber anderen Nitrovasodilatoren (NNP) und endothelabhängigen Gefäßdilatoren. Neben einer eingeschränkten NO-Bioverfügbarkeit durch Superoxid (Münzel *et al.*, 1995) werden verschiedene andere Ursachen dieser Kreuztoleranzentstehung diskutiert. Zum einen kann sie durch eine veränderte Aktivität der GC hervorgerufen werden, zum anderen ist ein Anstieg der

Aktivität von cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen eine mögliche Erklärung (Molina *et al.*, 1987; Axelsson & Anderson, 1983).

Wir untersuchten, ob es bei Toleranz gegenüber organischen Nitraten gleichzeitig zu einer Wirkungsabschwächung gegenüber anorganischen NO-Donoren wie Natriumnitroprussid (NNP) kommt (Kreuztoleranz). Wir konnten einen signifikanten Wirkungsverlust des NNP im Konzentrationsbereich von 3 nM bis 30 nM nachweisen ( $EC_{50}$  33 nM tolerante Ratten vs. 17 nM Kontrollratten). Bei höheren NNP-Konzentrationen konnte keine verminderte Ansprechbarkeit der Aorten der nitratoleranten Ratten gegenüber den Kontrollaorten beobachtet werden (Abb. 17).

Diese Befunde decken sich mit den Untersuchungen von Molina *et al.* (1987). Sie fanden heraus, daß die thorakalen Aorten von NTG-behandelten Ratten um das 750-fache weniger sensitiv gegenüber der relaxierenden Wirkung von NTG waren als die Aorten von Kontrollratten. Jedoch wiesen dieselben Aorten eine nur 3-fach verminderte Sensitivität gegenüber der kontraktionshemmenden Wirkung von NNP auf. Die Eigentoleranz ist demnach bei Aorten von NTG-behandelten Ratten wesentlich stärker ausgeprägt als die Kreuztoleranz gegenüber NNP. Wir konnten dies in unseren Untersuchungen bestätigen, indem wir eine schwache Kreuztoleranz nachweisen konnten (Zunahme der  $EC_{50}$  um das ca. 2-fache).

#### 5.2.1.3 Akute relaxierende Wirkung von ACh *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten

Um zu überprüfen, ob es durch die dreitägige *in vivo* Vorbehandlung von Ratten mit NTG zu einer Kreuztoleranz der Aortenringe gegenüber endothelial gebildetem NO kommt, wurde die akute relaxierende Wirkung des endothelabhängigen Vasodilators Acetylcholin (ACh) untersucht. Wie in Abb. 18 dargestellt, zeigten die NTG-behandelten Rattenaorten ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine signifikant verminderte Relaxation im Vergleich zu den nicht-toleranten Kontrollaorten. Die maximale Kontraktionshemmung lag bei den Kontrollringen bei 44 % und bei den toleranten Gefäßringen bei nur 31 %.

Übereinstimmend zu diesen Befunden konnte sowohl im Tiermodell der nitratoleranten Ratte als auch in klinischen Studien gezeigt werden, daß sich die NTG-Behandlung negativ auf die Endothelfunktion auswirkt und es zur Entstehung

einer Kreuztoleranz gegenüber endothelabhängigen Vasodilatoren wie Acetylcholin und Kalzium Ionophor kommt (Caramori *et al.*, 1998; Münzel *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1987).

#### 5.2.1.4 Akute relaxierende Wirkung von S973448 und HMR1766 *in vitro* auf Aorten von NTG-behandelten Ratten

Wie bereits beschrieben (Kap. 5.1.5) wurden die neu entwickelten Aktivatoren der Häm-oxidierten GC - S973448 und HMR1766 - im Tiermodell auf eine mögliche Kreuztoleranz gegenüber organischen Nitraten (NTG) analysiert. Es konnte keine Toleranzentwicklung gegenüber NTG durch diese Substanzen induziert werden.

Im Tiermodell der nitrattoleranten Ratte untersuchten wir, ob die *in vivo* induzierte Nitrattoleranz eine Kreuztoleranz gegenüber den selektiven Aktivatoren der Eisen (III)-Form der GC hervorruft.

Wir kamen zu dem Ergebnis, daß die Nitrattoleranz in den Rattenaorten zu keiner Kreuztoleranz gegenüber den beiden Substanzen führt (Abb. 19 und Abb. 20). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der kontraktionshemmenden Wirkung von S973448 und HMR1766 festgestellt werden. Im Gegenteil: der Verlauf der KWK beider Aktivatoren war bei den Kontrollratten und den NTG-behandelten Ratten fast identisch. Die maximale Wirkung betrug bei einer Konzentration von 30 µM S973448 in beiden Gruppen 89 %. Nach der Zugabe von 30 µM HMR1766 betrug die maximale Gefäßrelaxation der Kontrollaorten 78 %, die der behandelten Aorten 74 %.

Bei den Kontrollaorten löste DMSO bei einer Konzentration von 3 ‰ eine maximale Relaxation von 47 % aus, bei den nitrattoleranten Aorten von 14 %. Auch hier konnte, wie schon bei den Untersuchungen zur Desensitivierung der GC bei intakter Gefäßfunktion (Abb. 5), trotz der Eigenwirkung von DMSO eine Substanzwirkung von S973448 nachgewiesen werden.

Nach Münzel *et al.* (1995) handelt es sich bei der Nitrattoleranz um ein multifaktorielles Geschehen, dessen Mechanismus lange unklar war. Die verminderte Biokonversion von NTG in seinen aktiven vasodilatierenden Metaboliten (Chung & Fung, 1990) scheint nicht die Ursache zu sein (Laursen *et al.*, 1996). Als weitere Mechanismen wurden die neurohumorale Adaption wie z. B. das Ansteigen des

Plasmavolumens (Dupuis *et al.*, 1990), die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (Packer *et al.*, 1987) und steigende Plasmaspiegel von Vasopressin und Katecholaminen vermutet (Parker *et al.*, 1991). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems über einen Anstieg von Angiotensin II zur Stimulation einer NAD(P)H-Oxidase führt, die wiederum eine gesteigerte Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidproduktion in der Gefäßwand bewirkt (Griendling & Ushio-Fukai, 2000).

Münzel *et al.* (1995) und Münzel & Harrison (1997) konnten am Tiermodell des nitrattoleranten Kaninchens zeigen, daß die Bioverfügbarkeit des NO aufgrund dieser erhöhten endothelialen und glattmuskulären Bildung von Superoxidanionradikalen durch die membrangebundene NAD(P)H-Oxidase eingeschränkt ist. Die NAD(P)H-Oxidase ist die Hauptquelle für Superoxid in Gefäßzellen und Myozyten. Sie ähnelt der neutrophilen NAD(P)H-Oxidase und produziert als Antwort auf Wachstumsfaktoren und Zytokine Superoxid. Sie spielt demnach eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System, insbesondere bei der Entstehung von pathophysiologischen Störungen wie Hypertonie und Atherosklerose (Griendling *et al.*, 2000).

Das Superoxid reagiert sehr schnell mit NO (Beckmann *et al.*, 1994) und reduziert die Konzentration des NO in der Gefäßwand und damit die Bioverfügbarkeit des aus Endothelzellen oder organischen Nitraten freigesetzten NO.

Die selektiven Aktivatoren der Eisen (III)-Form der GC zeigen nach unseren Befunden trotz der durch Nitrattoleranz induzierten Superoxidbildung keinen Wirkungsverlust. Sie sind weder in ihrer Potenz noch in ihrer Effizienz der gefäßrelaxierenden Wirkung abgeschwächt. Es ist keine Kreuztoleranz zu NTG-behandelten Aorten nachweisbar. Sie scheinen aus diesem Grund zur Behandlung von vaskulären Dysfunktionen geeignet zu sein.

### 5.2.1.5 Einfluß von Nitrattoleranz auf die Expression der GC in Rattenaorten

Es war bisher nicht bekannt, ob die Expression der GC durch Nitrattoleranz verändert wird. Bisher wurde ein Anstieg der GC-Expression in nur wenigen Geweben gefunden. Zhou *et al.* (1996a) konnten zeigen, daß durch eine pränatale Betamethason-Therapie die GC-Expression in den Pulmonalvenen neugeborener Lämmer verstärkt ist. Des Weiteren wurde in der *A. pulmonalis* von jungen Ratten perinatal eine erhöhte GC-Expression auf Proteinebene nachgewiesen, die in adulten Ratten jedoch wieder abnahm (Bloch *et al.*, 1997).

Sadoff *et al.* (1996) zeigten bei Hunden mit einer durch Herzinsuffizienz induzierten linksventrikulären Hypertrophie eine erhöhte NO-Sensitivität der myokardialen GC. Dies wurde kürzlich in einem ähnlichen Tiermodell bestätigt. Bei Ratten mit einer Infarkt-induzierten Herzinsuffizienz wurde eine signifikant gesteigerte Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC in der Aorta nachgewiesen (Bauersachs *et al.*, 1999).

In unseren Analysen konnten wir zeigen, daß die *in vivo* induzierte Nitrattoleranz zu einer signifikanten (2-fachen) Zunahme der Expression der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten der GC auf Proteinebene (Western Blot Analyse) in den toleranten Aorten im Vergleich zu nicht-toleranten Kontrollen führt (Abb. 21 und Abb. 22).

Diese Befunde lassen zusammen mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen vermuten, daß bei einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO die Expression der GC kompensatorisch gesteigert wird.

Es wäre nun anzunehmen, daß aufgrund der gesteigerten GC-Expression, die NO-Sensitivität der GC in der Gefäßwand zunimmt. Dies ist jedoch nicht der Fall, da wie bereits beschrieben, die verstärkte vaskuläre Superoxidbildung in intakten Aorten zu einer Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit führt.

In Gewebehomogenaten aus Aorten von nitrattoleranten Ratten ließ sich gegenüber den nicht-toleranten Kontrollratten eine Verdoppelung der NO-stimulierten GC-Aktivität nachweisen (Daten nicht dargestellt). In diesen Homogenaten war die durch die Nitrattoleranz-induzierte Superoxidbildung stark eingeschränkt, so daß die Bioverfügbarkeit des zugesetzten NO nicht wesentlich vermindert war. Die maximale NO-induzierte GC-Aktivität in diesen Homogenaten repräsentierte demnach die Menge an NO-sensitiver GC, die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Western Blot Analyse etwa verdoppelt war.

### 5.2.2 Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf NO-Sensitivität, Häm-Redox-Zustand und Expression der GC in Dahl-S-Ratten

Im Tiermodell der genetisch salzsensitiven Dahl-S-Ratte (DS) wurde durch die Fütterung einer salzreichen Diät ein Bluthochdruck induziert. Die Tiere wurden ab der 3. Lebenswoche für 10 Wochen mit einer salzreichen Standarddiät (4 % NaCl) gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt über denselben Zeitraum die Standarddiät ohne NaCl-Zusatz (0,2 % NaCl). Die mit salzreicher Diät gefütterten Ratten zeigten einen deutlich erhöhten arteriellen Blutdruck (223 mm Hg, Herzfrequenz 428 Schläge/min) im Vergleich zu den Kontrollratten (129 mm Hg, Herzfrequenz 327 Schläge/min). Im Alter von 13 Wochen wurde bei den Ratten die *A. thoracalis* entnommen und die isometrischen Kontraktionsmessungen im Organbad und die Western Blot Analyse durchgeführt.

Es wurde untersucht, ob die renale Hypertonie in den Aorten der Ratten die Endothelfunktion und Sensitivität gegenüber exogen zugeführten Nitraten sowie Aktivatoren der Häm-oxidierten GC beeinflusst.

#### 5.2.2.1 Akute relaxierende Wirkung von ACh *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten

Mit diesen Versuchen wurde ermittelt, ob sich bei den genetisch salzsensitiven Dahl-S-Ratten durch den renalen Bluthochdruck die endothelabhängige Gefäßrelaxation der Aorten verändert und ob es zu einer Abnahme der NO-Sensitivität der GC kommt.

Die endothelintakten Aortenringe der hypertensiven Ratten zeigten eine abgeschwächte Relaxation auf ACh im Vergleich zu den Aorten aus den normotensiven Ratten (Abb. 23). Die Maximalantwort war mit 37 % bei den hypertensiven Gefäßen signifikant vermindert im Vergleich zu den Kontrollen (57 %). Bei den deendothelialisierten Gefäßringen sollte keine Vasorelaxation zu beobachten sein. ACh induzierte jedoch auch in diesen Aortenringen eine schwache Relaxation von 16 % (Aorten der normotensiven Ratten) bzw. 14 % (Aorten der hypertensiven Ratten). Offenbar war das Endothel nicht vollständig entfernt worden.

Es konnte somit nachgewiesen werden, daß die ACh-induzierte endothelabhängige Relaxation bei den Aorten der hypertensiven Ratten gestört ist. Dies stimmt mit den

Angaben in der Literatur überein, wonach in den meisten Tiermodellen mit Hypertonie die endothelabhängige Relaxation auf ACh vermindert ist. Dies konnte sowohl bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) (Konishi *et al.*, 1983) als auch bei hypertensiven Dahl-S-Ratten (Lüscher *et al.*, 1987b) gezeigt werden. Lüscher & Vanhoutte (1986) gingen davon aus, daß die Wirkungsabschwächung gegenüber ACh in Aorten von SHR durch eine vermehrte Freisetzung von endothelabhängigen Kontraktionsfaktoren ausgelöst wird. Die durch den Blutdruck hervorgerufene Endotheliale Dysfunktion könnte aber ebenso auf einer verminderten Bildung und Freisetzung von endothelabhängigen relaxierenden Faktoren beruhen (Lüscher & Vanhoutte, 1991).

Lüscher *et al.* (1987b) konnten zeigen, daß die Relaxation der Aorten von mit salzreicher Diät gefütterten DS gegenüber ACh signifikant vermindert war. Auch die vasorelaxierende Wirkung von NNP war signifikant abgeschwächt, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei ACh. Es wurde eine verminderte Diffusion des EDRF vom Endothel zur Muskelzelle bzw. eine verminderte Ansprechbarkeit des glatten Gefäßmuskels auf den EDRF/NO diskutiert.

Lenda *et al.* (2000) analysierten die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der arteriellen Gefäßwand des *M. spinotrapezius* von Sprague-Dawley-Ratten, die mit einer salzreichen Diät gefüttert wurden. Sie beobachteten eine signifikant reduzierte Gefäßrelaxation auf ACh. Diese konnte durch die Gabe von Superoxiddismutase und Katalase normalisiert werden. Die vasorelaxierende Wirkung von NNP war im Vergleich zu den mit einer Standarddiät gefütterten Ratten unverändert. Die durch salzreiche Diät induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der muskulären Mikrozirkulation wurde für die verminderte endothelabhängige Antwort verantwortlich gemacht.

#### 5.2.2.2 Akute relaxierende Wirkung von NNP *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten

Wir analysierten, ob es durch Salz-induzierten renalen Bluthochdruck zu einer Veränderung der NO-Sensitivität der GC kommt.

Bei deendothelialisierten Aorten konnte eine signifikante Abnahme der Sensitivität gegenüber dem anorganischen NO-Donor NNP nachgewiesen werden. Die Aortensegmente der mit Standarddiät gefütterten normotensiven Dahl-S-Ratten

wurden durch 16 nM NNP halbmaximal relaxiert. Die maximale Relaxation von 100 % wurde bei einer Konzentration von 1 µM NNP erreicht. Demgegenüber lag die EC<sub>50</sub> der Gefäße der hypertensiven Ratten bei 30 nM NNP. Die maximale Relaxation von 97 % wurde bei diesen Aorten erst nach der Gabe von 3 µM NNP erreicht. Ab einer Konzentration von 10 nM NNP zeigte sich eine signifikant verminderte Relaxation der Aorten der hypertensiven Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein ähnliches Verhalten zeigten die endothelintakten Aorten beider Tiergruppen (normotensive Ratten EC<sub>50</sub> 14 nM, maximale Relaxation 100 %; hypertensive Ratten EC<sub>50</sub> 25 nM, maximale Relaxation 96 %, ohne Abb.). Die Abschwächung der vasorelaxierenden Wirkung war jedoch nicht so ausgeprägt wie für ACh.

Diese Befunde stimmen mit den bereits erwähnten Ergebnissen von Lüscher *et al.* (1987b) überein, wonach die Abschwächung der NNP-induzierte Vasorelaxation in Aorten von hypertensiven Ratten nicht so deutlich ist wie für die ACh-induzierte Relaxation.

Simchon *et al.* (1992) zeigten, daß die renalen Gefäße von DS hyperreaktiv auf die Vasokonstriktoren Norepinephrin und Angiotensin II reagieren, aber hyporeaktiv auf Vasodilatoren wie ANF und NNP, deren Wirkungsweise von der cGMP-Bildung abhängig ist. Aufgrund dieser Beobachtungen untersuchten Simchon *et al.* (1996) die Rolle des renalen cGMP bei der NO-abhängigen Vasorelaxation der Nierengefäße von DS. Es zeigte sich, daß die Nierengefäße nicht in der Lage waren, nach Infusion von NNP zu relaxieren. Die Autoren vermuteten, daß dies auf einen Defekt der NO-abhängigen cGMP-Produktion zurückzuführen ist.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß eine hohe Salzaufnahme den Effekt von NO in den peripheren Widerstandsgefäßen herabsetzt (Boegehold, 1992). Fujiwara *et al.* (2000) testeten aus diesem Grund, ob bei Patienten mit Bluthochdruck die Modulation des endogenen NO mit der Salzsensitivität im Zusammenhang steht. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß eine Salz-induzierte Abnahme der NO-Synthese in den Mechanismus der Salzsensitivität involviert ist. Die Autoren vermuteten eine durch die hohe Salzaufnahme verursachte Zunahme des endogenen eNOS-Inhibitors ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin).

### 5.2.2.3 Akute relaxierende Wirkung von YC-1 *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten

Es wurde untersucht, ob der Salz-induzierte Bluthochdruck zu einer direkten Störung der Aktivierung der GC - unabhängig von NO - führt, d. h. ob die Häm-abhängige Aktivität der GC durch die renale Hypertonie beeinträchtigt wird. Dies würde zu einer verminderten Sensitivität der Gefäße gegenüber dem GC-Aktivator YC-1 führen. YC-1 besitzt eine direkte, endothelunabhängige vasodilatierende Wirkung auf Ratten- und Kaninchenaorten und sensitiviert die GC schon in niedrigen Konzentrationen gegenüber NO (Mülsch *et al.*, 1997).

Bei den endothelintakten Aortenringen der normotensiven Ratten lag die maximale Relaxation bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  YC-1 bei 95 % ( $\text{EC}_{50}$  2,9  $\mu\text{M}$ ), bei den hypertensiven Ratten bei nur 78 % ( $\text{EC}_{50}$  6,0  $\mu\text{M}$ ). Die YC-1-abhängige Relaxation war bei den Gefäßen der hypertensiven Ratten bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  signifikant abgeschwächt (Abb. 25a). Die Häm-abhängige Aktivierung der GC scheint daher bei den endothelintakten Aorten der hypertensiven Ratten gestört zu sein.

Durch die Entfernung des Endothels wurde dieser Unterschied aufgehoben (normotensiven Ratten  $\text{EC}_{50}$  11  $\mu\text{M}$ , maximale Antwort 63 %; hypertensive Ratten  $\text{EC}_{50}$  17  $\mu\text{M}$ , maximale Antwort 67 %).

Insgesamt scheint der Einfluß des Endothels auf die YC-1-induzierte Relaxation bei den normotensiven Ratten von größerer Bedeutung zu sein als bei den hypertensiven Ratten. Bei den endothelintakten Aorten der normotensiven Ratten lag die maximale Relaxation bei 95 %, nach der Entfernung des Endothels nur noch bei 67 %. Dies läßt auf einen direkten Einfluß des Endothels auf die Häm-abhängige Aktivierung der GC bei den normotensiven Ratten schließen (Abb. 25a/b).

Bei den Gefäßen der hypertensiven Ratten war der Endothel einfluß auf die YC-1-induzierte Relaxation nicht so deutlich. Hier lag die maximale Relaxation der endothelintakten Aorten bei 78 % und nach mechanischer Entfernung des Endothels bei nur noch 63 %. Dieser Befund weist auf einen geringeren Einfluß des endothelialen NO in den Aorten der hypertensiven Ratten im Vergleich zu den Aorten der normotensiven Ratten hin.

Dies stimmt mit unseren Befunden der akuten relaxierenden Wirkung von ACh überein, bei welchen wir bei den hypertensiven Ratten eine verminderte ACh-induzierte Vasorelaxation feststellen konnten (Abb. 23).

### 5.2.2.4 Akute relaxierende Wirkung von S973448 *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten

Um direkt zu überprüfen, ob in den endothelintakten Aorten von hypertensiven Ratten das Redoxgleichgewicht der GC zugunsten der oxidierten Form verschoben wird, wurde der selektive Aktivator der Häm-oxidierten GC S973448 verwendet (Abb. 26).

Wir konnten beobachten, daß es bei den Aorten der hypertensiven Ratten zu einer Wirkungsverstärkung von S973448 im Vergleich zu den normotensiven Tieren kommt. Diese ist bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  S973448 signifikant. Die maximale Relaxation betrug bei den Gefäßen der normotensiven Ratten nach Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  S973448 nur 43 % ( $\text{EC}_{50}$  9,5  $\mu\text{M}$ ), während sie bei den Aorten der hypertensiven Ratten bei 69 % ( $\text{EC}_{50}$  11  $\mu\text{M}$ ) lag. Es ist anzunehmen, daß die GC bei den hypertensiven Ratten zum größeren Teil in der Eisen (III)-Form vorliegt als bei den normotensiven Kontrollratten. Dies steht im Einklang zu den bereits beschriebenen Ergebnissen mit YC-1 (Kap. 5.2.2.3).

Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen an Sprague-Dawley- (Abb. 12) und Wistar Ratten (Abb. 5 und Abb. 19) führte das Lösungsmittel DMSO bei Dahl-S-Ratten auch in der höchsten Konzentration zu einer nur schwachen Relaxation von 4 %. Möglicherweise ist diese weniger ausgeprägte Wirkung von DMSO auf die Aortensegmente von Dahl-S-Ratten im Vergleich zu Gefäßen von Sprague-Dawley- und Wistar Ratten auf speziesspezifische Unterschiede zurückzuführen. Die Klärung dieser Frage bedarf weiterer Untersuchungen.

### 5.2.2.5 Akute relaxierende Wirkung von HMR1766 *in vitro* auf Aorten von Dahl-S-Ratten

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, zu ermitteln, ob ein anderer selektiver Aktivator der Häm-oxidierten GC - HMR1766 - wie die Leitsubstanz S973448 zu einer verstärkten glattmuskulären Antwort der endothelintakten Aorten der hypertensiven Ratten führt.

Wie in Abb. 27 dargestellt, induzierte HMR1766 in beiden Gruppen eine Kontraktionshemmung der Gefäße, die bei den Aorten der normotensiven Dahl-S-



Ratten ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikant war. Diese GefäÙe relaxierten bei 6  $\mu\text{M}$  HMR1766 halbmaximal, die maximale Relaxation von 79 % wurde nach der Gabe von 30  $\mu\text{M}$  HMR1766 erreicht. Die Kontraktionshemmung war bei den Aorten der hypertensiven Ratten erst nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  HMR1766 signifikant. Die  $\text{EC}_{50}$  lag bei 12  $\mu\text{M}$  und die maximale Antwort betrug nur 36 % Relaxation. Die GefäÙe der hypertensiven Ratten reagierten somit signifikant schwächer im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen.

Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Untersuchungen der Leitsubstanz S973448 bei der, wie beschrieben, die GefäÙe der hypertensiven Ratten eine stärkere Relaxation zeigten. Wir hatten bei beiden Substanzen aufgrund ihrer chemischen Verwandtschaft das gleiche Ergebnis erwartet. Wenn die GC bei den hypertensiven Ratten tatsächlich vorwiegend in der Häm-oxidierten Form vorliegen würde, müÙte sowohl nach der Zugabe von S973448 als auch nach der Zugabe von HMR1766 eine verstärkte Relaxation der GefäÙe zu beobachten sein. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Trotz ihrer chemisch ähnlichen Struktur scheinen zwischen S973448 und HMR1766 Unterschiede vorzuliegen. Es wurde beobachtet, daß HMR1766 direkt das Cytochrom P450-System beeinflusst (unveröffentlicht). Dies konnte bei S973448 nicht gezeigt werden. Möglicherweise werden durch HMR1766 andere vasoaktive Mediatoren beeinflusst, so daß die Wirkung auf die Häm-oxidierte GC durch diese Effekte überlagert werden.

#### 5.2.2.6 Einfluß von Salz-induziertem renalen Bluthochdruck auf die Expression der GC in Dahl-S-Ratten

Wir konnten in unseren Analysen nachweisen, daß der Salz-induzierte renale Bluthochdruck in den Aortenextrakten zu einer signifikanten (2,8-fachen) Abnahme der Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit der GC auf Proteinebene (Western Blot Analyse) im Vergleich zu den normotensiven Kontrollratten führt (Abb. 28).

Wie in Abb. 29 dargestellt, lies sich bei der  $\beta_1$ -Untereinheit der GC nur eine tendenzielle, aber nicht signifikante Abnahme der Expression in den Aortenextrakten der hypertensiven Tiere im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen (1,3-fache Verminderung).

Gupta *et al.* (1997) konnten ebenfalls nachweisen, daß die Ursache für die reduzierte renale GC-Aktivität von DS auf molekularer Ebene zu finden ist. Sie zeigten, daß in Nieren von DS die  $\beta_1$ -Untereinheit der GC vermindert, die  $\beta_2$ -Untereinheit jedoch verstärkt exprimiert wird im Vergleich zu salzresistenten Dahl-R-Ratten. Die isolierten Untereinheiten (UE) sind katalytisch inaktiv, wenn sie allein exprimiert werden. Lediglich die Verbindung der  $\alpha_1$ - mit der  $\beta_1$ -UE führt zu einem aktiven Enzym. Die verstärkte Bildung der  $\beta_2$ -UE in DS führt zu einem Austausch der  $\beta_1$ -UE durch  $\beta_2$ -UE der GC. Das so entstehende Heterodimer aus  $\beta_2/\alpha_1$ -UE, weist eine verminderte NO-Sensitivität auf und hemmt die NO-stimulierte cGMP Akkumulation in den Zellen. Diese Befunde bestätigen auch unsere Ergebnisse aus den Kontraktionsversuchen, bei welchen hypertensive DS eine verminderte Sensitivität der vaskulären GC gegenüber NO aufwiesen (Abb. 23 und Abb. 24).

Auch Azam *et al.* (1998) stellten einen Zusammenhang zwischen GC-Genen und der Salzsensitivität in DS fest. Sie fanden, daß die Gene der GC für die  $\beta_2$ -UE und für Endothelin 2 auf dem Chromosom 5 im engen Zusammenhang stehen. Dies wird durch die Analysen von Deng *et al.* (1994) unterstützt, welche zeigten, daß der Endothelin 2-Genlocus stark mit dem systolischen Blutdruck der  $F_2$ -Generation von Kreuzungen mit DS korreliert. Sie konnten zeigen, daß eine reduzierte GC-Aktivität zur Salzsensitivität beiträgt, da die NO-Sensitivität und die NO-stimulierte cGMP-Bildung abgeschwächt sind.

Im menschlichen Genom konnten diese Befunde bisher nicht bestätigt werden. Danzinger *et al.* (2000) kamen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß kein Zusammenhang zwischen den Genen der GC und Hypertonie bei Patienten mit erhöhtem Blutdruck besteht. Ob bei hypertensiven Patienten die GC-Sensitivität gegenüber NO abnimmt oder die GC auf andere Weise beeinflusst wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

## VI Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Studie wurde zunächst untersucht, welche Mechanismen für die akute und chronische Desensitivierung der glattmuskulären löslichen Guanylylcyclase (GC) gegenüber NO bei intakter Gefäßfunktion verantwortlich sind. Das Kontraktions- und Relaxationsverhalten von isolierten Rattenaorten im Organbad diente als Maß für die GC-Aktivität. Es wurden sowohl der Einfluß des endogen gebildeten NO als auch der Einfluß von exogen zugeführtem NO untersucht. Hierbei wurde ermittelt, ob die Sensitivitätsänderung der GC gegenüber NO direkt durch NO vermittelt wird oder ob eine gesteigerte cGMP-Bildung die indirekte Ursache für die Desensitivierung des Rezeptorproteins ist. Es konnte gezeigt werden, daß die Desensitivierung aufgrund der basalen NO-Freisetzung erfolgte. Wir konnten weiterhin zeigen, daß exogen zugeführtes NO die glatte Gefäßmuskulatur der Ratte gegenüber NO in gleichem Maße desensitiviert wie endogen gebildetes NO. Durch Untersuchungen mit dem Atrialen Natriuretischen Faktor konnten wir den Signaltransduktionsweg näher charakterisieren und zeigen, daß sehr wahrscheinlich eine gesteigerte cGMP-Bildung für die akute Desensitivierung der GC verantwortlich ist.

Ergänzend führten wir Analysen über das Redoxgleichgewicht der GC durch. Hierzu wurden neu entwickelte selektive Aktivatoren der Eisen (III)-Form der GC - S973448 und HMR1766 (schwefelsubstituierte Sulfonylamino-carbonsäure-N-arylamide) - verwendet. Wir konnten in unseren Befunden zeigen, daß die akute Desensitivierung der GC durch physiologische Konzentrationen von NO nicht auf einer Oxidation des Hämeisens des Enzyms beruht.

In Tiermodellen wurden die Auswirkungen einer chronischen Aktivierung der Eisen (II)-Form und der Eisen (III)-Form der GC auf die NO-Sensitivität, den Redoxstatus und die Proteinexpression der GC analysiert. Außerdem wurde untersucht, ob Aktivatoren der Häm-oxidierten GC bei chronischer *in vivo* Anwendung eine Toleranz induzieren. Hierbei wurde insbesondere die Frage berücksichtigt, inwieweit diese Substanzen langfristig in der Lage wären, organische Nitrate bei der Behandlung von Krankheitsbildern mit endothelialer Dysfunktion, wie z. B. Atherosklerose und Bluthochdruck, zu ersetzen.

Wir konnten erstmals zeigen, daß die Aktivatoren der Eisen (III)-Form der GC wesentliche Vorteile gegenüber den organischen Nitraten aufweisen, da die

Behandlung der Ratten mit S973448 und HMR1766 weder über einen Zeitraum von drei Tagen noch über vier Wochen zu einer Wirkungsabschwächung dieser Substanzen (Eigentoleranz) führt. Auch gegenüber organischen Nitraten sowie endogenem NO (Kreuztoleranz) konnten wir trotz der chronischen Aktivierung der Häm-oxidierten GC keinen Wirkungsverlust dieser Pharmaka beobachten.

Expressionsänderungen der GC konnten wir ebenfalls nicht feststellen. Es ist daher anzunehmen, daß die neuen, selektiven Aktivatoren günstigere Eigenschaften als die bisher verwendeten organischen Nitrate aufweisen und therapeutisch zur Behandlung der genannten Herz-Kreislauf-Erkrankungen geeignet sind.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir in Tiermodellen mit einer experimentell induzierten Störung der Funktion des glatten Gefäßmuskels, ob die chronische Aktivierung der Eisen (II)-Form der GC zu einer Veränderung der NO-Empfindlichkeit, des Oxidationsstatus des Enzyms und der Expression der GC-Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  führt.

Wir konnten im Tiermodell der nitrattoleranten Ratte sowohl eine Toleranz gegenüber Nitroglycerol als auch gegenüber endothelabhängigen Dilatoren und - wenn auch nicht so ausgeprägt - gegenüber Natriumnitroprussid (Kreuztoleranz) beobachten. Einen Wirkungsverlust gegenüber den Aktivatoren der Eisen (III)-Form der GC konnten wir nicht feststellen. Weiterhin zeigten wir, daß die chronische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems zu einer gesteigerten Superoxidbildung führt, die wiederum eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO bewirkt. Dies führt zu einer kompensatorisch gesteigerten Expression der GC-Untereinheiten ( $\alpha_1/\beta_1$ ) in nitrattoleranten Ratten.

Im Tiermodell der genetisch salzsensitiven Dahl-S-Ratte konnten wir nachweisen, daß die durch den renalen Bluthochdruck hervorgerufene Gefäßdysfunktion in den Rattenaorten zu einer Abnahme der Sensitivität gegenüber Acetylcholin und Natriumnitroprussid sowie dem NO-unabhängigen, direkten Aktivator der GC, YC-1, führt. Auch war die Expression beider GC-Untereinheiten in den Aorten der hypertensiven Ratten vermindert.

## VII Summary

We investigated the mechanism responsible for the acute and chronic desensitization of soluble guanylyl cyclase (GC) in intact blood vessels to NO. The relaxant response of the isolated rat aorta to NO served as a measure for the *in vivo* GC activity. We analyzed the influence of endogenously and exogenously produced NO, and studied whether the desensitization of the GC was a direct NO-induced effect, or an indirect cGMP mediated process. We showed that the basal endothelial NO-release is responsible for the desensitization. Furthermore we demonstrated that exogenously applied NO shows the same desensitizing effect as endogenously produced NO. We analyzed the signaling pathway by using atrial natriuretic peptide (ANP), an activator of the particulate GC, and showed that an increased cGMP-production by ANP likely accounts for the desensitization of the GC.

We analyzed the redox state of GC by using the selective activators of the heme-oxidized GC S973448 and HMR1766. Our results proved that the acute desensitization of the GC by physiological concentrations of NO is not based on oxidation of the GC heme.

In animal models we analyzed the effects of chronic activation of the  $Fe^{2+}$ - and  $Fe^{3+}$ -form of GC on NO-sensitivity, redox state and protein expression of GC. Moreover we investigated whether chronic application of activators of the heme-oxidized GC leads to tolerance. In addition, we put special attention to the question whether these compounds are able to replace the organic nitrates in the treatment of endothelial dysfunctions, e.g. atherosclerosis and hypertension.

We demonstrated for the first time that the activators of the heme-oxidized GC exhibit significant advantages compared to organic nitrates. The treatment of the rats for 3 days or 4 weeks with these substances neither induced tolerance to these substances nor cross tolerance to endogenous NO or organic nitrates.

Also we could not find changes in the protein expression. Therefore we conclude that the new selective activators of the heme-oxidized GC may be more suitable than organic nitrates for the treatment of cardiovascular diseases, especially if the NO-insensitive form of GC prevails in the affected vascular tissues.

Furthermore we investigated in animal models with pharmacologically induced dysfunction of the vascular smooth muscle, whether the chronic GC activation is

responsible for changes in NO-sensitivity, oxidation state and expression of the GC subunits.

We demonstrated in nitrate tolerant rats cross tolerance to sodium nitroprusside and endothelium derived relaxing factor but no tolerance to the activators of heme-oxidized GC. Furthermore we showed that chronic activation of the renin-angiotensin-system causes increased O<sub>2</sub>-formation and therefore a reduced NO bioavailability. This leads to a compensatory increase in expression of both GC subunits in the nitrate tolerant rat.

In the genetic salt-sensitive hypertensive Dahl-rat we showed that the vascular dysfunction leads to a decreased sensitivity to acetylcholine, sodium nitroprusside and to the direct, NO-independent GC activator YC-1. In accordance with these findings the expression of both GC subunits was decreased.

## VII Literaturverzeichnis

Abrams, J. (1988)

A reappraisal of nitrate therapy.  
JAMA **259**, 396-401

Adams, M.R., Robinson, J., McCredie, R., Seale, J.P., Sorensen, K.E., Deanfield, J.E., Celermajer, D.S. (1998)

Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis.  
J. Am. Coll. Cardiol. **32**, 123-127

Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., Weir, E.K. (1994)

Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 7583-7587

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

Azodi, 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

Axelsson, K.L., Andersson, R.G. (1983)

Tolerance towards nitroglycerin, induced in vivo, is correlated to a reduced cGMP response and an alteration in cGMP turnover.  
Eur. J. Pharmacol. **88**, 71-79

Azam, M., Gupta, G., Chen, W., Wellington, S., Warburton, D., Danzinger, R. (1998)

Genetic mapping of soluble guanylyl cyclase genes. Implications for linkage to blood pressure in the Dahl rat.  
Hypertension **32**, 149-154

Bahnson, T.D., Pandol, S.J., Dionne, V.E. (1993)

Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry in pancreatic acinar cells.  
J. Biol. Chem. **268**, 10808-10812

Baltrons, M.A., Garcia, A. (1999)

Nitric oxide-independent down-regulation of soluble guanylyl cyclase by bacterial endotoxin in astroglial cells.  
J. Neurochem. **73**, 2149-2157

- Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra, R.Jr., Harrison, D.G. (1991)  
Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required.  
*Biochem. Pharmacol.* **42**, S157-S165
- Bauersachs, J., Bouloumie, A., Mülsch, A., Wiemer, G., Fleming, I., Busse, R. (1998)  
Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production.  
*Cardiovasc. Res.* **37**, 772-779
- Bauersachs, J., Bouloumié, 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.  
*Circulation* **100**, 292-298
- Beckmann, J.S., Ye, Y.Z., Anderson, P.G., Chen, J., Accavitti, M.A., Tarpey, M.M., White, C.R. (1994)  
Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry.  
*Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**, 81-88
- Bellamy, T.C., Wood, J., Goodwin, D.A., Garthwaite, J. (2000)  
Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2928-2933
- Bennett, B.M., Waldman, S.A. (1995)  
Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation, in *Physiology and Pathophysiology of the Heart* (Sperelakis, N, ed)  
pp 975-998, Kluwer Academic Publishers, Boston MA.
- 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
- Boegehold, M.A. (1992)  
Reduced influence of nitric oxide on arteriolar tone in hypertensive Dahl rats.  
*Hypertension* **19**, 290-295
- Bozinovski, J., Brien, J.F., Marks, G.S., Nakatsu, K. (1994)  
Inhibition of nitrovasodilators by pyocyanin and methylene blue is dissociated from nitric oxide formation.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 746-752
- Bradford, M.M. (1976)  
A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Anal. Biochem.* **72**, 248-254

- Brandes, R.P., Kim, D., Schmitz-Winnenthal, F.H., Amidi, M., Godecke, A., Mülsch, A., Busse, R. (2000)  
Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase.  
*Hypertension* **35**, 231-236
- Brandwein, H.J., Lewicki, J.A., Murad, F. (1981)  
Reversible inactivation of guanylate cyclase by mixed disulfide formation.  
*J. Biol. Chem.* **256**, 2958-2962
- Bredt, D.S., Synder, S.H. (1994)  
Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule.  
*Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175-195
- Buecheler, W.A., Nakane, M., Murad, F. (1991)  
Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 351-357
- Busse, R., Trogisch, G., Bassenge E. (1985)  
The role of endothelium in the control of vascular tone.  
*Basic Res. Cardiol.* **80**, 475-490
- Busse, R., Mülsch, A. (1990)  
Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin.  
*FEBS Lett.* **265**, 133-136
- Caramori, P.R., Adelman, A.G., Azevedo, E.R., Newton, G.E., Parker, A.B., Parker, J.D. (1998)  
Therapy with nitroglycerin increases coronary vasoconstriction in response to acetylcholine.  
*J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 1969-1974
- Chen, P.Y., Sanders, P.W. (1991)  
L-Arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats.  
*J. Clin. Invest.* **88**, 1559-1567
- Chen, P.Y., Sanders, P.W. (1993)  
Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats.  
*Hypertension* **22**, 812-818
- Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Nathan, C. (1992)  
Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages.  
*J. Exp. Med.* **176**, 599-604
- Chung, S.J., Fung, H.L. (1990)  
Identification of the subcellular site of nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 614-619

- Cosentino, F., Patton, S., d'Uscio, L.V., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Moreau, P., Malinski, T., Lüscher, T.F. (1998)  
Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats.  
*J. Clin. Invest.* **101**, 1530-1537
- Churchill, P.C., Churchill, M.C., Bidani, A.K. (1992)  
Kidney cross transplants in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats.  
*Am. J. Physiol.* **262**, H1809-H1817
- Craven, P.A., DeRubertis, F.R. (1978)  
Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins.  
*J. Biol. Chem.* **253**, 8433-8443
- Dahl, L., Heine, M., Tassinari, L., (1962)  
Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion.  
*Nature* **194**, 480-482
- Danzinger, R.S., Pappas, C., Barnitz, C., Varvil, T., Hunt, S.C., Leppert, M.F. (2000)  
Evaluation of heterodimeric guanylyl cyclase genes as candidates for human hypertension.  
*J. Hypertension* **18**, 263-266
- Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. (1995)  
Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance.  
*FEBS Lett.* **369**, 131-135
- Deng, A.Y., Dene, H., Pravenec, M., Rapp, J.P. (1994)  
Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes.  
*J. Clin. Invest.* **93**, 2701-2709
- Dierks, E.A., Burstyn, J.N. (1998)  
The deactivation of soluble guanylyl cyclase by redox-active agents.  
*Archives of Biochemistry & Biophysics.* **351**, 1-7
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M. (1999)  
Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.  
*Nature* **399**, 601-605
- Draijer, R., Vaandrager, A.B., Nolte, C., de Jong, H.R., Walter, U., van Hinsbergh, V.W. (1995)  
Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin.  
*Circ. Res.* **77**, 897-905

- Dupuis, J., Lalonde, G., Lemieux, R., Rouleau, J.L. (1990)  
Tolerance to intravenous nitroglycerin in patients with congestive heart failure: role of increased intravascular volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N-acteylcysteine.  
*J. Am. Coll. Cardiol.* **16**, 923-931
- Elkayam, U. (1991)  
Tolerance to organic nitrates: evidence, mechanisms, clinical relevance, and strategies for prevention.  
*Ann. Intern. Med.* **114**, 667-677
- Feelisch, M., Kelm, M. (1991)  
Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 286-293
- Ferrero, R., Rodríguez-Pascual, F., Miras-Portugal, M.T., Torres, M. (2000)  
Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity inhibition through cyclic GMP-dependent dephosphorylation.  
*J. Neurochem.* **75**, 2029-2039
- Förster, J., Harteneck, C., Malkewitz, J., Schultz, G., Koesling, D. (1996)  
A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 und beta 1 subunits.  
*Eur. J. Biochem.* **240**, 380-386
- Förstermann U., Schmidt H.H.H.W., Pollock J.S., Sheng H., Mitchell J.A., Warner T.D., Nakane M., Murad F. (1991)  
Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types.  
*Biochem. Pharmacol.* **42**, 1849-1857
- Förstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. (1994)  
Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.  
*Hypertension* **23**, 1121-1131
- Francis, S.F., Corbin, J.D. (1994)  
Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases.  
*Annu. Rev. Physiol.* **56**, 237-272
- Freeman, B.A., White, C.R., Gutierrez, H., Paler-Martinez, A., Tarpey, M.M., Rubbo, H. (1995)  
Oxygen radical-nitric oxide reactions in vascular diseases.  
*Adv. Pharmacol.* **34**, 45-69
- Fridovich, I. (1978)  
The biology of oxygen radicals.  
*Science* **201**, 875-880

- Friebe, A., Schultz, G., Koesling, D. (1996)  
Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme.  
*EMBO J.* **15**, 6863-6868
- Fujiwara, N., Osanai, T., Kamada, T., Katoh, T., Takahashi, K., Okumura, K. (2000)  
Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake.  
*Circulation* **101**, 856-61
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B., Keef, K.D. (1999)  
Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 10927-10935
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980)  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.  
*Nature* **288**, 373-376
- Furchgott, R.F., Khan, M.T., Jothianandan, D. (1987)  
Evidence supporting the proposal that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide.  
*Thromb. Res.* **7**, (Suppl. 7) 3 (Abstract)
- Galle, J., Zabel, U., Hübner, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C., Schmidt, H.H.H.W. (1999)  
Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity.  
*Br. J. Pharmacol.* **127**, 195-203
- Gerzer, R., Böhme, E., Hofmann, F., Schultz, G. (1981b)  
Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper.  
*FEBS Lett.* **132**, 71-74
- Gerzer, R., Hofmann, F., Schultz, G. (1981a)  
Purification of a soluble, sodium nitroprussid-stimulated guanylate cyclase from bovine lung.  
*Eur. J. Biochem.* **116**, 479-486
- Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-Fukai, M. (2000)  
NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.  
*Circ. Res.* **86**, 494-501
- Griendling, K.K., Ushio-Fukai, M. (2000)  
Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling.  
*Regul. Pept.* **91**, 21-27
- Gupta, G., Azam, M., Yang, L., Danzinger, R.S. (1997)  
The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide.  
*J. Clin. Invest.* **100**, 1488-1492

- Haendeler, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (1999)  
Nitric oxide and apoptosis.  
*Vitam. Horm.* **57**, 49-77
- Harrison, D.G., Bates, J.N. (1993)  
The nitrovasodilators. New ideas about old drugs.  
*Circulation* **87**, 1461-1467
- Harteneck, C., Koesling, D., Söling, A., Schultz, G., Böhme, E. (1990)  
Expression of soluble guanylate cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits.  
*FEBS Lett.* **272**, 221-223
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Böhme, E., Schultz, G. (1991)  
Molecular cloning and expression of a new  $\alpha$ -subunit of soluble guanylyl cyclase.  
*FEBS Lett.* **292**(1,2), 217-222
- He, H., Kimura, S., Fujisawa, Y., Tomohiro, A., Kiyomoto, K., Aki, Y., Abe, Y. (1997)  
Dietary L-arginine supplementation normalizes regional blood flow in Dahl-Iwai salt-sensitive rats.  
*Am. J. Hypertens.* **10**, 89S-93S
- Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G. (1996)  
Mechanism of smooth muscle contraction.  
*Physiological Reviews* **76**, 967-1003
- Hüttner, I., Gabbiani, G. (1983)  
Vascular endothelium in hypertension. In: Genest, J., Kuchel, O., Hamet, P., Cantin, M. Hypertension: physiopathology and treatment. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 473-488
- Huie, R.E., Padjama, S. (1993)  
The reaction of nitric oxide with superoxide.  
*Free Radic. Res. Commun.* **18**, 195-199
- Iesaki, T., Gupte, S.A., Wolin, M.S. (1999)  
A flavoprotein mechanism appears to prevent an oxygen-dependent inhibition of cGMP-associated nitric oxide-elicited relaxation of bovine coronary arteries.  
*Circ. Res.* **85**, 1027-1031
- Ignarro, L.J., Adams, J.B., Horwitz, P.M., Wood, K.S. (1986)  
Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange: comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 4997-5002
- Ignarro, L.J., Buga, G. M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri G. (1987)  
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9265-9269

- Ignarro, L.J. (1994)  
Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins.  
*Adv. Pharmacol.* **26**, 35-65
- Ikeda, Y., Saito, K., Kim, J.I., Yokoyama, M. (1995)  
Nitric oxide synthase isoform activities in kidney of Dahl salt-sensitive rats.  
*Hypertension* **26**, 1030-1034
- Jacob, S.W., Herschler, R. (1986)  
Pharmacology of DMSO  
*Cryobiology* **23**, 14-27
- Jahn, H., Nastainczyk, W., Rohrkasten, A., Schneider, T., Hofmann, F. (1988)  
Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II.  
*Eur. J. Biochem.* **178**, 535-42
- 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
- Kaupp, U.B. (1995)  
Family of cyclic nucleotide gated ion channels.  
*Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 434-442
- Kauser, K., Rubanyi, G.M. (1994)  
Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae.  
*Am. J. Physiol.* **267**, H2311-H2317
- Kharitonov, V., Russwurm, M., Magde, D., Sharma, V.S., Koesling, D. (1997)  
Dissociation of nitric oxide from soluble guanylate cyclase.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 284-286
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996)  
Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase).  
*Science* **273**, 245-248
- Kitazawa, T., Gaylinn, B.D., Denney, G.H., Somlyo, A.P. (1991)  
G-protein-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 1708-1715
- Klöß, S., Bouloumié, A., Mülsch, A. (2000)  
Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase.  
*Hypertension* **35**, 43-47

- Knowles, R.G., Moncada, S. (1994)  
Nitric oxide synthase in mammals.  
*Biochem. J.* **298**, 249-258
- Ko, F.N., Wu, C.C., Kuo, S.C., Lee, F.Y., Teng, C.M. (1994)  
YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase.  
*Blood* **84**, 4226-4233
- Koesling, D., Herz, J., Gausepohl, H., Niroomand, F., Hinsch, K.D., Mülsch, A., Böhme, E., Schultz, G., Frank, R. (1988)  
The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase.  
*FEBS Lett.* **239**, 29-34
- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G., Böhme, E. (1990)  
The primary structure of the larger subunit of soluble guanylate cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme.  
*FEBS Lett.* **266**, 128-132
- Komalavilas, P., Lincoln, T.M. (1996)  
Phosphorylation of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 21933-21938
- Komas, N., Lugnier, C., Stoclet, J.C. (1991)  
Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors.  
*Br. J. Pharmacol.* **104**, 495-503
- Konishi, M., Su, C. (1983)  
Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries.  
*Hypertension* **5**, 881-886
- Kumar, K.V., Das, U.N. (1993)  
Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension?  
*Free Radic. Res. Commun.* **19**, 59-66
- Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **227**, 680-685
- Lander, H.M., Sehajpal, P.K., Novogrodsky, A. (1993)  
Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins.  
*J. Immunol.* **151**, 7182-7187
- Laragh, J.H., Baer, L., Brunner, H.R., Buhler, F.R., Sealey, J.E., Vaughan, E.D.jr (1972)  
Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease.  
*Am. J. Med.* **52**, 633-652



- Laursen, J.B., Mülsch, A., Boesgaard, S., Mordvintcev, P., Trautner, S., Gruhn, N., Nielsen-Kudsk, J.E., Busse, R., Aldershvile, J. (1996)  
In vivo nitrate tolerance is not associated with reduced bioconversion of nitroglycerin to nitric oxide.  
*Circulation* **94**, 2241-2247
- Lenda, D.M., Sauls, B.A., Boegehold, M.A. (2000)  
Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt.  
*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H7-H14
- Limas, C., Westrum, B., Limas, C.J., Cohn, J.N. (1980)  
Effect of salt on the vascular lesions of spontaneously hypertensive rats.  
*Hypertension* **2**, 477-489
- Lincoln, T.M., Cornwell, T.L. (1993)  
Intracellular cyclic GMP receptor proteins.  
*FASEB J.* **7**, 328-338
- 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
- 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**, 375-413
- Lüscher, T.F., Vanhoutte, P.M. (1986)  
Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat.  
*Hypertension* **8**, 344-348
- Lüscher, T.F., Raji, L., Vanhoutte, P.M. (1987a)  
Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats.  
*Hypertension* **9**, 157-163
- Lüscher, T.F., Vanhoutte, P.M., Raji, L. (1987b)  
Antihypertensive treatment normalizes decreased endothelium-dependent relaxations in rats with salt-induced hypertension.  
*Hypertension* **9**, Suppl. 3, 193-197
- Lüscher, T.F., Vanhoutte, P.M. (1991)  
The endothelium: modulator of cardiovascular function.  
Boca Raton, Fla, CRC Press, pp 1-215  
*Hypertension* **9**, Suppl.III, 193-197

- Lugnier, C., Komasa, N. (1993)  
Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation.  
*Eur. Heart J.* **14**, 141-148
- Marletta, M.A. (1994)  
Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis.  
*Cell* **78**, 927-930
- 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., Rees, D.D., Schulz, R., Palmer, R.M.J. (1991)  
Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis *in vivo*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 2166-2170
- Moncada, S., Higgs, A. (1993)  
Mechanism of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway.  
*N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012
- Morgan, D.A., DiBona, G.F., Mark, A.L. (1990)  
Effects of interstrain renal transplantation on NaCl-induced hypertension in Dahl rats.  
*Hypertension* **15**, 436-442
- Mülsch, A., Busse, R., Bassenge, E. (1988)  
Desensitization of guanylate cyclase in nitrate tolerance does not impair endothelium-dependent responses.  
*Eur. J. Pharmacol.* **158**, 191-198
- Mülsch, A., Mordvintcev, P. M., Bassenge, E., Jung, F., Clement, B., Busse, R. (1995)  
In vivo spin trapping of glyceryl trinitrate-derived nitric oxide in rabbit blood vessels and organs.  
*Circulation* **92**, 1876-1882
- Mülsch, A., Bauersachs, J., Schäfer, 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. (2000)  
Endothelial function and nitric oxide (NO): central role in vascular function and protection. In: Nitroglycerin 9 (Ed.: T.Meinertz)  
by Walter de Gruyter GmbH & Co.KG, S. 11-35
- Münzel, T., Sayegh, H., Freemann, B.A., Tarpey, M.M., Harrison, D. G. (1995)  
Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance.  
*J. Clin. Invest.* **95**, 187-194

- Münzel, T., Harrison, D.G. (1997)  
Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance.  
*J. Mol. Med.* **75**, 891-900
- Münzel, T., Heitzer, T., Harrison, D.G. (1997)  
The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system.  
*Herz* **22**, 158-172
- Münzel, T., Li, H., Mollnau, H., Hink, U., Matheis, E., Hartmann, M., Oelze, M., Skatchkov, M., Warnholtz, A., Duncker, L., Meinertz, T., Förstermann, U. (2000)  
Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability.  
*Circ. Res.* **86**, e7-e12
- Murad, F., Waldman, S., Molina, C., Bennett, B., Leitman, D. (1987)  
Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation.  
*Prog. Clin. Biol. Res.* **249**, 65-76
- Murad, F. (1994)  
Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system.  
*Adv. Pharmacol.* **26**, 19-33
- Nagase, M., Ando, K., Katafuchi, T., Kato, A., Hirose, S., Fujita, T. (1997)  
Role of natriuretic peptide receptor type C in Dahl salt-sensitive hypertensive rats.  
*Hypertension* **30**, 177-183
- Nathan, C., Xie, Q. (1994)  
Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls.  
*Cell* **78**, 915-918
- Nicholls, M.G. (1984)  
Reduction of dietary sodium in Western society. Benefit or risk?  
*Hypertension* **6**, 795-801
- Oelze, M., Mollnau, H., Hoffmann, N., Warnholtz, A., Bodenschatz, M., Smolenski, A., Walter, U., Skatchkov, M., Meinertz, T., Münzel, T. (2000)  
Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction.  
*Circ. Res.* **87**, 999-1005
- Olesen, S.P., Drejer, J., Axelsson, O., Moldt, P., Bang, L., Nielsen-Kudsk, J., Busse, R., Mülsch, A. (1998)  
Characterization of NS2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase.  
*Br. J. Pharmacol.* **123**, 299-309

- Orstavik, S., Natarajan, V., Tasken, K., Jahnsen, T., Sandberg, M. (1997)  
Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1)  
*Genomics* **42**, 311-318
- Packer, M., Lee, W.H., Kessler, P.D., Gottlieb, S.S., Medina, N., Yushak, M. (1987)  
Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure.  
*N. Engl. J. Med.* **317**, 799-804
- Palacios, M., Knowles, R.G., Palmer, R.M., Moncada, S. (1989)  
Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 802-809
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. (1988)  
Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.  
*Nature* **333**, 664-666
- Papapetropoulos, A., Go, C.Y., Murad, F., Catravas, J.D. (1996)  
Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells.  
*Br. J. Pharmacol.* **117**, 147-155
- Parker, J.D., Farrell, B., Fenton, T., Cohan, M., Parker, J.O. (1991)  
Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin.  
*Circulation* **84**, 2336-2345
- 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
- Prabha, P.S., Das, U.N., Koratkar, R., Sagar, P.S., Ramesh, G. (1990)  
Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension.  
*Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **41**, 27-33
- Pryzwanski, 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 Ca<sup>2+</sup> pump of bovine pulmonary artery.  
*Cell Calcium* **11**, 261-268

- Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K. (1996)  
Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation.  
*J. Clin. Invest.* **97**, 1916-1923
- Rapoport, R.M., Murad F. (1983)  
Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP.  
*Circ. Res.* **52**, 352-357
- Reid, M.B., Moody, M.R. (1994)  
Demethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility  
*J. Appl. Physiol.* **76**, 2186-2190
- Robinson, B.F., Dobbs, R.J., Bayley, S. (1982)  
Response of forearm resistance vessels to verapamil and sodium nitroprusside in normotensive and hypertensive men: evidence for a functional abnormality of vascular smooth muscle in primary hypertension.  
*Clin. Sci.* **63**, 33-42
- Roman, R.J., Alonso-Galicia, M., Wilson, T.W. (1997)  
Renal P450 metabolites of arachidonic acid and the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats.  
*Am. J. Hypertens.* **10**, 63S-67S
- Sadoff, J.D., Scholz, P.M., Tse, J., Weiss, H.R. (1996)  
Increased guanylate cyclase activity is associated with an increase in cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in left ventricular hypertrophy.  
*J. Clin. Invest.* **98**, 838-845
- Sams, W.M., Carroll, N.V., Crantz, P.L. (1966)  
Effect of methyl sulfoxide on isolated-innervated skeletal, smooth, and cardiac muscle.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**, 103-107
- Schachinger, V., Zeiher, A.M. (2000)  
Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction.  
*Z. Kardiol.* **89**, 70-74
- 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
- Shen, K., DeLano, F.A., Zweifach, B.W., Schmid-Schonbein, G.W. (1995)  
Circulating leukocyte counts, activation, and degranulation in Dahl hypertensive rats.  
*Circ. Res.* **76**, 276-283

- Simchon, S., Manger, W.M., Carlin, R.D., Peeters, L.L., Rodriguez, J., Batista, D., Brown, T., Merchant, N.B., Jan, K.M., Chien, S. (1989)  
Salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rat. Hemodynamics and renal responses.  
*Hypertension* **13**, 612-621
- Simchon, S., Manger, W.M., Brown, T.W. (1991)  
Dual hemodynamic mechanism for salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats.  
*Hypertension* **17**, 1063-1071
- Simchon, S., Manger, W.M., Shi, G.S., Brensilver, J. (1992)  
Impaired renal vascular reactivity in prehypertensive Dahl salt-sensitive rats.  
*Hypertension* **20**, 524-532
- Simchon, S., Manger, W.M., Blumberg, G., Brensilver, J., Cortell, S. (1996)  
Impaired vasodilation and urinary cGMP excretion in Dahl salt-sensitive rats.  
*Hypertension* **27**, 653-657
- Skatchkov, M., Larina, L.L., Larin, A.A., Fink, N., Bassenge, E. (1997)  
Urinary nitrotyrosine content as a marker of peroxynitrite-induced tolerance to organic nitrates.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2**, 85-96
- Soff, G.A., Cornwell, T.L., Cundiff, D.L., Gatey, S., Lincoln, T.M. (1997)  
Smooth muscle cell expression of type I cyclic GMP-dependent protein kinase is suppressed by continuous exposure to nitrovasodilators, theophylline, cyclic GMP, and cyclic AMP.  
*J. Clin. Invest.* **100**, 2580-2587
- Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (1994)  
Signal transduction and regulation in smooth muscle.  
*Nature* **372**, 231-236
- Stallone, J. (1993)  
Role of endothelium in sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta.  
*Am. J. Physiol.* **265**, H2073-H2080
- Stone, J.R., Marletta, M.A. (1994)  
Soluble guanylyl 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)  
Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase.  
*Biochemistry* **34**, 14668-14674

- 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 I $\alpha$ .  
*Science* **286**, 1583-1587
- Swei, A., Lacy, F., DeLano, F.A., Schmid-Schonbein, G.W. (1997)  
Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat.  
*Hypertension* **30**, 1628-1633
- Waldman, S.A., Rapoport, R.M., Ginsburg, R., Murad, F. (1986)  
Desensitization to nitroglycerin in vascular smooth muscle from rat and human.  
*Biochem. Pharmacol.* **35**, 3525-3531
- Walter, U. (1984)  
Cyclic GMP-regulated enzymes and their possible physiological functions.  
*Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphor Res.* **17**, 249-258
- Walter, U. (1989)  
Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system.  
*Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **113**, 41-88
- Walter, U., Eigenthaler, M., Geiger, J., Reinhard, M. (1993)  
Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* **344**, 237-249
- Wang, C., Chao, C., Chen, L.M., Cho, L., Chao, J. (1996)  
High-salt diet upregulates kininogen and downregulates tissue kallikrein expression in Dahl-SS and SHR rats.  
*Am. J. Physiol.* **271**, F824-F830
- Wedel, B., Humbert P., Harteneck, C., Foerster J., Malkewitz J., Böhme E., Schultz G., Koesling, D. (1994)  
Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2592-2596
- Wu, C.C., Ko, F.N., Kuo, S.C., Lee, F.Y., Teng, C.M. (1995)  
YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase.  
*Br. J. Pharmacol.* **116**, 1973-1978
- Wu, C.C., Ko, F.N., Teng, T.M. (1997)  
Inhibition of platelet adhesion to collagen by cGMP-elevating agents.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 412-416
- Yuen, P.S.T., Potter, L.R., Garbers, D.L. (1990)  
A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney.  
*Biochemistry* **29**, 10872-10878

- Zeiger, A.M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, Busse, R. (1995)  
Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells.  
*Circ. Res.* **76**, 980-986
- Zhao, Y., Hoganson, C., Babcock, G.T., Marletta, M.A. (1998)  
Structural changes in the heme proximal pocket induced by nitric oxide binding to soluble guanylate cyclase  
*Biochemistry* **37**, 12458-12464
- Zhou, H., Gao, Y., Raj, J.U. (1996a)  
Antenatal betamethasone therapy augments nitric oxide-mediated relaxation of preterm ovine pulmonary veins.  
*J. Appl. Physiol.* **80**, 390-396
- Zhou, X.B., Ruth, P., Schlossmann, J., Hofmann, F., Korth, M. (1996b)  
Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and chinese hamster ovary cells.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 19760-19767
- Zou, M., Jendral, M., Ullrich, V. (1999)  
Prostaglandin endoperoxide-dependent vasospasm in bovine coronary arteries after nitration of prostacyclin synthase.  
*Br. J. Pharmacol.* **126**, 1283-1292
- Zwiller, J., Revel, M.O., Malviya, A.N. (1985)  
Protein kinase C catalyzes phosphorylation of guanylate cyclase in vitro.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 1350-1353

## VIII Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1999 bis März 2001 am Institut für Kardiovaskuläre Physiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Alexander Mülsch und Herrn Prof. Dr. Martin Diener durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alexander Mülsch für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ausgezeichnete Betreuung und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener vom Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, schulde ich großen Dank für die Möglichkeit, diese Dissertation unter seiner Betreuung durchzuführen.

Frau Birgit Fichtlscherer, Herrn Dr. Stephan Klöß, Frau Dr. Bettina Bommarius, Herrn Meik Behrens und Herrn Dr. Alf Theisen danke ich für die schöne Zusammenarbeit, die kritische Durchsicht dieser Arbeit, ihre Geduld und große Hilfsbereitschaft bei allen labortechnischen Fragestellungen.

Auch Herrn Christoph Jannek danke ich für seine unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft sowie die schnelle Lösung aller EDV-Probleme.

Herrn Dr. Hanns Ackermann, Zentrum der Medizinischen Informatik, danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Wolfgang Linz und Frau Dr. Ursula Schindler der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen möchte ich mich bei Frau Luise Reinsberg bedanken.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Kardiovaskuläre Physiologie gilt mein Dank für die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen Tips während meiner praktischen Tätigkeit.

Mein tiefster Dank gilt meiner Cousine Monika und meiner Freundin Esther für die Kraft, die sie mir gaben, diesen Weg zu gehen, sowie die liebevolle Unterstützung in allen Lebensfragen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, daß sie mir eine Ausbildung in diesem Rahmen ermöglicht haben.