

Aus dem
Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Hamburg
Direktor: Professor Dr. med H. Scholz

Untersuchungen zur Expression NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase
am Herz-Kreislaufsystem

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Bettina Knauf
aus
Hamburg

Hamburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
am: 15. Nov. 2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Universität Hamburg
Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß
Referent: Prof. Dr. H. Scholz
Korreferent:--
Tag der mündlichen Prüfung:--

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BNP	neuronales natriuretisches Peptid
bp	DNA-Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
cRNA	komplementäre RNA
cpm	registrierte Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
Fa.	Firma
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
M	Mol / Liter (molar)
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
³² P	Phosphor 32
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
RPA	RNase Protection Assay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	Tris-buffered-saline-tween
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UTP	Uridin-5'-triphosphat

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. EINLEITUNG	6
1.1. Stickstoffmonoxid-haltige Pharmaka	6
1.2. Stickstoffmonoxid (NO) und die NO-Synthase	7
1.3. Lösliche Guanylyl-Cyclasen	8
1.3.1. Primärstruktur	8
1.3.2. Aktivatoren	8
1.3.3. Aktivierungsmechanismus	9
1.3.4. cGMP-Biosynthese	10
1.4. Partikuläre Guanylyl-Cyclasen	10
1.5. Biologische Funktionen von cGMP	11
1.5.1. cGMP-abhängige Proteinkinasen	11
1.5.2. cGMP-regulierte Phosphodiesterasen	12
1.5.3. cGMP-regulierte Ionenkanäle	12
1.6. Zielsetzung	12
1.7. Fragestellung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Material	14
2.1.1. Chemikalien, Enzyme, Vektoren und Bakterien	14
2.1.2. Hilfsmittel und Geräte	15
2.1.3. Versuchstiere	15
2.2. Methoden	16
2.2.1. RNA-Präparation mit RNazol	16
2.2.2. RNA-Elektrophorese im Agarose-Gel	16
2.2.3. RT-PCR	17
2.2.4. Agarose-Gel-Elektrophorese	18
2.2.5. Elution von cDNA aus Agarosegelen nach QIAEX II	19
2.2.6. Ligationen: Klonieren von cDNA-Fragmenten in den Transkriptionsvektor pCR II	19
2.2.7. Transformation kompetenter E. coli	20
2.2.8. TELT-Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli	20
2.2.9. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	21
2.2.10. Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA	21
2.2.11. Linearisieren des Transkriptionsvektors	22
2.2.12. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	22
2.2.13. Herstellung der markierten cRNA-Probe durch in-vitro-Transkription	23

2.2.14. RNA-Elektrophorese im Polyacrylamidgel	24
2.2.15. RNase Protection Assay	25
2.2.15.1. Hybridisierung der markierten Sonde mit der mRNA-Probe	25
2.2.15.2. RNase Verdau und Detektion	25
2.2.16. Gewinnung cytosolischen Proteins	26
2.2.17. Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.2.18. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	27
2.2.19. Immunoblot	28
2.2.20. Versuchskontrolle durch Peptidverdrängung	29
2.2.21. Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose	29
2.2.22. Guanylyl-Cyclase-Assay	30
3. ERGEBNISSE	33
3.1. Herstellung von cRNA-Sonden	
3.1.1. RT-PCR	33
3.1.2. Herstellung von linearisierten Transkriptionsvektoren	33
3.1.3. In-vitro Transkription	33
3.2. Qualitativer Nachweis von mRNA und Nachweis der kardialen Hypertrophie der SHR-Ratten	35
3.2.1. Qualitätsnachweis der gesamt RNA-Präparation	35
3.2.2. Nachweis der kardialen Hypertrophie der SHR-Ratten	35
3.2.3. Nachweis der Hypertrophie anhand der Messung der BNP-Expression im RNase Protection Assay	36
3.3. Expression der α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 -Untereinheiten in den Herzen, Nieren und Aorten von Ratten und im menschlichen Herzen	37
3.4. Nachweis der exprimierten β_1 -Untereinheit im Immunoblot	37
3.5. Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität am menschlichen Herzen	38
3.5.1. Reinigung cytosolischer Guanylyl-Cyclase	38
3.5.2. Stimulierbarkeit der cytosolischen Guanylyl-Cyclase am menschlichen Herzen	38
3.6. Abbildungen	39
4. DISKUSSION	51
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	58

1. EINLEITUNG

Zur Behandlung der Angina pectoris eingesetzte Pharmaka wie Glyceroltrinitrat wirken über eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Dieses Signalmolekül aktiviert als wichtigsten physiologischen Rezeptor die lösliche Guanylyl-Cyclase. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Untereinheiten dieses Enzyms mittels molekularbiologischer Methoden in Geweben des Herz-Kreislaufsystems untersucht.

1.1. Stickstoffmonoxid-haltige Pharmaka

NO-haltige Pharmaka werden schon seit hundert Jahren in der Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. 1867 entwickelte Alfred Nobel das Dynamit, eine Mischung von Nitroglycerin mit Kieselgur. William Murrell begründete 1879 die Anwendung von Nitroglycerin als Arzneistoff bei Angina pectoris (Murrell 1879). Zu den NO-haltigen Pharmaka gehören NO-enhaltende bzw. NO-freisetzende Substanzen wie organische Nitrate (z. B. Glyceroltrinitrat), organische Nitrite (z. B. Amylnitrit), Metall-Nitroso-Komplexe (z. B. Natriumnitroprussid) und Sydnominine (z. B. 3-Morpholino-Sydnonimin). Alle NO-haltigen Pharmaka bewirken über eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und zum Teil eine Hemmung der Thrombozytenaggregation (Böhme et al. 1978, Murad et al. 1978, Böhme et al. 1981). In der Therapie der Angina pectoris sind organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat, Isosordidmononitrat und Isosordiddinitrat weit verbreitet (Übersicht bei Fülgraff und Palm 1997, Scholz und Schwabe 2000). Glyceroltrinitrat ist im akuten Angina pectoris Anfall aufgrund seiner schnellen perlingualen Resorption das Mittel der Wahl. Isosorbiddinitrat und Isosorbidmononitrat spielen in der Anfallsprophylaxe eine wichtige Rolle, da sie über eine lange Wirkdauer von 8-10 Stunden verfügen. Sie sind insbesondere bei gleichzeitiger Herzinsuffizienz indiziert. Die VHEFT-Studie (Veterans Cooperative Heart Failure Trial) zeigte einen signifikanten Überlebensvorteil und eine signifikant bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion in einer 3-Jahresbehandlung bei Patienten mit milder bis moderater systolischer Herzinsuffizienz durch die Kombination von Hydralazin und Isosorbiddinitrat im Vergleich zu Plazebo (Cohn et al. 1986). Die anti-anginöse Wirkung organischer Nitrate beruht auf der Erschlaffung glattmuskulärer Gewebe. Sie führt vor allem zu einer Erweiterung der venösen Kapazitätsgefäße und, weniger ausgeprägt, zu einer Abnahme des arteriellen Widerstandes. Die resultierende Senkung vor allem der Vorlast des Herzens vermindert den myokardialen Sauerstoffbedarf und begründet die Anwendung organischer Nitrate bei koronarer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz. Unerwünschte Wirkungen aller Nitrate sind Kopfschmerzen, reflektorische Tachykardie, Blutdruckabfall und Schwindel (Scholz und Schwabe 2000). Unter Dauertherapie entwickelt sich zunehmend eine Toleranz. Die genauen Mechanismen dieser Toleranzentwicklung sind noch nicht geklärt. Neuere Untersuchungen

deuten darauf hin, daß die Toleranzentwicklung möglicherweise auf einer erhöhten Produktion von Superoxid und Endothelin in den Myozyten der Gefäßwand beruht (Muenzel et al. 1996). Durch ungleiche Dosierungsintervalle und möglichst niedrige Dosen läßt sich eine Toleranzentwicklung weitgehend vermeiden. Zur Überbrückung eines zu langen Dosierungsintervalls bietet sich eine Kombination mit Molsidomin an, das einer vergleichsweise niedrigeren Toleranzentwicklung unterliegen soll, weil die Freisetzung des wirksamen NO nicht enzymatisch erfolgt (Fülgraff und Palm 1997, Scholz und Schwabe 2000).

1.2. Stickstoffmonoxid (NO) und die NO-Synthase

Furchgott und Zawadzki zeigten 1980 *in vitro*, daß bestimmte vasodilatatorische Substanzen, z.B. Acetylcholin, nach Entfernung des Gefäßendothels ihre relaxierende Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur verlieren. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß diese gefäßerweiternden Stoffe nicht direkt auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand einwirken, sondern die Endothelzellschicht zur Freisetzung einer damals noch unbekanntes, gefäßerweiternden Substanz anregen. Parallel wiesen Mitte der achtziger Jahre zwei Arbeitsgruppen nach, daß die Gefäßerweiterung dieser als "endothelium-derived relaxing factor", kurz EDRF, bezeichneten Substanz, über eine direkte Aktivierung der cytosolischen Guanylyl-Cyclase vermittelt wird (Förstermann et al. 1986, Ignarro et al. 1986). EDRF wurde mittlerweile als NO-haltige Substanz identifiziert (Palmer et al. 1987). Ob es sich bei EDRF um freies NO handelt oder um eine labile NO-haltige Substanz ist jedoch umstritten (Furchgott et al. 1988, Myers et al. 1990, Moncada et al. 1991, Stamler et al. 1992, Gaston et al. 1993). 1982 wurde ein stimulatorischer Effekt der Aminosäure L-Arginin auf die cGMP-Synthese festgestellt (Degushi und Yoshioka 1982). Dieser Befund wurde erst einige Jahre später erklärbar, als L-Arginin als Substrat eines NO-bildenden Enzyms, der sogenannten NO-Synthase, identifiziert wurde (Hibbs et al. 1987, Marletta et al. 1988, Palmer et al. 1988, Schmidt et al. 1988). NO-Synthasen (NOS), die die Umsetzung von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin und NO katalysieren, benötigen NADPH und Tetrahydrobiopterin als Kofaktoren und enthalten FAD, FMN und eine prosthetische Hämgruppe (Mayer et al. 1990, Klatt et al. 1992). Nach den Kriterien der Gewebeverteilung und Regulation ihrer Aktivität werden die NO-Synthasen in drei Isoformen unterschieden. Die erste, eine konstitutiv aktive Isoform, wird durch Ca^{2+} und Calmodulin reguliert und wurde in Hirnzellen entdeckt (NOS-I oder nNOS). Eine weitere konstitutiv aktive Isoform benötigt ebenfalls einen Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex zur Aktivierung, wurde aber in Endothelzellen entdeckt (NOS-III oder eNOS). Die dritte Isoform ist Ca^{2+} -unabhängig, da sie an Calmodulin gebunden vorliegt. Sie wurde bisher aus Makrophagen, glatter Muskulatur und Hepatozyten isoliert (NOS-II oder iNOS). Die NO-Produktion wird über verschiedene Rezeptoragonisten (z.B. Acetylcholin, Peptide, ATP, ADP) aber auch durch Scherkräfte des fließenden Blutes gesteigert. Das synthetisierte NO kann aufgrund seines geringen hydrodynamischen Radius und elektrischen

Neutralität ungehindert durch Zellen und ihre Membranen diffundieren. So wird zum Beispiel die lösliche Guanylyl-Cyclase einer glatten Muskelzelle durch das aus benachbarten Endothelzellen herüberdiffundierte NO aktiviert.

1.3. Lösliche Guanylyl-Cyclasen

Nachdem 1963 das cyclische GMP (Ashman et al. 1963) nachgewiesen wurde, gelang es 1969 mehreren Arbeitsgruppen, die Guanylyl-Cyclase zu identifizieren (Ishikawa et al. 1969, Hardman und Sutherland 1969, White und Auerbach 1969, Schultz et al. 1969). Mitte der siebziger Jahre wurde in drei Studien gezeigt, daß die lösliche und die partikuläre Guanylyl-Cyclase zwei verschiedene Proteine sind (Kimura und Murad 1974, Garbers et al. 1974, Chrisman et al. 1975).

1.3.1. Primärstruktur

Zunächst wurden die Aminosäuresequenzen der 70 kDa-schweren β_1 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase aus Rinderlunge (Koesling et al. 1988) und aus Rattenlunge (Nakane et al. 1988) identifiziert und die zugehörigen cDNA-Sequenzen kloniert. Die ermittelten Sequenzen von Ratte und Rind sind weitgehend identisch und unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren. Zwei Jahre später wurden auch die 73 kDa schwere α_1 -Untereinheit aus Rinderlunge (Koesling et al. 1990) und die 82 kDa schwere α_1 -Untereinheit aus Rattenlunge (Nakane et al. 1990) aufgeklärt. Obwohl jede der Untereinheiten eine katalytische Domäne besitzt, ist die Heterodimerisierung Voraussetzung für ihre enzymatische Aktivität (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991). Zwei weitere Untereinheiten, α_2 und β_2 , wurden im menschlichen foetalen Gehirn und in der Rattenniere identifiziert (Harteneck et al. 1991, Yuen et al. 1990). Die 1992 von Giuli und Mitarbeitern aus humanem Hirn isolierten Untereinheiten α_3 und β_3 (81kDa und 70 kDa) sind aufgrund ihrer großen Homologie zu den α_1 - und β_1 -Untereinheiten nur als die humanen Homologe der α_1 und β_1 Untereinheiten zu betrachten. Die humanen α_3 - und β_3 -Untereinheiten wurden bisher mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen sowie in frisch gewonnener Gewebekultur von Gefäßmuskulatur nachgewiesen (Papapetropoulos et al. 1996). Die von Giuli und Mitarbeitern 1993 beschriebene Kolo-kalisation der α_3 - und β_3 -Untereinheiten auf Chromosom 4 bei q31.3-q33 wurde von Behrends und Mitarbeitern bestätigt (Behrends et al. 2000).

1.3.2. Aktivatoren

Anfang der siebziger Jahre konnte gezeigt werden, daß verschiedene Hormone und Neurotransmitter wie Acetylcholin, Serotonin, Bradykinin, Histamin sowie ATP in intakten Zellen über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Synthese von cGMP steigern können (Waldmann und Murad 1987). Den ersten direkten Stimulator der cytosolischen Guanylyl-Cyclase fand man durch Zufall, als man bei der Messung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität Natriumazid als GTPase-Inhibitor einsetzte, um die Substratkonzentrationen konstant zu halten (Kimura et al. 1975). Zwei Jahre später wurde der aktivierende Effekt NO-haltiger Pharmaka auf die lösliche Guanylyl-Cyclase nachgewiesen (Arnold et al. 1977, Böhme et al. 1978). Ein stimulatorischer Effekt auf die lösliche Guanylyl-Cyclase wurde außerdem für Kohlenmonoxid (CO) (Brüne et al. 1990, Brüne und Ullrich 1988, Utz und Ullrich 1991), Protoporphyrin IX (Ignarro et al. 1982, Ignarro et al. 1984) und Arachidonsäure (Asano und Hidaka 1977, Graff et al. 1978, Gerzer et al. 1986) beschrieben. In vitro ist CO verglichen mit NO ein sehr viel schwächerer Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase. Am gereinigten Enzym führt CO bei einem Partialdruck von 100 % zu einer 4-5 fachen Aktivierung, während NO bereits bei einem Partialdruck von 0,5 % eine 200-400 fache Steigerung der katalytischen Aktivität verursacht. Daher ist es unwahrscheinlich, daß physiologische CO-Konzentrationen das Enzym nennenswert aktivieren (Stone et al. 1994). In vitro ist CO in Anwesenheit von YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol] jedoch ein potenter Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase, der mit NO vergleichbar ist (Friebe et al. 1996). YC-1 ist ein reversibler Koaktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase, der nicht auf NO-Freisetzung, sondern auf Stabilisierung der löslichen Guanylyl-Cyclase in ihrer aktiven Konfiguration basiert (Friebe et al. 1996). Frühe Hinweise darauf, daß die enzymatische Aktivität der cytosolischen Guanylyl-Cyclase vom Redoxzustand des Enzyms abhängt (Böhme et al. 1974, Goldberg et al. 1978, Haddox et al. 1978), führten zu der Hypothese, daß SH-Gruppen bei der Aktivierung/Deaktivierung des Enzyms eine wichtige Rolle spielen. SH-Gruppen-modifizierende Verbindungen haben abhängig vom vorliegenden Redoxzustand des Enzyms einen stimulatorischen oder hemmenden Effekt auf die Guanylyl-Cyclase-Aktivität (Brandwein et al. 1981, Tsai et al. 1981, Niroomand et al. 1989, Wu et al. 1992).

1.3.3. Aktivierungsmechanismus

Ende der siebziger Jahre wurde gezeigt, daß der während der Reinigung der löslichen Guanylyl-Cyclase beobachtete Verlust der Stimulierbarkeit durch NO-freisetzende Substanzen mit Hilfe von zugesetztem Häm oder hitzeinaktivierten Hämoproteinen teilweise wiederhergestellt werden konnte (Craven et al. 1978, Craven et al. 1979). Ob die Häm-Gruppe eine physiologische Rolle bei der Aktivierung des Enzyms spielt, blieb jedoch unklar. Erst als

es gelang ein durch Natriumnitroprussid stimulierbares Enzym zu isolieren, stellte man fest, daß die gereinigte Guanylyl-Cyclase die biochemischen Charakteristika eines Hämoproteins aufweist (Gerzer et al. 1981). Durch chromatographische Trennung in hämfreie und hämhaltige Guanylyl-Cyclase konnte gezeigt werden, daß die hämhaltige Präparation durch NO-freisetzende Substanzen stimuliert wurde, während die hämfreie Präparation nur geringfügig über die basale Aktivität hinaus durch NO stimulierbar war (Gerzer et al. 1982). Daraus folgerte man, daß die Häm-Gruppe das Rezeptormolekül für NO darstellt und bei der Übertragung des stimulatorischen Effektes eine wichtige Rolle spielt. Protoporphyrin IX, das eisenfreie Vorläufermolekül des Häm, wurde als ein sehr potenter Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase gefunden (Ignarro et al. 1982, Ignarro et al. 1984). Ignarro et al. stellten daraufhin eine Hypothese für die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase durch NO auf. Danach binden NO-haltige Pharmaka an das zentrale Eisenatom der Guanylyl-Cyclase, wodurch das Eisenatom aus der Molekülebene des Porphyrins gezogen wird und eine dem Protoporphyrin IX ähnliche Struktur entsteht, die das heterodimere Enzymprotein über eine Konformitätsänderung aktiviert (Ignarro et al. 1984, Ignarro et al. 1991).

1.3.4. cGMP-Biosynthese

Die Umwandlung von GTP zu cGMP durch die lösliche Guanylyl-Cyclase findet in Anwesenheit divalenter Kationen unter Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat statt (Garbers et al. 1975). Als Kationen wirken Mn^{2+} und Mg^{2+} , aufgrund der höheren intrazellulären Konzentration von Mg^{2+} ist dieses wohl der physiologisch wichtigere Kofaktor. Sowohl in Membranpräparationen als auch im Cytosol verschiedener Gewebe wurde Guanylyl-Cyclase-Aktivität nachgewiesen (Chrisman et al. 1975, Kimura und Murad 1975, Garbers und Radany 1981). In fast allen untersuchten pro- und eukaryontischen Zellen konnte cGMP nachgewiesen werden. Die intrazellulären cGMP-Konzentrationen liegen in den meisten Zellarten im Bereich von 10^{-7} M und damit etwa eine Zehnerpotenz unter den intrazellulären cAMP-Konzentrationen der entsprechenden Zellen. Der relative Anteil der löslichen bzw. partikulären Guanylyl-Cyclase ist für verschiedene Zellarten charakteristisch (Waldman und Murad 1987). Zum Beispiel überwiegt in Thrombozyten die lösliche Guanylyl-Cyclase (Böhme et al. 1974), während in Darmmukosazellen und in der Retina hauptsächlich die partikuläre Guanylyl-Cyclase gefunden wird (De Jonge 1975, Fleischmann und Denisevich 1979).

1.4. Partikuläre Guanylyl-Cyclasen

Die partikulären Guanylyl-Cyclasen bestehen aus einer einfach transmembranären Polypeptidkette. Die transmembranäre Region trennt die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne von dem intrazellulären Bereich, der sich wiederum aus einer

Domäne mit Ähnlichkeit zu Proteinkinasen und einer C-terminalen, putativ katalytischen Domäne zusammensetzt. Zu den Aktivatoren von partikulären Guanylyl-Cyclasen gehören die aus Seeigel isolierten chemotaktischen Peptide Resact und Speract und die aus Säugetieren isolierten Peptide mit natriuretischer Wirkung wie ANP, BNP und CNP, und Peptide wie das hitzestabile Enterotoxin von *E.coli*, die die Salz- und Wasserresektion des Darmes beeinflussen (Hansbrough und Garbers 1981, Hamet et al. 1984, Waldman et al. 1984, Winqvist et al. 1984, Kambayashi et al. 1990, Koller et al. 1991, Field et al. 1978, Hughes et al. 1978). Der erste Vertreter der partikulären Guanylyl-Cyclasen wurde 1976 aus Seeigelspermien gereinigt (Garbers 1976). Im Jahre 1988 gelang es anhand von Peptidsequenzen des gereinigten Proteins, die cDNA, die für diese partikuläre Guanylyl-Cyclase aus Seeigelspermien kodiert, zu klonieren und zu sequenzieren (Singh et al. 1988). Homologiescreening mit dieser cDNA an Geweben der Ratte führte zur Entdeckung des ANP-Rezeptors GC-A (Chinkers et al. 1989, Duda et al. 1991, Yamagushi et al. 1991). Der ANP-Rezeptor wurde später auch in menschlichem Gewebe (Lowe et al. 1989) und Mäusegewebe (Pandey und Singh 1990) identifiziert. Mit dem GC-B- und dem GC-C-Rezeptor wurden später weitere Isoformen der partikulären Guanylyl-Cyclase gefunden (Chang et al. 1989, Schultz et al. 1989, Schultz et al. 1990).

1.5. Biologische Funktionen von cGMP

Als gesicherte physiologische Funktionen des cGMP gelten die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Diamond 1978, Axelsson et al. 1979), die Hemmung der Plättchenaggregation (Böhme et al. 1974, Haslam et al. 1978, Mellion et al. 1981), die Beeinflussung der Natrium- und Wasserabsorption im distalen Tubulus der Niere (Flynn et al. 1983), die Beteiligung am Sehprozeß (Stryer et al. 1981, Fesenko et al. 1985, Nakatani und Yau 1985) und an der von Enterotoxinen aus *E. coli* verursachten Diarrhoe (Field et al. 1978, Hughes et al. 1978). Ein modulierender Einfluß von Ca^{2+} auf die cGMP-vermittelte Reaktion ist in vielen Fällen beschrieben worden (Katsuki et al. 1977, Takai et al. 1982, Koch and Stryer 1988). Als Effektoren des intrazellulären Signalmoleküls cGMP wurden die cGMP-abhängigen Proteinkinasen, die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen und die cGMP-regulierten Ionenkanäle beschrieben (Lincoln und Cornwell 1993).

1.5.1. cGMP-abhängige Proteinkinasen

cGMP-abhängige Proteinkinasen werden in zwei Subtypen unterschieden, wobei die Typ-I-Form in hohen Konzentrationen in glatten Gefäßmuskelzellen, Thrombozyten und im Kleinhirn vorhanden ist (Walter et al. 1981), während die Typ-II-Form nur in intestinalen Epithelzellen gefunden wurde (de Jonge 1981). Die Typ-I-Form, deren Typ-I α - und Typ-I β -Isoformen kloniert und sequenziert wurden (Wernet et al. 1989, Sandberg et al. 1989), stellt

ein Dimer aus identischen Untereinheiten dar, die sowohl cGMP-bindende als auch katalytische Aktivität besitzen (Takio et al. 1984). Man nimmt an, daß die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und die Hemmung der Plättchenaggregation durch Phosphorylierung von Proteinen an Serin- und Threoninresten (Ives et al. 1980, Aswad und Greengard 1981, Rapoport et al. 1982, Rapoport et al. 1983, Sarcevic et al. 1989, Halbrugge et al. 1990, Cornwell et al. 1991, Yoshida et al. 1991) und nachfolgende Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgt (Felbel et al. 1988, Cornwell und Lincoln 1989). Vermehrtes Ausschleusen von Ca^{2+} mittels Ca^{2+} -ATPase aus der Zelle, Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum mittels Ca^{2+} -ATPase sowie verminderte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Hemmung der IP_3 -Produktion werden als mögliche Mechanismen diskutiert (Ruth et al. 1993).

1.5.2. cGMP-regulierte Phosphodiesterasen

Sie katalysieren den Abbau cyclischer Nukleotide und unterscheiden sich in ihrer Regulation, Substratspezifität und Kompartimentierung (Beavo und Reifsnyder 1990, Lincoln und Cornwell 1993). Die lösliche, cGMP-stimulierte Phosphodiesterase wird durch Bindung von cGMP an die nicht-katalytische cGMP-Bindungsstelle aktiviert und setzt dann cAMP und cGMP um. Im Zellmodell konnte ein direkter Effekt auf die Regulation des cAMP-Spiegels nachgewiesen werden (Whalin et al. 1991). Die cGMP-bindende/cGMP-spaltende-Phosphodiesterase kann cGMP als allosterischen Effektor binden, ohne daß ihre Aktivität dadurch beeinflußt wird. Die Plasmamembran-gebundene cAMP-Phosphodiesterase hydrolysiert ausschließlich cAMP und wird in ihrer Aktivität durch cGMP gehemmt, was im Sinne einer physiologischen Rückkopplung zwischen den funktionell antagonistischen Molekülen cAMP und cGMP interpretiert werden könnte.

1.5.3. cGMP-regulierte Ionenkanäle

Die ersten Ionenkanäle wurden in Photorezeptoren (Cook et al. 1987) und olfaktorischen Neuronen (Nakamura und Gold 1987) gefunden. 1992 konnten dann cDNA-Klone aus Herz und Niere isoliert werden (Stanton und Karlson 1992). Über die Funktion der Kanäle in nicht-sensorischen Geweben gibt es bisher nur Spekulationen. Verschiedene Effekte von cGMP bewirken sowohl einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Aktivierung cGMP-regulierter Kationenkanäle) als auch einen Abfall (cGMP-abhängige Proteinkinasen).

1.6. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Expression der Isoformen der Guanylyl-Cyclase an Geweben des Herz-Kreislaufsystems näher zu untersuchen. Dafür sollten auch die Methoden zum Nachweis von löslicher Guanylyl-Cyclase am Herzkreislaufsystem etabliert und dafür benötigte Sonden kloniert werden.

1.7. Fragestellung

Die Fragestellungen im Einzelnen:

- Welche Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase werden am menschlichen Herzen und am Herzen der Ratte exprimiert?
- Wie verhält sich die pharmakologische Beeinflussbarkeit des aus menschlichem Herzen isolierten Enzyms gegenüber der NO-freisetzenden Substanz DEA / NO beziehungsweise dem Hämvorläufermolekül Protoporphyrin IX?
- Lassen sich in einem Tiermodell der Hypertonie und kardialen Hypertrophie Hinweise auf eine Regulation von Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase zeigen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Enzyme, Vektoren und Bakterien

Alle Substanzen und Hilfsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, mit der höchsten im Handel erhältlichen Reinheit verwendet.

Agarose	Biorad (München)
Ampli-Taq-Gold	Perkin Elmer (Norwalk, USA)
ATP	Boehringer (Mannheim)
Bradfordreagenz	Biorad (München)
CTP	Boehringer (Mannheim)
DNase I	Boehringer (Mannheim)
DNA-Ligase T4	Boehringer (Mannheim)
ECL-Kit:	Amersham (Braunschweig)
E.coli	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Entwickler G 150	Agfa Gevaert (Belgien)
Ethanol (100 %)	UKE-Apotheke, Hamburg
Fixierer G 350	Agfa-Gevaert (Belgien)
GTP	Boehringer (Mannheim)
Long Ranger Gel Solution	AT Biochem, Malvern, PA, USA
Natriumdodecylsulfat	Biorad (München)
pCRII	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Proteinase K (10 U/μl)	Boehringer (Mannheim)
Restriktionsenzyme	Boehringer (Mannheim)
	New England Biolabs (Bad Schwalbach)
	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Restriktionspuffer	Boehringer (Mannheim)
	New England Biolabs (Bad Schwalbach)
	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Reverse Transkriptase	Gibco
Ribonuklease A	Boehringer (Mannheim)
Ribonuklease T1	Boehringer (Mannheim)
RNA-Polymerase SP6 (10 U/μl)	Boehringer (Mannheim)
RNA-Polymerase T7 (10 U/μl)	Boehringer (Mannheim)
RNase A	Boehringer (Mannheim)
RNase Inhibitor (20 U/μl)	Boehringer (Mannheim)
RNazol	WAK Chemie (Bad Homburg)
SP6-RNA-Polymerase	Boehringer (Mannheim)
T7-RNA-Polymerase	Boehringer (Mannheim)
Transkriptionspuffer	Boehringer (Mannheim)
TEMED	Biorad (München)
Tissue Tek	Miles Inc. (Eikhart, IN, USA)
Transfer RNA	Boehringer (Mannheim)
tRNA	Boehringer (Mannheim)
Urea	Biorad (München)
UTP	Boehringer (Mannheim)
³² P-UTP	NEN

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.2. Hilfsmittel und Geräte

Agarosegelkammern	Biorad (München)
Aqua ad injectabilia	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Analysenwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Beckmann Zentrifuge (J2-21)	Beckmann (Palo Alto, USA)
Beckmann Zentrifuge (J6-B)	Beckmann (Palo Alto, USA)
Blotkammer	Biorad (München)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Einwegpipetten (10 ml; 25 ml) steril	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektrophoresekammern (SDS)	Biorad (München)
Elektrophoresekammern (RPA)	Life Technologies (Eggenstein)
Eppendorfgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen (50 ml)	Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg)
Filmmaterial (X-OMAT)	Kodak (Stuttgart)
Filterpapier 3MM	Whatman (Maidstone, UK)
Geltrockner	Biorad (München)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Hybond-Nylon-Membran (Nytran, 0,2 µm)	Schleicher und Schuell (Dassel)
Hybridisierungsöfen	Appligene (Hamburg)
Kanülen (0,9 x 40 mm)	Braun (Melsungen)
Kühlschrank	Bosch (Stuttgart)
Kühltruhe (-80 °C; -20 °C)	Kryotec (Hamburg)
Kühlzentrifuge	Hettich (Tuttlingen)
Magnetrührer	Heidolph (Kelheim)
Nitrocellulose (Protran, 0,45 µm)	Schleicher und Schuell (Dassel)
Parafilm	American National Can (USA)
PCR-Heizblock Hybaid	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym (Oldendorf)
Pipettenspitzen (1 ml; 100 µl; 10 l)	Treff Lab (Degersheim, Schweiz)
Polytron	Kinematika (Luzern, Schweiz)
Power Supply	Biorad (München)
Sarstedt Röhrchen	Sarstedt (Heidelberg)
Schüttelinkubator	GFL (Burgwedel)
Schüttelinkubator für Bakterienkulturen	Teq, CFL Laborgeräte (Emersacker)
Spektrophotometer	Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Szintillationszähler	Beckmann (Palo Alto, USA)
Ultrazentrifuge (Centricon T-2170)	Kontron Instruments (Mailand, Italien)
UV-Stratalinker	Stratagen (Amsterdam, Niederlande)
UV-Transilluminator	Bachhofer (Reutlingen)
Vortexer	Heidolph (Kelheim)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)

2.1.3. Versuchstiere

Männliche Wistar-Ratten (WKY, n = 14) und männliche spontan hypertensive Ratten (SHR, n = 14) der Fa. Wiga wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin^R) und Leitungswasser ad libitum gehalten. Das Gewicht der Tiere betrug 301-350 g. Die Tiere wurden nach CO₂-Narkose durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurde das Herz aus dem Herzbeutel gelöst, vom Gefäßstamm abgetrennt und entnommen. Das Herz wurde in 0.9 % NaCl für 1 min vom Blut befreit, getrocknet, anschließend gewogen und in

flüssigem Stickstoff gefroren. Auch Aorta und Nieren wurden präpariert und tiefgefroren. Die Organe wurden bei -80 °C gelagert.

2.2. METHODEN

2.2.1. RNA-Präparation mit RNazol

Es wurde das Reagenziensystem RNazol der Fa.WAK-Chemie Medical GMBH verwendet. 150-200 mg Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff zunächst mit Metallstößel und Mörser zerkleinert und anschließend zusammen mit 4 ml eisgekühlter RNazol-Lösung in ein 10 ml Polypropylen Reaktionsgefäß aufgenommen. In drei Intervallen wurde der Ansatz mit Hilfe eines "Polytron" Homogenisators je 15 s bei Stufe 5 homogenisiert. Zur Extraktion der RNA wurden dem Ansatz 0,4 ml Chloroform hinzugefügt. Der Ansatz wurde 15 s geschüttelt, anschließend 5 min auf Eis gestellt und dann 15 min bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge mit 12000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß 1 : 1 mit Isopropanol gemischt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 4 °C inkubiert und die präzipitierte RNA wurde anschließend für 15 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, verblieb die RNA als weiß-gelbes Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes. Die RNA wurde nun durch Zugabe von 400 µl Ethanol (75 %), Mischen und Zentrifugation von Salzen gereinigt, bei 4 °C im Exsikkator getrocknet und in 100 µl RNase-freies, demineralisiertes H₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde am Photometer in Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 25 entspricht einer RNA-Konzentration von 1 mg / ml. Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD 260 / OD 280 gebildet. Zur Kontrolle der Integrität der RNA-Probe wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Die RNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2. RNA-Elektrophorese im Agarose-Gel

Benötigte Lösungen:

10 x MOPS-Puffer:

0,2 M MOPS
0,05 M Natriumacetat
0,01 M EDTA
pH 7,0

Denaturierungspuffer:

1,3 x MOPS-Puffer
8,7 % Formaldehyd, säurefrei
63,3 % Formamid, deionisiert

Durch RNA-Agarosegel-Elektrophorese wurde die Integrität der einzelnen RNA-Proben kontrolliert (Maniatis et al. 1982). Das Agarosegel wurde aus 1 % (w / v) Agarose, MOPS-Puffer und 2 % Formaldehyd zubereitet, in einer Mikrowelle gekocht und anschließend auf 50 °C abgekühlt. Erst dann wurde das hitzeinstabile Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,07 µg / ml hinzugegeben und das Gel in eine vorbereitete Elektrophoresekammer gegossen. Die Gelkammern wurden mit MOPS-Puffer gefüllt und in jede Spur ein Ansatz bestehend aus 5 µg RNA und 2 µl Denaturierungspuffer aufgetragen. Die Auftrennung der RNA erfolgte analog den in 2.2.4. beschriebenen DNA-Agarosegelen. Die Laufzeit der Gele betrug bei einer Spannung von 80 - 120 Volt 30 - 90 min. Zur Dokumentation wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator photographiert. Diese Photographien erlaubten eine Beurteilung der Präparation und sollten Aufschluß über möglichen Abbau durch RNasen und Verunreinigung der RNA geben. Darüberhinaus erlaubte das Gel eine ergänzende Kontrolle der über die optische Dichte ermittelten RNA-Konzentrationen.

2.2.3. RT-PCR

Es wurde das Reagenziensystem "RT-PCR Kit" der Fa. Stratagene verwendet. Um die benötigte DNA zu gewinnen, wurde die als Matrize dienende RNA zunächst durch eine reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Jeder Ansatz enthielt 5 µl RNA und wurde durch Zugabe von Diethylpyrocarbonatwasser auf ein Gesamt-Volumen von 38 µl gebracht. Anschließend wurden 3 µl Random-Primer hinzugefügt und der Ansatz für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz wurde dann für zehn Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 5 µl First Strand Buffer, 1 µl RNasin, 2 µl dNTP und 1 µl Reverse Transkriptase wurde der Ansatz bei 37 °C für eine Stunde dreißig Minuten bei 42 °C und dann für fünf Minuten bei 90 °C inkubiert. Die PCR wurde 1985 von Mullis entwickelt und ist ein in vitro-Verfahren zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei wird der DNA-Doppelstrang mit der zu amplifizierenden Sequenz im ersten Schritt durch Erhitzen in die Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt werden synthetische Oligonukleotide, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren ("sense" und "antisense"), an die komplementären Bereiche des jeweiligen DNA-Einzelstranges hybridisiert. Im dritten Schritt dienen die so entstandenen doppelsträngigen Bereiche als Startpunkt für eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die Einzelstrangbereiche werden durch Einbau von Nukleotiden zum Doppelstrang vervollständigt. Durch Wiederholung dieser Schritte verdoppelt sich die DNA nach jedem Zyklus, so daß eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Bereichs auf 2^n DNA-Moleküle nach n Zyklen resultiert. Bei unseren Experimenten betrug die Endkonzentrationen im Gesamtansatz 50 µl: 1 µl cDNA-Ansatz, 1 x PCR-Puffer, 1 µM Primer A, 1 µM Primer B, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ und 1,25 U / µl AmpliTaqGold. Nach Zugabe der Taq-Polymerase wurde der Ansatz mit 40 µl Mineralöl überschichtet und in einem Thermocycler 30 Zyklen (94 °C, 60 s; 50 °C, 60 s; 72 °C, 60 s)

unterworfen. Anschließend wurden die PCR-Ansätze über Agarosegelelektrophorese wie in 2.3.2. beschrieben aufgetrennt.

2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Benötigte Lösungen:

<u>TBE-Puffer :</u>	90 mM	Tris HCl
	2,5 mM	EDTA
	90 mM	Borsäure
	pH 8,0	

<u>DNA-Probenpuffer:</u>	1 %	Bromphenolblau
	1 %	Xylencyanid
	50 %	Glycerin
	TBE	

DNA-Fragmente können nach einer Methode von Aaji, C. und Borst, P. (1972) ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die DNA wandert hierbei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl ihrer Basenpaare. Große DNA-Fragmente wandern aufgrund größerer Reibungskräfte langsamer und können die Gelporen im Agarosegel weniger effizient passieren als kleinere Fragmente. Daher werden DNA-Fragmente über ca. 2000 bp in einem Gel mit einer Agarosekonzentration von 0,8 % (w / v) besser aufgetrennt, während die Auflösung kleinerer Fragmente unter 500 bp in einem Gel mit 1,5 % (w / v) Agarose effektiver erreicht wird. Die Agarose wurde dazu in der entsprechenden Menge Elektrophorese-Puffer TBE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromidlösung (10 mg / ml) versetzt, so daß final eine Konzentration von 0,5 µg / µl erreicht wurde. Die Lösung wurde in eine horizontale Elektrophoreseapparatur gegossen (200 mm x 200 mm x 5 mm) und nach dem Erstarren des Gels mit TBE-Puffer überschichtet. Die mit DNA-Probenpuffer versetzte DNA wurde neben der als Größenmarker verwendeten DNA-Leiter in die Taschen des Gels geladen. Die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladene DNA wanderte bei 80 V in Richtung Anode. Zur Bestimmung der Größen wurden kommerziell erhältliche DNA-Standards (Lambda Hind Fa. MBI, 1 kb-Leiter Fa. Gibco) parallel aufgetragen. Die einzelnen Fragmente konnten auf dem UV-Transilluminator bei 302 nm als orangefarben fluoreszierende DNA / Ethidiumbromid-Komplexe sichtbar gemacht werden. Die Auswertung erfolgte durch Photographie der Gele.

2.2.5. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach QIAEX II

Es wurde das Reagenziensystem Quiaex II der Fa. Quiagen verwendet. Zunächst wurde die entsprechende DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und

gewogen. Anschließend wurde das dreifache Volumen des Gelfragments mit dem Puffer QX 1 zugegeben. Nun wurde die QIAEX II-Lösung (10 µl) hinzugefügt, der pH-Wert wurde unter 7,5 mit dem pH-Meter eingestellt, da die Adsorption der DNA an QIAEX II sonst nicht effizient stattfand. Für 10 min wurde der Ansatz bei 50 °C und danach noch einmal für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde für 30 sec bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Präzipitat wurde nun erst mit 500 µl Puffer QX 1 und dann zweimal mit je 500 µl Puffer PE, zu dem Ethanol hinzugegeben worden war, durch Schütteln resuspendiert, 30 sec bei 12000 rpm zentrifugiert, und der Überstand wurde abpipettiert. Durch den Waschschrift mit Puffer QX 1 wurden die im Ansatz verbliebenen Agarosereste entfernt, durch den Waschschrift mit Puffer PE wurde der Ansatz von Salzresten befreit. Das Präzipitat wurde anschließend für 15 min an der Luft getrocknet, in 20 µl H₂O resuspendiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 30 sec bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein sauberes Gefäß überführt. Die DNA-Konzentration wurde am Photometer in Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei eine optische Dichte (OD) von 20 einer DNA-Konzentration von 1 mg / ml entsprach. Wie in 2.2.1. beschrieben, diente der Quotient OD 260 / OD 280 als Maß für die Reinheit der DNA bezüglich der Verunreinigung durch Proteine.

2.2.6. Ligationen: Klonierung von cDNA-Fragmenten in den Transkriptionsvektor pCR II

Es wurde das TA-cloning-Reagenziensystem der Fa. Invitrogen verwendet. Voraussetzung für die *in vitro* Transkription von radioaktiv markierten cRNA-Sonden war die Klonierung der betreffenden cDNA in einen Vektor, der für die *in vitro* Transkription geeignet ist. Wir haben hierfür den Vektor pCR II gewählt, da er folgende günstige Eigenschaften aufweist: Er trägt zwei Promotoren für RNA-Polymerasen (SP6, T7). Zwischen den Polymerasepromotoren liegen geeignete Restriktionsschnittstellen. Er besitzt sogenannte TA-Überhänge, die sich besonders für die Klonierung von PCR-Produkten eignen. Der Vektor pCR II besitzt ein β-Laktamase Gen, das eine Selektion von transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen Nährböden erlaubt. Bei der Ligation verbindet die DNA-Ligase DNA-Fragmente (Vektor und Insert), durch Wiederherstellung der Phosphodiesterbindungen. Die Ligation wurde in 10 µl Ansätzen durchgeführt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 µl frisches PCR-Produkt, 1 µl Ligationspuffer (20 mM TrisCl pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 50 µg / ml bovines Serumalbumin (Fraktion V, Fa. Sigma)), 2 µl Vektor (25 ng / µl), 5 µl demineralisiertes H₂O und 1 µl T4 DNA Ligase (4,0 Weiss units). Der Ansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Transformation durchgeführt oder die Ligation bei -20 °C gelagert.

2.2.7. Transformation kompetenter E. coli

Benötigte Lösungen:

LB-Medium:

für ein Volumen von einem Liter

10,0 g	Tryptone
5,0 g	Yeast-Extrakt
5,0 g	NaCl
1 ml	NaOH (1 N)

Kompetente Zellen wurden mit dem TA-cloning-Reagenziensystem von der Fa. Invitrogen bezogen. 50 µl dieser kompetenten Zellen wurden vorsichtig mit 2 µl 0.5 M 2-Mercaptoethanol und 2 µl des Ligationsansatzes gemischt und anschließend für 30 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine zweiminütige Inkubation im Wasserbad bei 42 °C, der die Plasmidaufnahme bewirkte. Nach zwei Minuten Inkubation bei 4 °C wurden 450 µl SOC-Medium hinzupipettiert und über 60 min eine Inkubation im Schüttelbad bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf Ampicillin-Agarplatten (50 µg / ml) ausplattiert. Da der pCR II Vektor ein β-Laktamasegen trägt, können autonom replizierende, transformierte Bakterien auf ampicillinhaltigen Nährböden selektiert werden. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C inkubiert. Von jeder Agarplatte wurden am folgenden Tag die Ampicillin-resistenten Kolonien selektiert. Bei 37 °C wurden Übernachtkulturen in 4 ml antibiotikahaltigem LB-Medium (50 µg / ml Ampicillin) erzeugt.

2.2.8. TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Benötigte Lösungen:

<u>TELT-Lysis-Puffer :</u>	50 mM	Tris HCl pH 7,5
	62,5 mM	EDTA
	2,5 M	LiCl
	0,4 %	Triton X 100

Die Minipräparation dient der Herstellung kleinerer Plasmidmengen, anhand derer durch Restriktionsverdau überprüft wird, ob die resistenten Kolonien tatsächlich das gewünschte cDNA-Fragment beinhalten. 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (100 µg / ml Ampicillin) wurden mit Einzelkolonien beimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2 ml davon in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 30 s bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Nach Zugabe von 250 µl TELT-Lysis-Puffer und anschließendem Schütteln wurde das Präzipitat durch

Vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde dann für 5 min bei 4 °C inkubiert, 5 µl Lysozymlösung (50 mg / ml) zugegeben, eine Minute im Heizblock bei 95 °C und dann für 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 12000 rpm und anschließendes Dekantieren des Überstandes wurden die zellulären Bakterienreste entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, wurde mit 2 µl RNase A (10 µg / µl) versetzt und für 20 min bei 37 °C damit die bakterielle RNA verdaut. Im Anschluß wurden 500 µl Ethanol (absolut) hinzugefügt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Präzipitat wurde mit 400 µl Ethanol (80 %) gewaschen, 5 min zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Restriktionsverdau und gelelektrische Auftrennung der Restriktionsfragmente gaben Auskunft über die Intaktheit der präparierten Plasmide (siehe 2.2.9.).

2.2.9. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die in den Kapiteln 2.2.8. und 2.2.10. präparierte DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen analysiert. Die Reaktionsansätze setzten sich zusammen aus: 1 µg DNA, 1 - 2 U Restriktionsendonuklease (1 U schneidet ca. 1 µg DNA / h), 2 µl Restriktionspuffer (Puffer nach Angaben der Restriktionsenzymhersteller), demineralisiertes H₂O ad 20 µl. Die Reaktion wurde mindestens 60 min bei 37 °C inkubiert. Wurden zwei verschiedene Enzyme für den Verdau der DNA benötigt, so konnten die Restriktionsanalysen gleichzeitig durchgeführt werden, sofern für beide Enzyme ein geeigneter Puffer gefunden werden konnte. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Fa. Boehringer Mannheim bzw. New England Biolabs bezogen.

2.2.10. Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA

Es wurde das Reagenziensystem Plasmid Extrektion Kit der Fa. Quiagen verwendet. Nachdem durch die Minipräparation und Restriktionsanalyse festgestellt werden konnte, daß die gewachsenen Bakterienklone die neuen Plasmide enthielten, sollten mit der Maxipräparation größere Mengen davon gewonnen werden, die für die Herstellung von RNA-Sonden benötigt wurden. 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (100 µg / ml Ampicillin) wurden mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Übernachtskultur 15 min bei 4 °C und 5000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Resuspendieren des Präzipitats wurden 4 ml Puffer P 1 und RNase A zugegeben. 4 ml Puffer P 2 wurden danach zum Lysieren der Bakterien und zum Neutralisieren und Fällern von Proteinen wurden dann 4 ml Puffer P 3 hinzugefügt. Der Ansatz wurde 20 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-

anionenaustauscher-Säule (Qiagen-tip 100) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer QC gewaschen und dann die DNA mit dem Puffer QF eluiert. Zu der eluierten DNA (in 5 ml Lösung) wurden 3,5 ml Isopropanol hinzugefügt und der Ansatz für 60 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden durch Resuspension in 2 ml Ethanol (70 %), Zentrifugation und Entfernung des Überstandes, Salzreste eliminiert. Das Präzipitat wurde 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde es in 100 µl demineralisiertem H₂O resuspendiert und der DNA-Gehalt wie unter 2.2.5. beschrieben photometrisch bestimmt.

2.2.11. Linearisieren des Transkriptionsvektors

Das Plasmid pCR II wurde mit einem Restriktionsenzym linearisiert, um bei der Transkription zur Herstellung einer RNA-Sonde einen Transkriptionsstop hervorzurufen. Durch die Auswahl einer geeigneten Schnittstelle konnte auch die Größe des geschützten Fragments der Sonden-cRNA im RPA bestimmt werden. Sie sollten möglichst 200 bis 400 Nukleotide betragen. Die präparativen Restriktionsverdauungen wurden in einem Volumen von 150 µl, wie in Kapitel 2.2.9. beschrieben, durchgeführt. Die Vollständigkeit der Restriktionsverdauung wurde auf DNA-Gelen geprüft. Die im Rahmen dieser Arbeit für präparative Restriktionsschnitte verwendeten Restriktionsendonukleasen waren :

<u>Restriktionsendonukleasen</u>	<u>Erkennungssequenz</u>	<u>verwendet für folgende</u> <u>CyclaseUntereinheit</u>
Bam HI	G / GATCC	β ₂ Ratte
Pvu II	CAG / CTG	α ₁ Ratte
Nae I	GCC / GGC	β ₁ Ratte
Sca I	AGT / ACT	GC-A Ratte
Hga I	GCG / C	α ₁ Ratte

2.2.12. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Vor Beginn der Extraktion, die dazu dient, DNA-Lösungen von Proteinen zu reinigen, wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. 150 µl Restriktionsansatz wurde nach der Zugabe von 1,5 µl SDS (10 %) und 1,5 µl Proteinase K 30 min bei 56 °C inkubiert. Zur Extraktion von Proteinen aus der DNA-Lösung wurde anschließend in gleichem Volumen Chloroform zugesetzt. Nach intensivem Durchmischen und Zentrifugation mit 12.000 rpm für 15 min wurde die obere, wässrige Phase zur weiteren Verarbeitung abgenommen und erneut durch eine 1 : 1 Zugabe einer Chloroform / Isamylalkohol-Lösung extrahiert. Es folgte eine Präzipitation der DNA mit Hilfe von Ethanol. Dies bewirkte einerseits eine

Volumenreduktion und andererseits eine Entsalzung. Zur Präzipitation wurden die DNA-Lösungen mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und einem 2,5-fachen Volumen Ethanol (absolut) versetzt, anschließend die DNA für 15 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitiert. Durch Zentrifugation mit 12.000 rpm für 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das Präzipitat sedimentiert, mit Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in $20\text{ }\mu\text{l}$ demineralisiertem H_2O aufgenommen. Die DNA-Konzentrationen der Lösungen wurden durch Bestimmen der optischen Dichte bei 260 nm gemessen. Durch Berechnung des Quotienten der Messwerte bei 260 nm und 280 nm konnte eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösungen erhalten werden.

2.2.13. Herstellung der markierten cRNA-Probe durch in-vitro Transkription

Benötigte Lösungen:

Elutionspuffer

Stammlösung 50ml	1,925 g	Ammoniumacetat
	100 μl	EDTA-Stamm (0,5 M, pH 8,0)
	500 μl	SDS (20 %)
	ad 50 ml	DEPC- H_2O

Das Prinzip der in-vitro Transkription ist die Herstellung von cRNA-Kopien der zuvor durch Restriktionsverdau linearisierten DNA durch eine RNA-Polymerase. Die zugegebene T7- oder SP6-RNA-Polymerase kopiert die cDNA in 5'-3' Richtung von ihrem Promoter aus. An der Linearisierungsstelle des Plasmides bricht die Transkription ab. Daher erhält man eine RNA-Kopie des 5'-3'-Stranges der cDNA zwischen Promoter und Linearisierungsstelle. Die Länge der Sonde und ihre Orientierung ("sense" oder "antisense") werden durch die Wahl der Linearisierungsstelle und einer der beiden RNA-Polymerasen bestimmt. Da UTP nur in radioaktiv markierter Form angeboten wird, trägt im Durchschnitt jede vierte Base der transkribierten cRNA-Sonde das Signal. Der Reaktionsansatz wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pipettiert und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1 μl	cDNA (0,5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)
2 μl	ATP (10 mmol)
2 μl	CTP (10 mmol)
2 μl	GTP (10 mmol)
2 μl	Transkriptionspuffer
0,5 μl	RNasin
2 μl	DTT (0,1 mol)
4 μl	50 μCi ^{32}P -UTP
0,5 μl	Demineralisiertes- H_2O
2 μl	T7- oder SP6-Polymerase (10 U / μl)

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und für 120 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die in dem Ansatz eingesetzte Plasmid-DNA durch die Zugabe von 20 U DNase I für 15 min bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde mit 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 gestoppt. Dann wurden 22 µl Probenpuffer zu dem Ansatz gegeben und zum Denaturieren der RNA für 4 min bei 95 °C inkubiert. Im Anschluß folgte eine Auftrennung der Sonde über ein Polyacrylamid-Gel für eine Stunde bei 50 W (siehe 2.2.14.). Zum Detektieren der Sonde wurde das Gel mit einer Plastikfolie abgedeckt und ein Röntgenfilm für 1-5 Minuten aufgelegt. Der Film wurde anschließend für 2 min in Agfa G 150 entwickelt und nach einem Zwischenbad von 20 s in Essigsäure (5 %) mit Agfa G 350 fixiert. Aus der Gelmatrix konnte nun ein Fragment definierter Länge mit einem Skalpell herausgeschnitten und über Nacht in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml Elutions-Puffer bei 37 °C eluiert werden. Die Konzentration von ³²P-markierter cRNA-Sonde wurde durch Messung von β-Quanten ermittelt.

2.2.14. RNA-Elektrophorese im Polyacrylamid-Gel

Benötigte Lösungen:

<u>Gel-Lösung:</u>	42 g	Urea
	12 ml	10 x TBE
	10 ml	Acrylamid ("Long Ranger")
	ad 100 µl	demineralisiertes H ₂ O
	50 µl	TEMED
	500 µl	Ammoniumpersulfat (10 %, in H ₂ O)

10 x TBE

Stammlösung 1000 ml	108 g	Tris-Base
	61,7 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1000 ml	demineralisiertes H ₂ O

Probenpuffer:

	800 µl	Formamid deionisiert
	100 µl	0,1 M EDTA pH 8,0
	1 mg	Xylen Cyanol
	1 mg	Bromphenolblau
	100 µl	demineralisiertes H ₂ O

Zum Aufreinigen der RNA-Sonde und zur Größenbestimmung der mit der Sonde hybridisierten mRNA-Probe wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die beiden Glasplatten der Gelapparatur wurden mit H₂O und Isopropanol gereinigt. Nach dem

Zusammenfügen der beiden Platten über Spacer wurde die Gellösung luftblasenfrei mit einer Spritze in die Gelkammer gefüllt und ein Kamm aufgesteckt. Nachdem das Gel 1 h bei Raumtemperatur polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt, die Geltaschen von Gelresten befreit und die Gelapparatur in die Laufkammer eingesetzt. Die Kammern wurden mit 0,6 x TBE gefüllt und die Geltaschen hiermit sorgfältig gespült. Das Gel wurde 30 min bei 35 W eingelaufen. Die denaturierten RNA-Proben wurden bei der Sondenaufreinigung in einem Volumen von 45 µl, bei den hybridisierten Proben in einem Volumen von 8 µl, in die Geltaschen eingebracht. Für 60 - 90 min wurden 50 W Leistung erbracht. Anschließend wurde die Gelapparatur geöffnet und die Gele entweder vorsichtig von der Glasplatte abgehoben und unter Vakuum getrocknet oder direkt nach dem Auflegen einer dünnen Kunststoffschicht auf Röntgenfilm exponiert.

2.2.15. RNase Protection Assay

Der RNase Protection Assay (RPA) ist ein sensitiver Versuch zum Nachweis und zur Quantifizierung von RNA (meist mRNA) in einem Ansatz mit der gesamten zellulären RNA. Bei einem RPA werden radioaktiv markierte cRNA-Sonden mit mRNA hybridisiert. Die entstandenen Hybride werden anschließend, nach enzymatischem Abbau der im Versuchsansatz verbliebenen einzelsträngigen RNA und RNA-Elektrophorese im Polyacrylamidgel, durch Phosphoimager- und Röntgenfilmexposition nachgewiesen.

2.2.15.1. Hybridisierung der Sonde mit der mRNA-Probe

Benötigte Lösungen:

Hybridisierungslösung

Stammlösung 10 ml, lagern bei -20 °C

8 ml	deionisiertes Formamid
1 ml	NaCitrat(1 M, pH 6,4)
1 ml	NaAcetat (3 M, pH 6,4)
20 µl	EDTA (0,5 M, pH 8,0)

Zur Hybridisierung wurde zunächst folgender Ansatz zusammengestellt:

5 µg	mRNA-Probe
5 µg	tRNA
100000 dpm	RNA-Sonde
ad 100 µl	demineralisiertes H ₂ O

Zusätzlich wurden zwei Ansätze als Kontrolle ohne mRNA und mit 2000 dpm RNA-Sonde angesetzt. Zum Fällen der RNA wurden anschließend 10 µl Ammoniumacetat (5 M) und

275 µl Ethanol (absolut) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei -70 °C inkubiert. Es folgte für weitere 30 min eine Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde daraufhin vollständig abgenommen und entsorgt. Nun wurden 20 µl Hybridisierungslösung zugegeben, sorgfältig gemischt und die RNA für 4 min bei 95 °C denaturiert. Nach kurzem Zentrifugieren (15 sec) wurde die RNA bei 45 °C über Nacht hybridisiert. Die Temperatur durfte nach dem Denaturieren nicht mehr unter 45 °C absinken, da die RNA sonst renaturiert wäre.

2.2.15.2. RNase-Verdau und Detektion

Dieser Teil des RNase Protection Assays wurde mit den Reagenzien "Bx" und "Dx" des "Ambion Maxiscript in vitro Transkription Kit" der Fa. Ambion durchgeführt. Weiter wurden folgende Lösung benötigt:

Solution R

Stammlösung 1 ml, lagern bei -20 °C

325 µl	H ₂ O
5 µl	2 M Tris pH 8,0
20 µl	0,5 M EDTA pH 8,0
500 µl	Glycerin
50 µl	RNase A (10 µg / µl)
100 µl	T1-RNase (100 U / µl)

Zu den Ansätzen wurden bei 4 °C Inkubationstemperatur 2 µl Solution R und 198 µl Solution Bx gegeben, zu einer der Kontrollen nur 200 µl Solution Bx. Dann wurde die nicht hybridisierte, einzelsträngige RNA für 30 min bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden 300 µl Solution Dx und 100 µl Ethanol (absolut) zugegeben und der Ansatz wurde für 30 min bei -80 °C gefällt. Der Überstand wurde 30 min bei 12000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und danach vollständig abpipettiert. Zu dem Ansatz wurden 8 µl Formamid-LB hinzupipettiert, gründlich gemischt und die RNA für 4 min bei 95 °C denaturiert. Der Ansatz wurde nun auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und für 90 min bei 50 W aufgetrennt. Dann wurde das Gel auf Chromatographiepapier überführt, die offene Seite durch eine dünne Kunststoffolie abgedeckt und das Gel bei 80 °C für zwei Stunden im Gelrockner getrocknet. Über Nacht wurde das Gel einer Phosphoimager-Platte exponiert und dann für eine Woche bei 4 °C einem Röntgenfilm aufgelegt.

2.2.16. Gewinnung cytosolischen Proteins

Ungefähr 2 g Herz- bzw. Aortengewebe wurde in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Metallstößels und eines Mörsers zerkleinert, in 7 ml 50 mM TEA aufgenommen, im Homogenisator und anschließend noch durch 10-faches Auf- und Abziehen durch eine Kanüle homogenisiert. Der Ansatz wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, und die Zellkerne und Membranen 30 min bei 4 °C und mit 20000 rpm in der Ultrazentrifuge von der cytosolischen Fraktion abgetrennt. Der Überstand mit der cytosolischen Fraktion wurde im Anschluß in ein anderes Gefäß überführt und eine Proteinbestimmung angeschlossen. Alle präparierten Gewebe wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.17. Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) ist die Messung der Farbreaktion von in saurem Milieu gelöstem Coomassie Blue nach Bindung an Proteine. Als Farbstoff-Konzentrat wurde der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Die Proteinkonzentration konnte mit Hilfe einer vorher erstellten Eichkurve, für die als Standardprotein Rinder Gamma Globulin verwendet wurde, bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 595 nm. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.18. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Benötigte Lösungen:

<u>Trenngel:</u>	0,1 %	SDS
	10 %	Acrylamid ("Long Ranger")
	375 mM	Tris / HCl , pH 8,8
	0,1 %	Ammoniumpersulfat
	0,1 %	TEMED

<u>Sammelgel:</u>	0,1 %	SDS
	6 %	Acrylamid (Longranger)
	125 mM	Tris / HCl , pH 8,8
	1,2 %	Ammoniumpersulfat
	0,6 %	Temed

<u>Laufpuffer:</u>	0,1 %	SDS
	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	pH 8,8	

<u>Probenpuffer nach Laemmli:</u>	2 %	SDS
	62,5 mM	Tris / HCl , pH 6,8
	5 %	2-Mercaptoethanol
	10 %	Glycerin
	0,02 %	Bromphenolblau

Das ionische Detergens SDS bindet an die Proteine, verleiht ihnen eine gleichmäßig negative Ladung und zerstört ihre räumliche Konfiguration. Wird an ein Polyacrylamidgel eine elektrische Spannung angelegt, werden die in SDS aufgetragenen Proteine nahezu ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt, da andere Faktoren wie Ladung und Faltung der Polypeptidketten weitgehend ausgeschaltet sind. In einem vor das eigentliche Trenngel geschalteten großporigen Sammelgel mit niedrigem pH-Wert werden die Proteine konzentriert, indem sie in einer Front hinter den führenden Chlorid-Ionen und vor den bei diesem pH-Wert schwach geladenen Glycinat-Ionen ("moving boundary") einer hohen Spannung ausgesetzt werden. Die so stark beschleunigten Proteine werden erst vor der Front der mobilen Cl-Ionen abgebremst und auf engem Raum konzentriert; erst bei Erreichen des Trenngels überholen die durch die pH-Erhöhung stärker geladenen Glycinat-Ionen die Proteine, die nun von dem kleinporigen Gel zurückgehalten und fraktioniert werden (Ornstein L. 1964). Das Zusammenwirken von SDS und dem in hohen Konzentrationen Disulfidbrücken-spaltenden 2-Mercaptoethanol bewirkt eine Dissoziation von Multimeren in ihre Untereinheiten. Die Elektrophorese wurde in einer Mini-Gelkammer (Mini Protean Cell, Biorad) durchgeführt. Die Gele hatten Abmessungen von 0,1 x 8 x 1 cm (Sammelgel) und 0,1 x 8 x 6 cm (Trenngel). Die Proben wurden 4 : 1 mit Probenpuffer verdünnt. Nach Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese ohne Kühlsystem mit einer Spannung von 80 V durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Molekularmassenstandard aufgetragen.

2.2.19. Immunoblot

Benötigte Lösungen:

<u>Transferpuffer :</u>	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,02 %	SDS
	20 %	Methanol

TBST-Puffer zum Waschen und verdünnen :

	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris / HCl pH 8,0
	0,1 %	Tween 20.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrocellulose-Membranen durch Elektrophorese (Towbin et al. 1979). Durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern können die Proteine dann identifiziert (Burnette 1981) und durch eine enzymatische Lumineszenzreaktion katalysierenden Anti-Immunglobulin-Antikörper-Enzymkomplex sichtbar gemacht werden. Die gelelektrophoretisch im Minigel aufgetrennten Proteine (wie in 2.2.18. beschrieben) wurden in Transferpuffer bei konstantem Strom (250 mA) eine Stunde lang auf Nitrocellulosemembranen transferiert (Blotanlage "Blot Modul" der Firma Bio Rad). Die Gele und Membranen wurden luftblasenfrei als "Sandwich" in der Anordnung -Anode-Schwamm-Filterpapier-Nitrocellulosemembran-Polyacrylamidgel-Filterpapier-Schwamm-Kathode-durchgeführt. Durch Färbung mit Ponceau-S-Lösung für 10 min und anschließendem Waschen mit demineralisiertem H₂O wurde der Proteinmolekulargewichtsstandard und die Proben sichtbar gemacht. Die Position der Standard-Proteine wurde für eine spätere Größenzuordnung der Proben auf den Membranen mit Kugelschreiber markiert. Über Nacht wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit 5 % (w / v) Milchpulver in TBST-Puffer abgesättigt. Nachdem die Membran 2 x 5 min mit TBST gewaschen wurde, konnte der erste polyklonale Antikörper (Verdünnung 1 : 2000 in 0,3 % (w / v) Milchpulver in TBST), der gegen die β_1 -Untereinheit der löslichen Guanylylcyclase gerichtet war, für eine Stunde inkubiert werden. Nach einem erneuten Waschschrift von 3 x 5 min schloß sich die zweite Antikörperinkubation (Anti-rabbit IgG gekoppelt an Meerrettichperoxidase, Verdünnung 1 : 4000 in 0,3 % (w / v) Milchpulver in TBST) für erneut eine Stunde an. Anschließend wurden nach einem erneuten Waschschrift die Antigen-Antikörperkomplexe durch Nachweis der Meerrettichperoxidase mittels Chemilumineszens (ECL-System) sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm für 15 sec bis 5 min exponiert.

2.2.20. Versuchskontrolle durch Peptidverdrängung

Als Kontrolle des Versuches wurde eine Doppelbestimmung aller Proben durchgeführt. Die ansonsten identische Behandlung der beiden Proben unterschied sich nur im ersten Schritt der Antigen-Antikörperreaktion. Zusätzlich zu dem ersten GC-3-Antikörper wurde zu der einen Probe ein spezifisch an den GC-3-Antikörper bindendes Peptid in einer 1:1000 Verdünnung gegeben. Durch das Peptid wurde das spezifische Signal auf dem Röntgenfilm unterdrückt.

2.2.21. Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose

Benötigte Lösungen:

DEAE-Puffer: 50 mM TEA / HCl, pH 7,0
 0,2 mM Benzamidin
 1 mM EDTA

2 mM GSH

DEAE-Puffer A: DEAE-Puffer plus 75 mM NaCl

DEAE-Puffer B: DEAE-Puffer plus 175 mM NaCl

Das Prinzip der Anionenaustausch-Chromatographie ist die unterschiedlich starke, reversible Bindung von Proteinen, die bei pH-Werten oberhalb ihres pI-Wertes negativ geladen sind, an positiv geladene Diethylaminoethyl-Gruppen des Trägermaterials und anschließendes Aufheben dieser Bindung durch kompetitives Verdrängen der Proteine durch Anionen anorganischer Salze. Die Anionenaustausch-Chromatographie wurde mit 8 ml DEAE-Sephrose Fast Flow in einer C 10 / 10 Säule mit dem Adapter AC 10 der Fa. Pharmacia Biotech durchgeführt. Als Puffersystem wurde DEAE-Puffer mit verschiedenen Kochsalzkonzentrationen verwendet. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina DEAE-Puffer äquilibriert. Nachdem, wie in 2.2.16. beschrieben, cytosolisches Protein aus Herzgewebe gewonnen worden war, wurde der Ansatz mit 50 mM TEA auf ein Volumen von 40 ml gebracht und auf die äquilibrierte DEAE-Sephrose Säule mit einer Flußrate von 200 ml / h aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 4 Säulenvolumina DEAE-Puffer A bei einer Flußrate von 200 ml / h gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 Säulenvolumina DEAE-Puffer B mit einer Flußrate von 60 ml / h. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen aufgefangen, die Fraktion mit dem höchsten Gehalt an Guanylyl-Cyclase-Aktivität durch den in 2.2.22. beschriebenen Guanylyl-Cyclase-Assay bestimmt und mit 50 % (v / v) Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.2.22. Guanylyl-Cyclase Assay

Die Methode zur Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität, beruht auf der Bestimmung von aus $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ gebildetem $^{32}\text{P}\text{cGMP}$. 50 μg Protein wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 μl in Anwesenheit von 0,025 mg Creatin-Kinase, 50 mM TEA / HCl (pH 7,4), 1 mM IBMX, 3 mM MgCl_2 , 5 mM Creatinphosphat, 1 mM cGMP, 0,5 mM GTP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von cGMP erhöht man nicht nur die Wiederfindungsrate von $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$, sondern verringert auch den durch Phosphodiesterasen abgebauten Anteil an $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$. Bei Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter stimulierten Bedingungen wurde den Ansätzen in unterschiedlichen Konzentrationen gemäß der Verdünnungsreihe entweder Protoporphyrin IX oder DEA / NO zugegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Zinkacetat-Lösung gestoppt und die 5'-Nukleotide durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Natriumcarbonat-Lösung mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitiert (Chan und Lin 1974). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 min bei 4000 rpm) abgetrennt, das $^{32}\text{P}\text{cGMP}$ verblieb im Überstand. In Säulen wurde Aluminiumoxid mit 2 ml 0,1 N Perchlorsäure angesäuert und 800 μl Überstand der Inkubationsansätze noch während des Durchlaufs

zugegeben und das $[^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ an die Säule gebunden. Die Säule wurde mit 5 ml demineralisiertem H_2O gespült und anschließend das $[^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ mit 5 ml 250 mM Natriumacetat in Scintillationsgefäße eluiert. Die Zerfälle pro Minute (cpm) des ^{32}P wurden durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler bestimmt. Zur Berechnung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität benötigt man einen Leerwert, der durch einen Ansatz ohne Protein in der Versuchsreihe erzielt wurde. Nicht enzymatisch entstandenes $[^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ konnte so nachgewiesen werden und die Zählrate des Leerwertes von den Zählraten der Ansätze abgezogen werden. Die Wiederfindungsrate wurde in einigen Ansätzen durch den Einsatz von $[^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ anstatt $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bestimmt, da während der Probenaufbereitung ein Teil des cGMP mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitierte bzw. nicht vollständig von den Aluminiumsäulen eluiert werden konnte. Die Wiederfindungsrate wurde dann aus dem Verhältnis von isolierter zu eingesetzter Radioaktivität errechnet und lag bei $0,5 \pm 0,05$. Die Reinheit des $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ lag bei 0,9. Die spezifische Aktivität der Guanylyl-Cyclase wurde als die Menge cGMP (in nmol), die von 1 mg Protein in 1 min gebildet wurde, nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(C - C_0)}{C_t} \times \frac{S}{W \times RG \times P \times t} = v$$

v	spez. Aktivität der Guanylyl-Cyclase ($\text{nmol cGMP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$)
C	Zählrate der Probe (cpm)
C_0	Zählrate des Leerwertes (cpm)
C_t	Zählrate des eingesetzten $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (cpm)
S	Menge des eingesetzten Substrates 5'-GTP pro Ansatz (nmol)
W	Wiederfindungsrate von cGMP (bestimmt mit ^{32}P -cGMP, um Verluste durch Kopräzipitation mit ZnCO_3 oder unvollständige Elution von der Säule zu quantifizieren)
RG	Reinheitsgrad des $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$
P	Proteinmenge pro Inkubationsansatz (mg)
t	Inkubationsdauer (min)

Die Enzymaktivität wurde im Allgemeinen als Mittelwert aus zwei oder drei Ansätzen bestimmt.

DEA / NO-Verdünnungsreihe:

A :	Stammlösung: 1,55 mg / ml NaOH =	10 mM
B :	100 μl Ansatz A + 900 μl NaOH (10 mM) =	1 mM
C :	100 μl Ansatz B + 900 μl NaOH (10 mM) =	100 μM

D :	100 µl Ansatz C + 900 µl NaOH (10 mM) =	10 µM
E :	100 µl Ansatz D + 900 µl NaOH (10 mM) =	1 µM
F :	100 µl Ansatz E + 900 µl NaOH (10 mM) =	0,1 µM
G :	100 µl Ansatz F + 900 µl NaOH (10 mM) =	0,01 µM
H :	100 µl Ansatz G + 900 µl NaOH (10 mM) =	0,001 µM
I :	1 ml NaOH (10 mM)	

Protoporphyrin IX –Verdünnungsreihe :

A :	Stammlösung: 6,06 mg / ml NaOH =	10 mM
B :	100 µl Ansatz A + 900 µl NaOH (10 mM) =	1 mM
C :	100 µl Ansatz B + 900 µl NaOH (10 mM) =	100 µM
D :	100 µl Ansatz B + 900 µl NaOH (10 mM) =	10 µM
E :	100 µl Ansatz B + 900 µl NaOH (10 mM) =	1 µM
F :	100 µl Ansatz B + 900 µl NaOH (10 mM) =	0,1 µM
G :	100 µl Ansatz B + 900 µl NaOH (10 mM) =	0,01 µM
H :	100 µl Ansatz B + 900 µl NaOH (10 mM) =	0,001 µM
I :	1 ml NaOH (10 mM)	

3. ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Lokalisation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase am Herz-Kreislaufsystem des Menschen und der Ratte. Die Ergebnisse der Arbeit gliedern sich dabei methodisch in vier verschiedene Bereiche. Der erste Teil beschäftigt sich mit der PCR und der Klonierung von cDNAs der einzelnen Untereinheiten. Im zweiten Abschnitt werden die zuvor klonierten cDNA-Sonden zur Detektion der Untereinheiten mittels RNase Protection Assay eingesetzt. Der dritte Abschnitt beschäftigt sich mit Western-Blot-Untersuchungen der besonders wichtigen β_1 -Untereinheit, für die ein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand. Der vierte Teil untersucht die pharmakologischen Eigenschaften kardialer löslicher Guanylyl-Cyclase des Menschen durch Bestimmung von Enzymaktivität nach partieller Aufreinigung des Enzyms.

3.1. Herstellung von cRNA-Sonden

Die Herstellung der Sonden für den RPA wird exemplarisch anhand der Konstruktion der GCA-Sonde für die Ratte dargestellt.

3.1.1. RT-PCR

Voraussetzung für die Untersuchung der Expression der verschiedenen Untereinheiten des Enzyms lösliche Guanylyl-Cyclase am Herz-Kreislaufsystem mit Hilfe des RNase Protection Assays ist die Herstellung von cRNA-Sonden, die spezifisch mit den einzelnen Untereinheiten hybridisieren. Zur Amplifikation der einzelnen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase der Ratte mit Hilfe der RT-Polymerasekettenreaktion stattfinden konnte, wurden die in Tabelle 1 angegebenen spezifischen Primer ausgewählt. Als Kontrolle wurde von jeder Probe ein Ansatz aufgetragen, bei dem in der Reversen Transkriptionsreaktion keine Reverse Transkriptase zugesetzt wurde (im folgenden mit RT- abgekürzt). Im Anschluß an die PCR wurde von jeder PCR-Probe ein Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und wie in Abbildung 1 dargestellt elektrophoretisch aufgetrennt. Damit konnte sowohl der Erfolg der Reversen Transkription, sowie das Auftreten von PCR-Kontaminationen detektiert werden.

3.1.2. Herstellung von linearisierten Transkriptionsvektoren

Im ersten Schritt wurden die in der PCR amplifizierten GC-A-cDNA-Fragmente mit dem pCR II Vektor ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation von E. coli und eine

Tabelle 1: Auswahl der zur cDNA-Fragmentkonstruktion benötigten Oligonukleotide

cDNA	Genbank-nummer	5'-sense-Oligonukleotid-3'	5'-antisense-Oligonukleotid-3'	Anzahl der Basenpaare
α_1 -Ratte	M57405	α_1 -146 5'-TGYTAYGARGA RGAYGARTAYA-3'	α_1 -354 5'-TTYTTTCATISW RTTRTCCCA-3'	600 bp
α_2 -Ratte	David Garbers (pers. Mitteilung)	α_2 -703 5'-TGTACACCAGAT TTGACCACCAGT-3'	α_2 -970 5'-TGCTTGCCAGTG TGACATTATTTC-3'	291 bp
β_1 -Ratte	M22562	β_1 -1069 5'-TCCCTCTCCAT gATgCTACACg-3'	β_1 -1585 5'-TCgCCATCTACT TgAACTTgACCA-3'	401 bp
β_2 -Ratte	M57507	β_2 -159 5'-ATgAARgARMgIT AYYTIAAYAT-3'	β_2 -275 5'-gCATCATYTCYTT ICKIgTYTT-3'	496 bp
GC-A Ratte	X14773	GCA-921 5'-CCGCGCAAAGGC CGAGTTATCTAC-3'	GCA-1335 5'- TG TGCCAGAGT-3'	252 bp
BNP Ratte	M25297	5'-CTGGGAAGTCCT AGCCAGTCTCCA-3'	5'-GACCGGATCGGC GCAGTCAGTCGC-3'	246 bp

Minipräparation. Um zu bestätigen, daß nach der PCR und den anschließenden Klonierungsschritten die erwarteten Produkte entstanden waren, wurden die GC-A Klonierungsprodukte mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die erwarteten Fragmentgrößen wurden mit Hilfe von Restriktionskarten der für die GC-A kodierenden cDNA-Klone berechnet. Die Restriktionsansätze wurden in Agarosegelen aufgetrennt und die im UV-Licht als Ethidiumbromid-Komplexe sichtbaren DNA-Fragmente wie in Abbildung 2 dargestellt photographiert. Danach konnte die Gewinnung von größeren Mengen der Transkriptionsvektoren mit Hilfe der Large Scale Präparation durchgeführt werden. Im Anschluß wurde das Fragment mit Hilfe der in Tabelle 2 angegebenen Restriktionsenzyme geschnitten und so linearisiert. Der Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt und der Erfolg des Restriktionsverdaus überprüft (Abbildung 3).

Das gesuchte Fragment wurde aus dem Gel herausgeschnitten, eluiert und der Ansatz durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt.

3.1.3. In-vitro Transkription

Ausgehend von den linearisierten Plasmiden wurden in-vitro RNA Transkripte mit Hilfe der in Tabelle 2 verzeichneten RNA-Polymerasen hergestellt. Durch Kontrolle des Transkriptionserfolges durch elektrophoretische Auftrennung der Sonde auf einem Polyacrylamid-Gel (Abbildung 4) wurden die Transkriptionsbedingungen ermittelt: Bei Transkriptionen für 120 min bei 25 °C entstanden die besten Ergebnisse. Die im Polyacrylamid-Gel ermittelte Sonde wurde herausgeschnitten und anschließend im RNase Protection Assay eingesetzt.

3.2. Qualitativer Nachweis der mRNA und Nachweis der kardialen Hypertrophie der SHR-Ratten

3.2.1. Qualitätsnachweis der gesamt-RNA Präparation

Für die Quantifizierung von mRNA ist die Integrität und Reinheit der präparierten Gesamt-RNA eine wesentliche Voraussetzung. Die Reinheit der präparierten RNA wurde am Photometer durch Ermittlung der optischen Dichte (OD) der RNA-Lösung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum für Proteine, und bei 260 nm überprüft. Der Mittelwert der Quotienten OD 260 / 280 zeigte bei Werten von 1,9 - 2,0 eine gute Qualität der präparierten RNAs an. Anschließend wurde die Integrität der RNA-Probe durch Agarosegel-Elektrophorese ermittelt und gleichzeitig die korrekte photometrische Konzentrationsbestimmung überprüft. Bei den später für den RNase Protection Assay verwendeten RNA-Proben waren die 28S-Banden etwa doppelt so stark wie die 18S-Banden und es waren keine Verunreinigungen durch DNA zu erkennen. Außerdem war die Intensität der Banden der auf einem Gel aufgetragenen RNA-Proben vergleichbar, was zusätzlich als Kontrolle der photometrischen Bestimmung diente.

3.2.2. Nachweis der kardialen Hypertrophie der SHR-Ratten

Da uns neben dem Nachweis der einzelnen Untereinheiten in Geweben des Herz-Kreislaufsystems auch Unterschiede in der Regulation des Enzyms interessierten, untersuchten wir neben den herzgesunden WKY-Ratten sogenannte SHR-Ratten, die ein Tiermodell für Bluthochdruck beim Menschen darstellen. Es wird angenommen, daß SHR-Ratten aufgrund des Bluthochdrucks eine kardiale Hypertrophie entwickeln. Diese läßt sich durch die Bestimmung des Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht bestimmen. Sowohl

WKY- als auch SHR-Ratten wurden zunächst lebend gewogen, dann getötet und die Herzen entnommen. Erst nachdem die Herzen ausgeblutet waren, wurden diese gewogen. Der Mittelwert im Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht betrug bei den SHR-Ratten 4,17 mg / g (n = 11, Standardabweichung 0,19), bei den WKY-Ratten 3,17 mg / g (n = 12, Standardabweichung 0,27). Damit war das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht bei SHR- gegenüber WKY-Ratten als Ausdruck der kardialen Hypertrophie signifikant ($p < 0,001$) erhöht.

Tabelle 2: Übersicht über die hergestellten antisense cRNA Transkripte

Plasmid	Fragment-schnittstellen	Fragment-länge	Linearisierungs-schnittstellen	verwendete Polymerase	Länge des Transkriptes
α_1 -Ratte in pCR II	Bam HI Xba I	600 bp	Pvu II	Sp 6	234 bp
α_2 -Ratte in pCR II	Bam HI Xba I	291 bp	Hga I	T 7	260 bp
β_1 -Ratte in pCR II	Bam HI Xba I	517 bp	Nae I	SP 6	401 bp
β_2 -Ratte in pCR II	Bam HI Xba I	370 bp	Bam HI Hind III	T 7	337 bp
GC-A-Ratte in pCR II	Bam HI Xba I	414 bp	Sca I	T 7	252 bp
BNP-Ratte in pCR II	Bam HI Xba I		Ava II	SP 6	246 bp

3.2.3. Nachweis der Hypertrophie anhand der Messung der BNP-Expression im RNase Protection Assay

BNP wurde als molekularer Marker für die kardiale Hypertrophie der SHR-Ratten verwendet, da der Plasmaspiegel des BNP bei Herzinsuffizienz erhöht ist, die Synthese und Sekretion im Ventrikel und nicht wie bei ANP im Vorhof stattfindet und außerdem gezeigt wurde, daß die Erhöhung des BNP-Spiegels die des ANP-Spiegels bei Herzinsuffizienz übertrifft und charakteristischer für den Schweregrad ist (Ogawa et al. 1990, Mukoyama et al. 1991, Hosoda et al. 1991, Ogawa et al. 1991, Mukoyama et al. 1990). Wie im RNase Protection Assay in

Abbildung 5 erkennbar ist, war die BNP-Expression bei den SHR-Ratten im Vergleich zu den WKY-Ratten deutlich erhöht.

3.3. Expression der α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 -Untereinheiten in den Herzen, Nieren und Aorten von Ratten und im menschlichen Herzen

Die Verteilung der einzelnen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase in verschiedenen Geweben wurde durch RNase Protection Assays sensitiv bestimmt. Aus jedem Gewebe wurden pro Ansatz 5 μ g mRNA mit je 100000 dpm radioaktiv markierter cRNA-Sonde hybridisiert. Die cRNA-mRNA -Hybride wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und für 12 bis 16 Stunden einer Phosphoimager-Platte exponiert. Wie erwartet, konnten die mRNAs der α_1 - und β_1 -Untereinheiten sowohl in den untersuchten Geweben der Ratte als auch in humanem Vorhof und Ventrikelgewebe nachgewiesen werden (Abbildungen 6, 7, 9). Die α_2 -Untereinheit, die wie die α_1 -Untereinheit mit der β_1 -Untereinheit ein Heterodimer bildet, konnte wie die α_1 - und β_1 -Untereinheiten in allen untersuchten Geweben von Ratte und Mensch mit einem deutlichen radioaktiven Signal nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu diesem unerwartet hohen Expressionsnachweis der mRNA der α_2 -Untereinheit, konnte die mRNA der β_2 -Untereinheit nicht in Herz- und Aortengewebe, sondern nur in Nierengewebe detektiert werden (Abbildungen 6, 7, 9). Die mRNA der membranständigen Guanylyl-Cyclase GC-A, die als Kontrolle dienen sollte, war erwartungsgemäß in allen analysierten Geweben nachweisbar. Da in der Literatur beschrieben wurde, daß bei einigen Typen der Herzinsuffizienz ein erhöhter cGMP-Spiegel auftritt (Michel et al. 1990, Jakob et al. 1995), interessierten uns mögliche Veränderungen in der Expression der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase am Herzen. Im Vergleich von Gesamtherzgewebe spontan hypertensiver Ratten mit herzgesunden Wildtyp-Ratten konnten bezüglich der Expression der einzelnen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase keine Unterschiede mittels RNase Protection Assay festgestellt werden. Allerdings zeigte sich in einigen der Untersuchungen, daß die membranständige Form der Guanylyl-Cyclase (GC-A) bei den spontan hypertensiven Ratten am Herzen geringer exprimiert wird als bei den Wildtyp-Ratten. Weitere RNase Protection Assays unter dieser Fragestellung konnten diese Beobachtung jedoch nicht eindeutig bestätigen.

3.4. Nachweis der exprimierten β_1 -Untereinheit im Immunoblot

Nachdem die Expression der β_1 -Untereinheit in humanem Herzgewebe sowie im Herz- und Aortengewebe der Ratte mittels RNase Protection Assay in Abschnitt 3.3. nachgewiesen wurde, wurde die Expression der β_1 -Untereinheit auf Proteinebene im Aortengewebe der Ratte durch Immunoblot überprüft. Bei einem Molekulargewicht von 67 kDa konnte ein

Signal für die β_1 -Untereinheit nachgewiesen werden. Zur Kontrolle des Versuches wurde eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt. Die beiden Proben wurden jeweils der gleichen Behandlung unterzogen, nur das bei einer der beiden Proben zusätzlich eine Peptidverdrängung, wie in 2.5.4. beschrieben, durchgeführt wurde. Durch die Peptidverdrängung, die mit einem spezifisch an den GC-3-Antikörper bindenden Peptid durchgeführt wurde, wurde das spezifische durch den Antikörper induzierte Signal auf dem Röntgenfilm unterdrückt, was in Abbildung 3.10. deutlich erkennbar ist. Außerdem zeigt die Abbildung, daß die β_1 -Untereinheit im Cytosol lokalisiert ist. Vergleicht man die mit aufgereinigtem Cytosol durchgeführten Untersuchungen mit den membranstrukturen enthaltenden Homogenat-Untersuchungen, so ist das Signal der β_1 -Untereinheit bei 67 kDa beim Cytosol deutlich stärker.

3.5. Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität am menschlichen Herzen

3.5.1. Reinigung cytosolischer Guanylyl-Cyclase

Von menschlichem Herzgewebe ausgehend wurde durch Homogenisation und anschließende Zentrifugation eine cytosolische Fraktion hergestellt. Guanylyl-Cyclase wurde mittels Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose angereichert. Die Eluate wurden in 2 ml-Fraktionen gesammelt. In jeder Fraktion wurde die Proteinkonzentration und die Aktivität der durch DEA / NO stimulierten Guanylyl-Cyclase bestimmt.

3.5.2. Stimulierbarkeit der cytosolischen Guanylyl-Cyclase am menschlichen Herzen

Die Stimulierbarkeit des Enzyms wurde mit und ohne Zusatz von DEA / NO oder Protoporphyrin IX, welches bis auf das fehlende zentrale Eisenatom mit Häm identisch ist, durch Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven untersucht. Die Aktivierbarkeit wurde bei konstanten Proteinkonzentrationen von 50 μ l je Ansatz und mit variablen DEA / NO- oder Protoporphyrin IX-Konzentrationen (1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M) in Anwesenheit von 3 mM $MgCl_2$ bestimmt. In den Abbildungen 11 und 12 sind die Konzentrations-Wirkungskurven für die Aktivität der löslich Guanylyl-Cyclase unter Stimulation durch DEA / NO und Protoporphyrin IX dargestellt. Unter DEA / NO-Stimulation erhöht sich die Enzymaktivität um das 8,8fache des Ausgangswertes, unter Protoporphyrin IX-Stimulation um das 8,0fache. Für die Stimulation durch DEA / NO wurde ein EC_{50} - Wert von 184 ± 52 nM, für die Stimulation durch Protoporphyrin IX ein EC_{50} - Wert von $4,3 \pm 0,84$ μ M ermittelt.

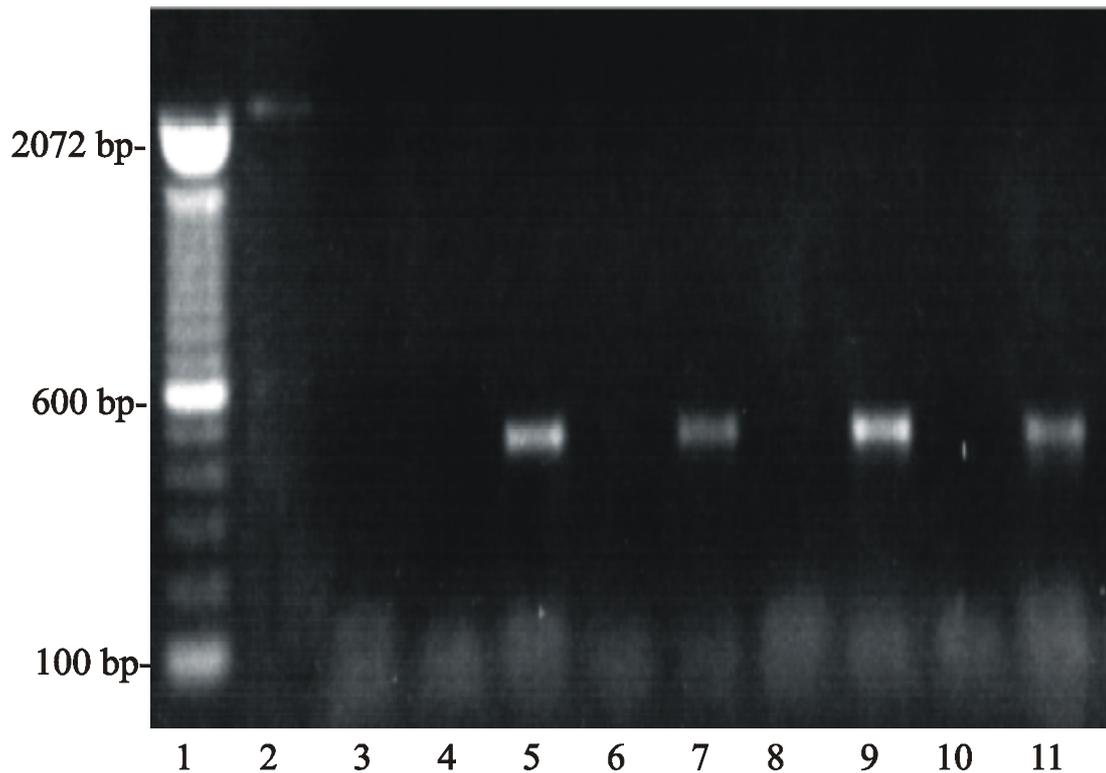


Abbildung 1: cDNA-Fragmentkonstruktion von GC-A

Photographie eines Agarosegels, das zur Kontrolle der erfolgreichen Konstruktion von GC-A mit Hilfe der reversen Transkription und der PCR durchgeführt wurde. Die Banden entsprechen Ethidiumbromid markierten cDNA-Fragmenten.

- 1 DNA-Längenstandard
- 2 Laufspur ohne Probe
- 3 Laufspur ohne Probe
- 4 humane Nabelschnur-RNA ohne Zusatz von reverser Transkriptase
- 5 humane Nabelschnur-RNA mit Zusatz von reverser Transkriptase
- 6 humane Herzgewebe-RNA ohne Zusatz von reverser Transkriptase
- 7 humane Herzgewebe-RNA mit Zusatz von reverser Transkriptase
- 8 humane Plazenta-RNA ohne Zusatz von reverser Transkriptase
- 9 humane Plazenta-RNA mit Zusatz von reverser Transkriptase
- 10 humane Herzgewebe-RNA ohne Zusatz von reverser Transkriptase
- 11 humane Herzgewebe-RNA mit Zusatz von reverser Transkriptase

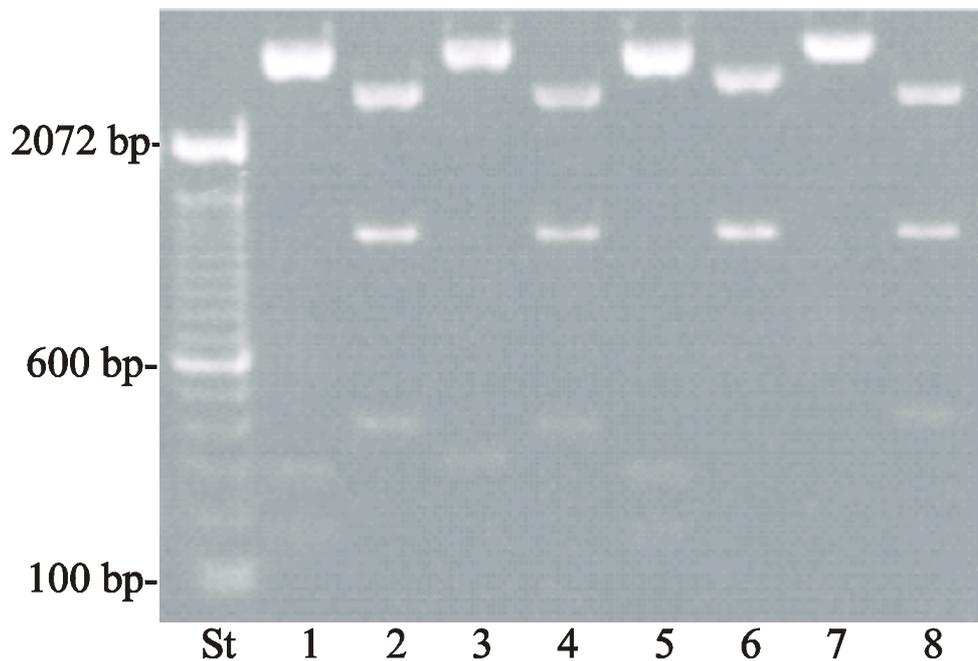


Abbildung 2: Überprüfung der cDNA-Fragmente durch Restriktionsanalyse

Photographie eines Agarosegels, das nach analytischem Restriktionsverdau zur Kontrolle der Large-Scale Präparation angefertigt wurde. Es zeigt, daß es sich bei der isolierten cDNA tatsächlich um die membranständige Guanylyl-Cyclase handelt. Die Banden entsprechen mit Etidiumbromid markierten cDNA-Fragmenten.

St DNA-Längenstandard

- 1 GC-A human x EcoRI
- 2 GC-A human x Pst I
- 3 GC-A human x EcoRV
- 4 GC-A human x Pst I x Spe I
- 5 GC-A Ratte x EcoRI
- 6 GC-A Ratte x Pst I
- 7 GC-A Ratte x EcoRV
- 8 GC-A Ratte x Pst I x Spe I

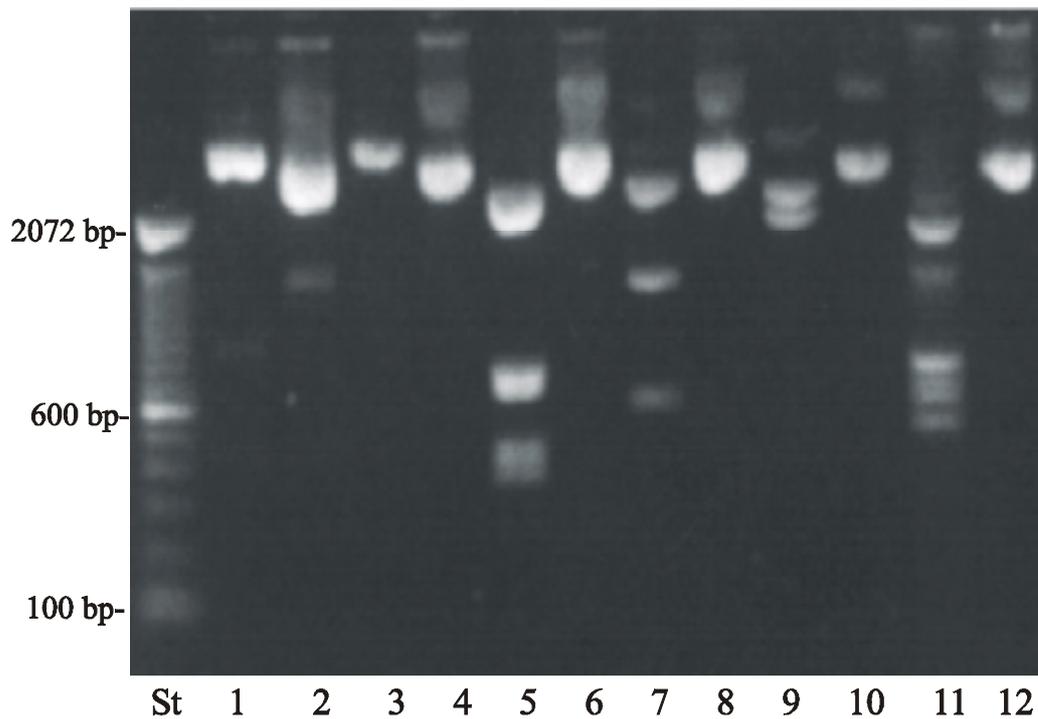


Abbildung 3: Linearisierung der Transkriptionsvektoren

Photographie eines Agarosegels, das zur Kontrolle der Linearisierung der Transkriptionsvektoren durchgeführt wurde. Von den dargestellten linearisierten Plasmiden wurden im nächsten Schritt in-vitro cRNA-Sonden transkribiert. Die Banden entsprechen Ethidiumbromid markierten cDNA-Fragmenten.

St DNA-Längenstandard

- 1 β_2E_2 -Untereinheit der Ratte mit Xho I linearisiert
- 2 β_2E_2 -Untereinheit der Ratte
- 3 β_2PCR -Untereinheit der Ratte mit BamHI linearisiert
- 4 β_2PCR -Untereinheit der Ratte
- 5 α_1 -Untereinheit der Ratte mit Pvu II linearisiert
- 6 α_1 -Untereinheit der Ratte
- 7 β_1 -Untereinheit der Ratte mit Nae I linearisiert
- 8 β_1 -Untereinheit der Ratte
- 9 GC-A der Ratte mit Sca I linearisiert
- 10 GC-A der Ratte
- 11 α_2 -Untereinheit der Ratte mit Hga I linearisiert
- 12 α_2 -Untereinheit der Ratte

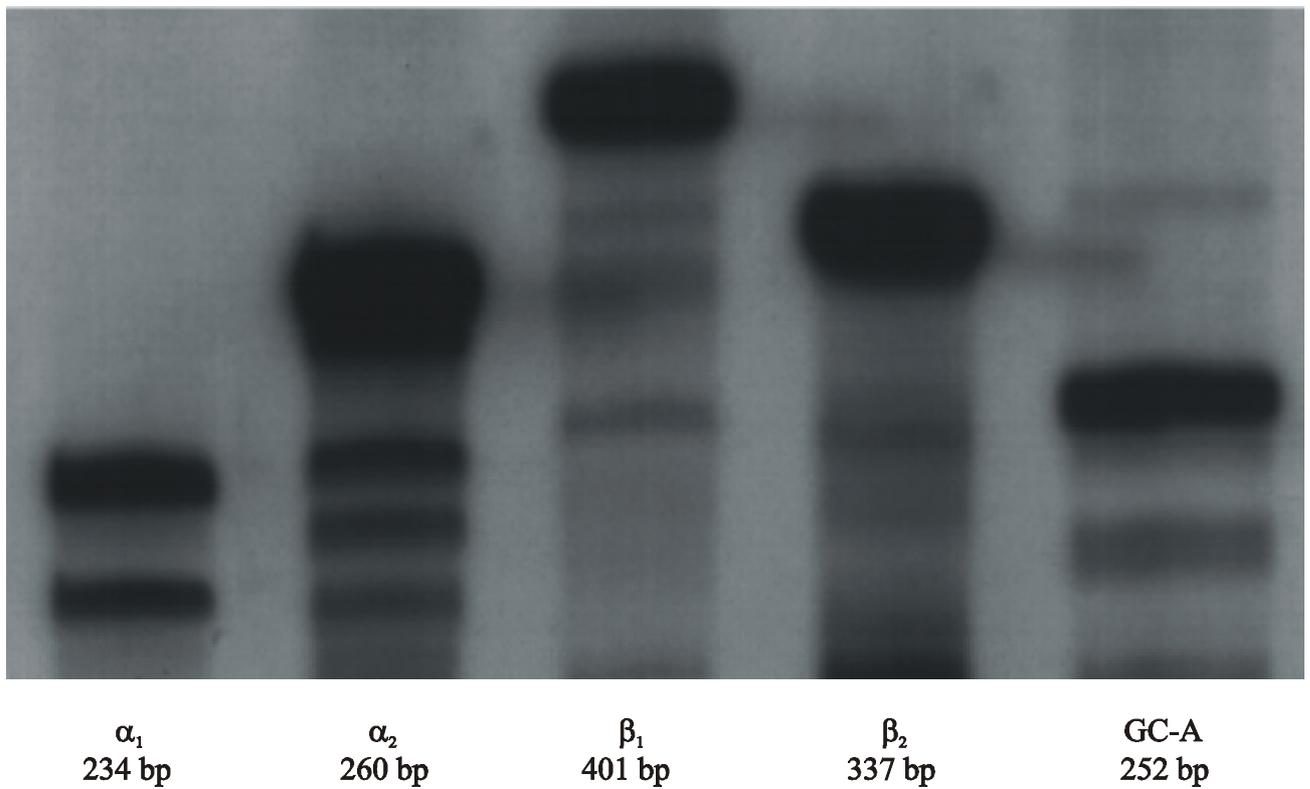


Abbildung 4: ^{32}P -markierte cRNA-Sonden

Autoradiographie von ^{32}P -markierten cRNA-Sonden, 50 μCi pro Spur, aufgetrennt im Polyacrylamidgel. Die Transkriptionsprodukte der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase und der membranständigen Guanylyl-Cyclase GC-A haben die erwartete Größe (siehe Tabelle 2). Die kleineren cRNA-Bänder entstehen durch vorzeitigen Abbruch der Transkription.

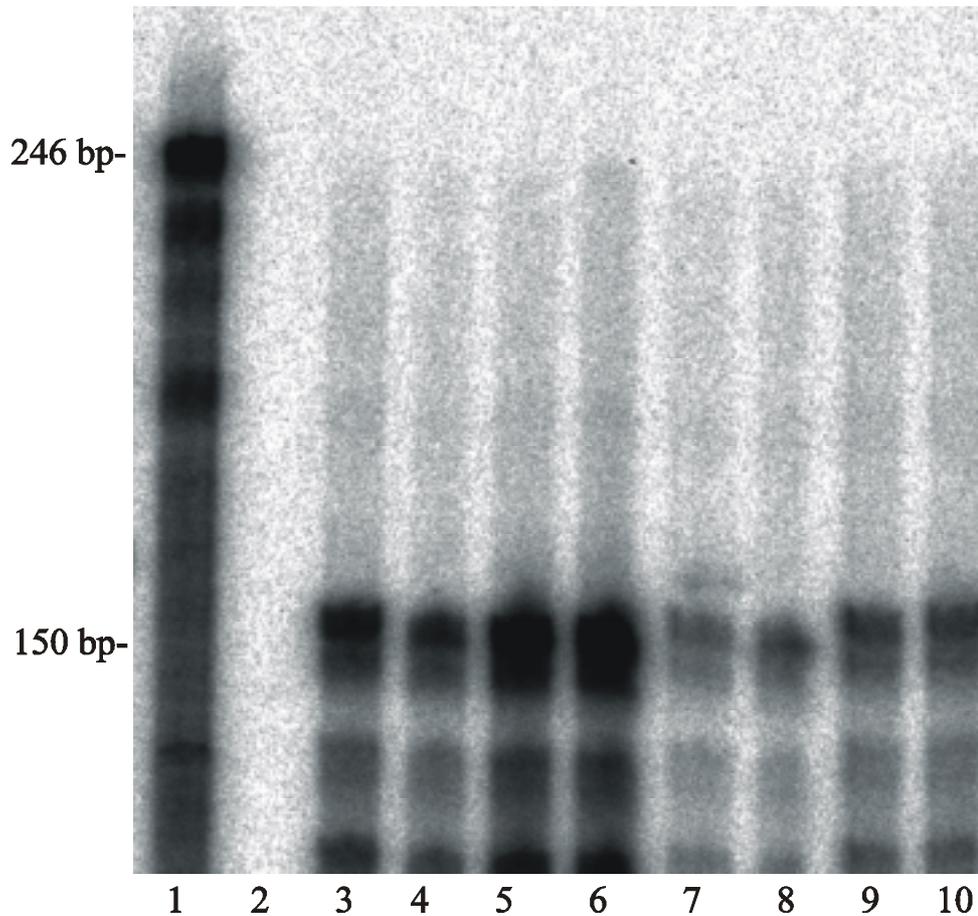


Abbildung 5: RPA-Analyse mit der BNP-Sonde von Herzgewebe der SHR- und WKY-Ratten

RNase Protection Assay mit RNA von Herzgewebe der Ratte und BNP als Sonde. Jeder Probenansatz enthielt 5 μ g RNA und 100000 dpm Sonde.

- 1 BNP-Sonde, unverdaut
- 2 BNP-Sonde, verdaut
- 3 und 4 RNA des linken Ventrikels einer WKY-Ratte und BNP-Sonde
- 5 und 6 RNA des linken Ventrikels einer SHR-Ratte und BNP-Sonde
- 7 und 8 RNA des rechten Ventrikels einer WKY-Ratte und BNP-Sonde
- 9 und 10 RNA des rechten Ventrikels einer SHR-Ratte und BNP-Sonde

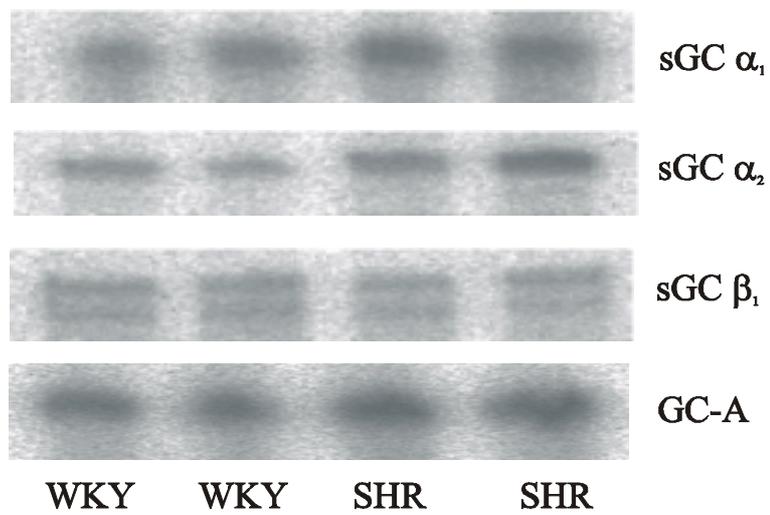


Abbildung 6: RPA-Analyse von Aortengewebe der SHR- und WKY-Ratten

RNase Protection Assay mit RNA von Aorta der Ratte. Jedem Probenansatz wurden 5 μ g RNA und 100000 dpm einer der Sonden hinzugefügt.

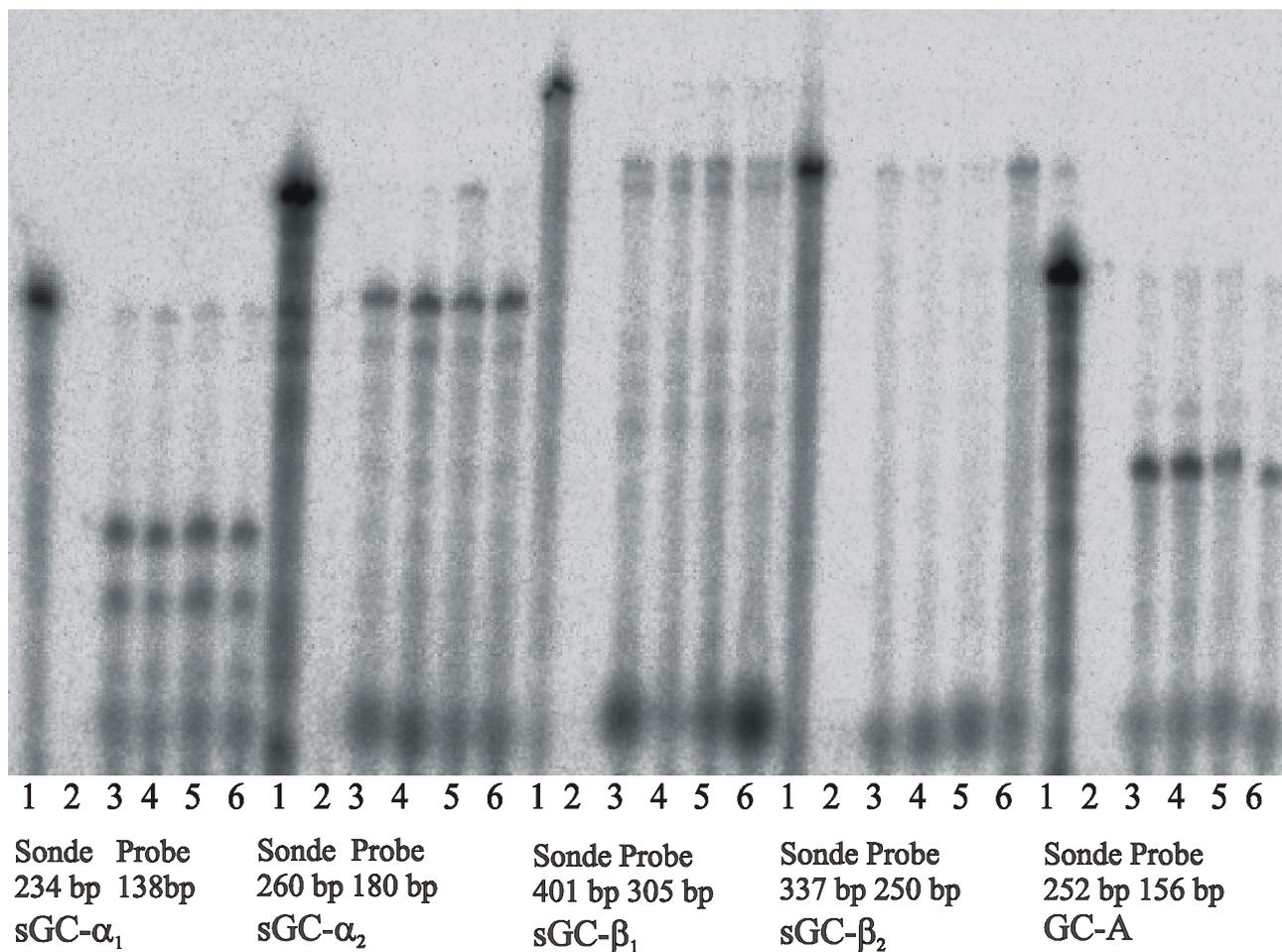


Abbildung 7: RPA vom Herzgewebe von SHR- und WKY-Ratten

RNase Protection Assay nach 12stündiger Phosphoimager-Exposition. Jede Probe enthielt 5 μ g RNA und 100000 dpm einer Sonde.

- 1 Sonde, unverdaut
- 2 Sonde, verdaut
- 3 und 4 Sonde mit RNA von WKY-Ratten
- 5 und 6 Sonde mit RNA von SHR-Ratten

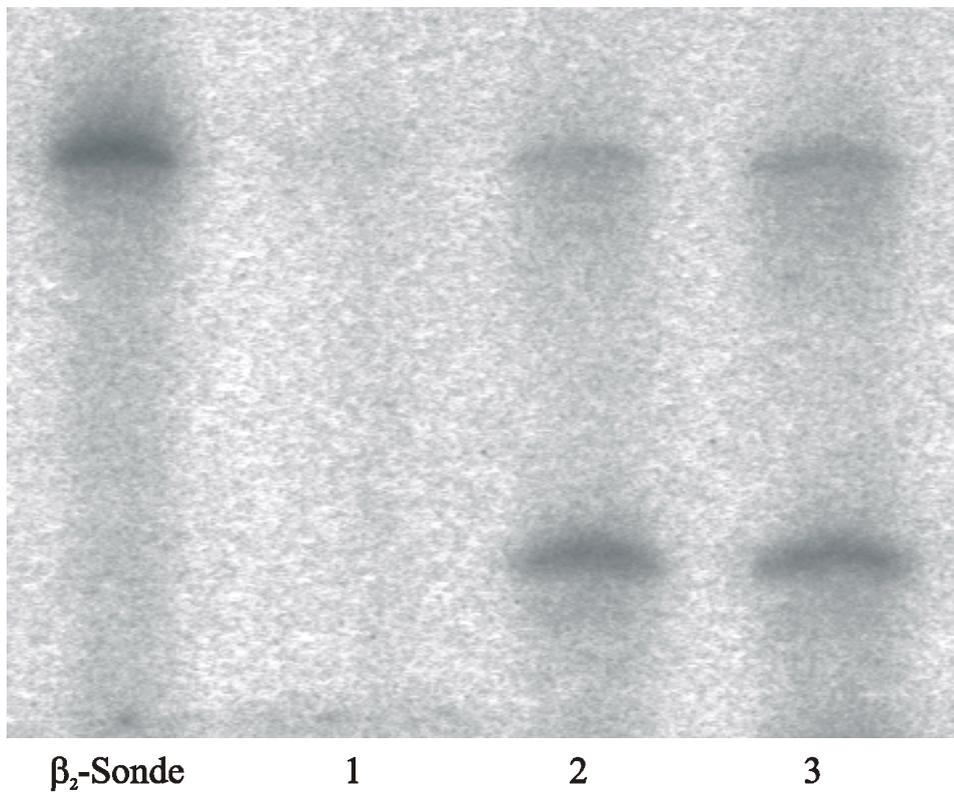


Abbildung 8: RPA mit der β_2 -Sonde mit RNA vom Nierengewebe der Ratte

RNase Protection Assay mit RNA vom Nierengewebe nach 12stündiger Phosphoimager-Exposition. Jede Probe enthielt 5 μ g RNA und 100000 dpm der β_2 -Sonde.

β_2 -Sonde, unverdaut

1 β_2 -Sonde, verdaut

2 und 3 β_2 -Sonde mit RNA vom Nierengewebe der Ratte (Doppelbestimmung)

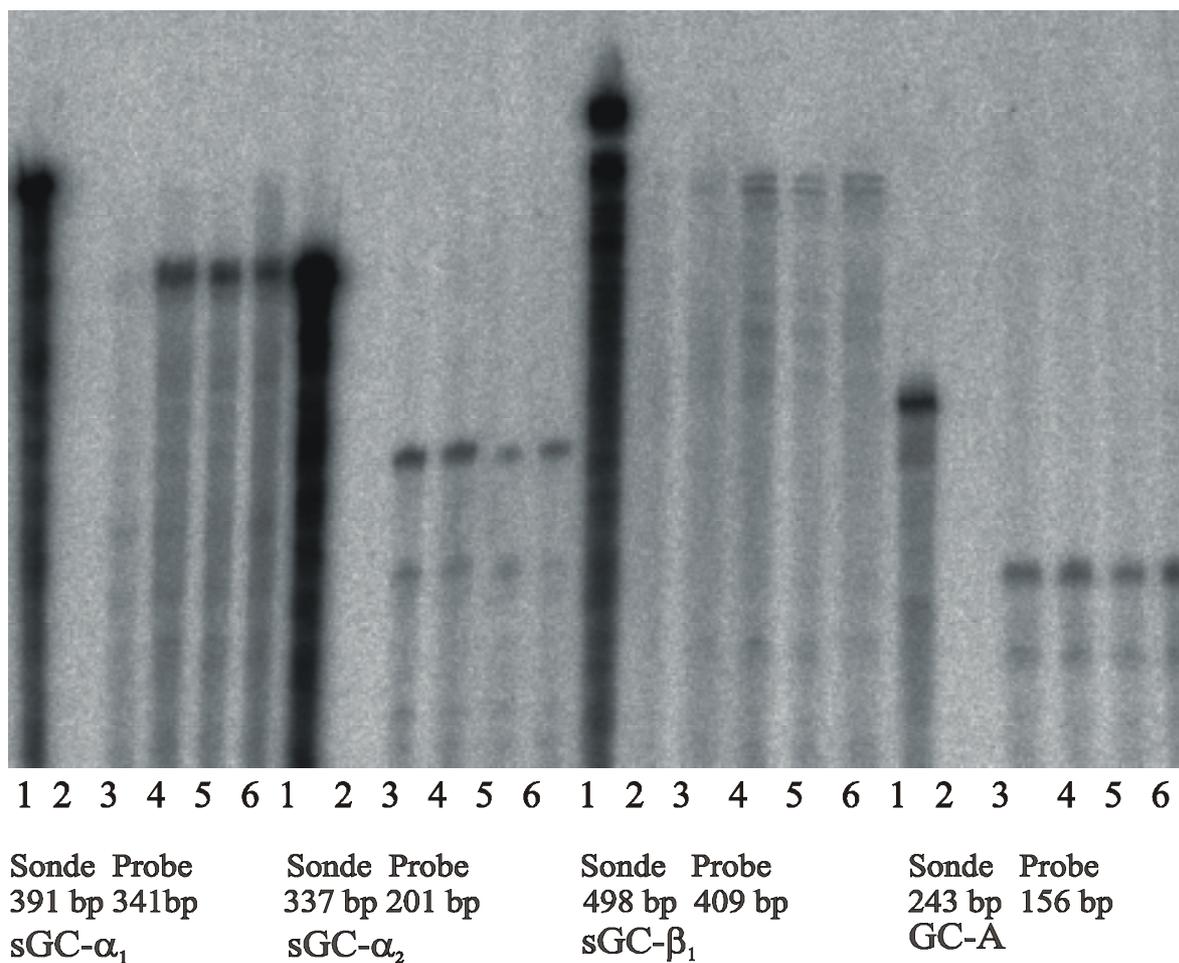


Abbildung 9: RPA-Analyse von humanem Herz- und Plazentagewebe

RNase Protection Assay mit humaner RNA nach 12stündiger Phosphoimager-Exposition. Jede Probe enthält 5 μ g RNA und 100000 dpm einer der Sonden.

- 1 Sonde, unverdaut
- 2 Sonde, verdaut
- 3 Sonde mit RNA von Plazentagewebe
- 4 Sonde mit RNA vom Ventrikelgewebe eines Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie
- 5 Sonde mit RNA vom Ventrikel eines Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie
- 6 Sonde mit RNA vom Vorhofgewebe

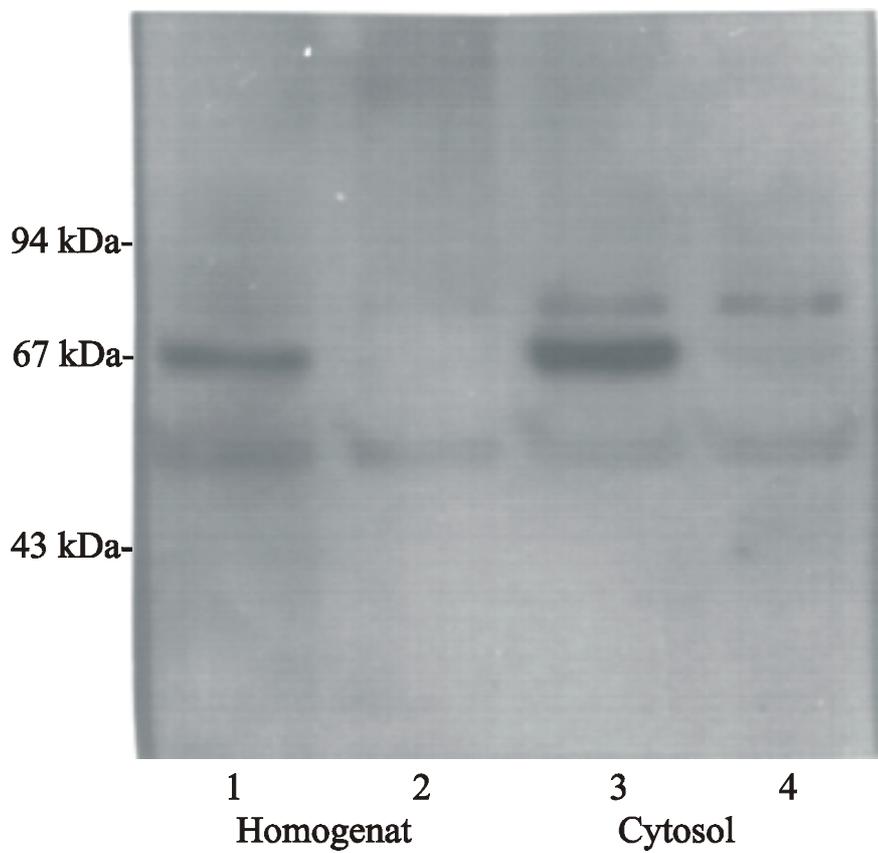


Abbildung 10: Immunoblot Ratte Aorta mit Nachweis der β_1 -Untereinheit

- 1 Homogenat aus Aortengewebe der Ratte ohne Peptidverdrängung
- 2 Homogenat aus Aortengewebe der Ratte mit Peptidverdrängung
- 3 Cytosol von Aortengewebe der Ratte ohne Peptidverdrängung
- 4 Cytosol von Aortengewebe der Ratte mit Peptidverdrängung

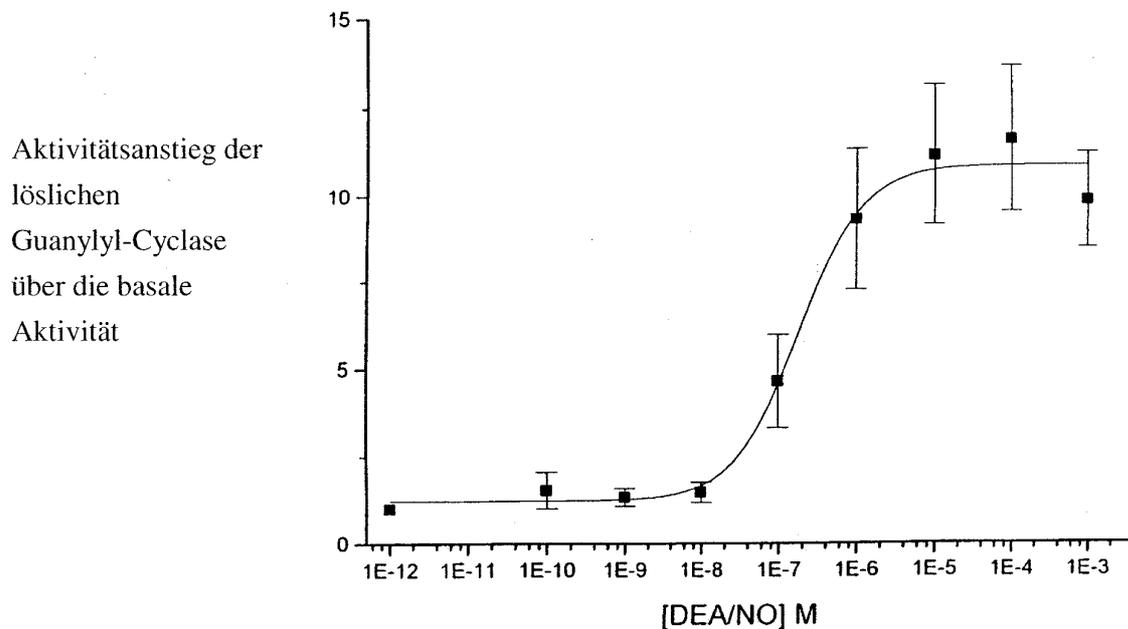


Abbildung 11: DEA / NO-Stimulation der löslichen Guanylyl-Cyclase

Die Enzymaktivität der löslichen Guanylyl-Cyclase wurde in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen des NO-Spenders DEA / NO ermittelt. Der Ausgangswert der basalen Aktivität betrug 100 pmol / mg / min bei einer Standardabweichung (SD) von 119.

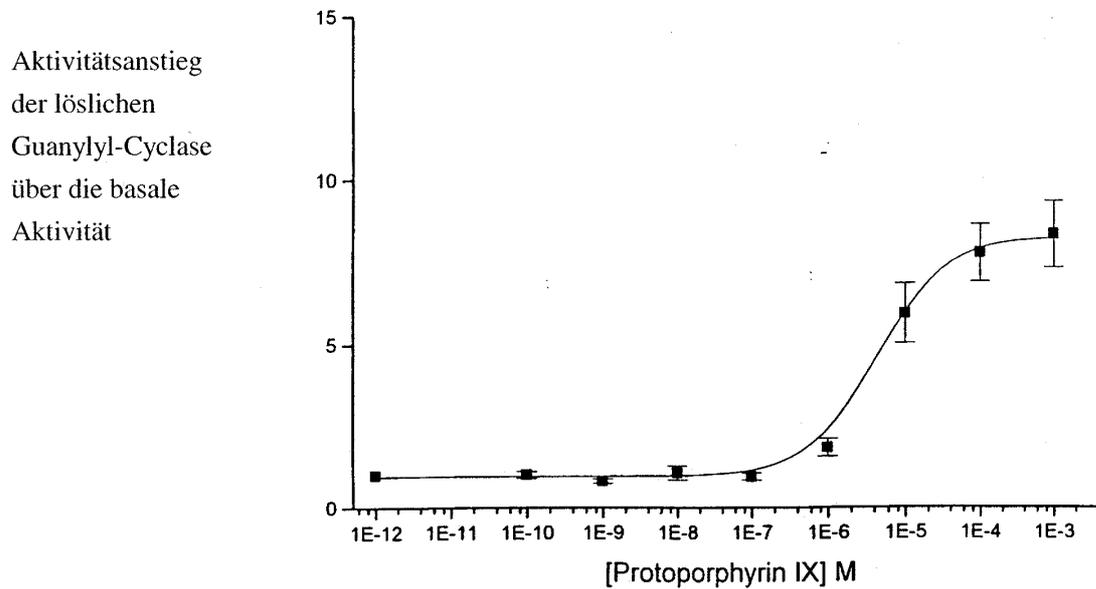


Abbildung 12: Protoporphyrin IX-Stimulation der löslichen Guanylyl-Cyclase

Die Enzymaktivität wurde in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen von Protoporphyrin IX ermittelt. Der Ausgangswert der basalen Aktivität betrug 75 pmol / mg / min bei einer Standardabweichung (SD) von 23,5.

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der verschiedenen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase an den Geweben des Herz-Kreislaufsystems von Mensch und Ratte untersucht. Die NO-sensitive, lösliche Guanylyl-Cyclase ist ein hämhaltiges heterodimeres Enzym. Die Verteilung der Isoformen der α - und β -Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase in Geweben des Herz-Kreislaufsystems ist von großem Interesse, da einige der bekannten Untereinheiten ein ubiquitäres Expressionsmuster aufweisen, während andere Untereinheiten nur limitiert exprimiert werden (Furuyama et al. 1993, Papapetropoulos et al. 1996). Die Expressionsanalyse der Untereinheiten in den verschiedenen Geweben könnte Auskunft über physiologische Regulationsvorgänge liefern, denen die Expression der Untereinheiten unterliegt. Daraus könnte später die Entwicklung von Wirkstoffen resultieren, die die Aktivität der löslichen Guanylyl-Cyclase gewebespezifisch beeinflussen.

Die β_1 -Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase wurde 1988 zeitgleich von Koesling und Mitarbeitern als Protein aus Rinderlunge beziehungsweise von Nakane und Mitarbeitern aus Rattenlunge isoliert, die Aminosäuresequenz bestimmt und die zugehörige cDNA kloniert. 1990 gelang den beiden Arbeitsgruppen erneut zeitgleich die Isolierung, Aminosäurebestimmung und cDNA-Klonierung der α_1 -Untereinheit in Rinder- und Rattenlunge (Koesling et al. 1988 und 1990, Nakane et al. 1988 und 1990). Giuli und Mitarbeiter konnten 1992 die cDNA der α_1 -Untereinheit aus humanem Hirngewebe klonieren. Die hier mit α_1 und β_1 bezeichneten Untereinheiten der Spezies Mensch werden in der Literatur auch als α_3 - und β_3 -Untereinheiten bezeichnet, obwohl die Homologie zu den aus Rinderlunge klonierten bereits bekannten α_1 - und β_1 -Untereinheiten darauf schließen läßt, daß es sich um speziesbedingte Variationen der jeweiligen Untereinheiten und nicht um selbständige Untereinheiten handelt (Hobbs et al. 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Herz- und Plazentagewebe des Menschen sowie Herz- und Aortengewebe der Ratte mittels RNase Protection Assay auf die Expression der Untereinheiten untersucht. Laut Literaturangaben weisen die α_1 - und β_1 -Untereinheiten ein ubiquitäres Expressionsmuster sowohl in den humanen Geweben als auch in den Geweben der Ratte auf (Nakane et al. 1990, Papapetropoulos et al. 1996). In den von uns untersuchten Geweben waren diese beiden Untereinheiten nachweisbar, was im Einklang mit den Literaturangaben steht. Die lösliche Guanylyl-Cyclase besteht aus einem Heterodimer (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991), das in der Zusammensetzung α_1 / β_1 in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert wird (Nakane et al. 1990). Die Lokalisation der α_1 - und β_1 -Untereinheit im menschlichen Genom wurde lange Zeit diskutiert. Giuli et al. zeigten 1993, daß die α_1 - und β_1 -Untereinheit im menschlichen Genom auf Chromosom 4 kolokalisiert sind, während Schuler et al. 1996 die α_1 -Untereinheit auf Chromosom 8 des menschlichen Genoms lokalisierten. Dieses warf

zunächst die Frage auf, ob zwei Gene für die α_1 -Untereinheit im menschlichen Genom existieren oder ob bei den Untersuchungen von Giuli und Mitarbeitern 1993 die α_1 -Untereinheit über eine Kreuzhybridisierung mit der β_1 -Untereinheit zu der Kolokalisation der beiden Untereinheiten auf Chromosom 4 geführt hat. 1998 zeigten Azam et al., daß die α_1 - und β_1 -Untereinheit im Genom der Ratte auf einem Chromosom kolokalisiert sind. Behrends und Mitarbeiter wiesen 2000 mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) im menschlichen Genom direkt eine Kolokalisation der α_1 - und β_1 -Untereinheit auf Chromosom 4 nach, während auf Chromosom 8 kein Signal für die α_1 -Untereinheit nachgewiesen werden konnte. Die den α_1 - und β_1 -Untereinheiten des Menschen entsprechenden Homologe der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* liegen in gegenseitiger Nachbarschaft auf dem *Drosophila*-Chromosom 3 Band 99B1 - 99B11 bzw. 100B1 – 100B9. Die evolutionäre Konservierung der Kolokalisation beruht möglicherweise auf einem Vorteil dieser Anordnung, die zum Beispiel durch die gemeinsame Nutzung regulatorischer Elemente durch beide Gene eine balancierte Expression beider Untereinheiten gewährleistet.

Der Nachweis der Expression der α_2 -Untereinheit, die von Harteneck und Mitarbeitern 1991 aus humanem Hirngewebe identifiziert und von Yu und Mitarbeitern 1996 auf dem humanen Chromosom 11 lokalisiert werden konnte, erfolgte bisher lediglich in humanem fetalem Gehirn, Retina, Plazenta und in einigen Zelllinien, jedoch nicht in humanem Herzgewebe wie die α_1 - und β_1 -Untereinheiten (Papapetropoulos et al. 1996). Vor kurzem erst konnte die α_2 -Untereinheit zum ersten Mal auf Proteinebene nachgewiesen werden (Russwurm et al. 1998). Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte die α_2 -Untereinheit sowohl im humanen Herzgewebe als auch in allen anderen untersuchten Geweben von Mensch und Ratte mittels RNase Protection Assay nachgewiesen werden. Die α_2 -Untereinheit bildet wie die α_1 -Untereinheit ein heterodimeres Enzym mit der β_1 -Untereinheit (Russwurm et al. 1998). Dieses wird durch frühere Befunde von Harteneck und Mitarbeitern unterstützt, die nach Koexpression von α_2 - und β_1 -cDNA in COS-Zellen enzymatische Aktivität nachweisen konnten (Harteneck et al. 1991). Die nun in unseren Untersuchungen im RNase Protection Assay mit mRNA aus dem menschlichen Herzen nachgewiesene α_2 -Untereinheit war in ihrer Signalintensität mit denen der α_1 - und β_1 -Untereinheiten vergleichbar. Die Signalintensität der mRNA der α_2 -Untereinheit war im menschlichen Herzen außerdem gleich hoch wie das Signal in menschlicher Plazenta. Daraus kann man folgern, daß die Expression der α_2 -Untereinheit im menschlichen Herzen der in der menschlichen Plazenta ähnelt. Dies läßt vermuten, daß am menschlichen Herzen ähnlich wie in der Plazenta α_2/β_1 - und α_1/β_1 -heterodimere Enzyme exprimiert werden (Russwurm et al. 1998). Die im Rahmen der Studie von Russwurm und Mitarbeitern durchgeführte Analyse der aus humaner Plazenta isolierten α_2/β_1 -heterodimeren Enzyme wies keine Unterschiede im Vergleich zum α_1/β_1 -heterodimeren Enzym in Bezug auf Hämgehalt, NO-Sensitivität, Kinetik und Ansprechen auf die Modulatoren YC-1 und ODQ auf (Russwurm et al. 1998). Die Existenz von möglichen isoformspezifischen Substanzen ist noch nicht untersucht worden und der physiologische

Hintergrund von zwei unterschiedlichen Isoformen der löslichen Guanylyl-Cyclase ist noch unklar. Eine Möglichkeit sind unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen der Isoformen, die über Interaktion von Cytoskelettproteinen mit den α -Untereinheiten vermittelt wird. Die α_1 - und α_2 -Untereinheiten besitzen zu 48 % identische Aminosäuren. In der C-terminalen katalytischen Region und den zentralen Bezirken der Untereinheiten, die für die Dimerisierung verantwortlich sind, stimmen die Aminosäuren sogar zu 87 % überein. Dagegen sind in der N-terminalen Region, die unter anderem für die Häm-Bindung eine Rolle spielt, nur 27 % der Aminosäuren identisch. Für die α_2 -Untereinheit wurde in verschiedenen Zelllinien und menschlichen Geweben eine alternative Splicevariante (α_{2i}) gefunden, die 31 zusätzliche Aminosäuren nahe dem C-Terminus aufweist (Behrends et al. 1995). Für die α_{2i} -Splicevariante konnte in Koexpression mit der β_1 -Untereinheit jedoch keine Guanylyl-Cyclase-Aktivität nachgewiesen werden. In weiteren Koexpressionsexperimenten wurde jedoch gezeigt, daß die α_{2i} -Splicevariante mit der α_2 -Untereinheit um die Bindung an der β_1 -Untereinheit konkurriert und somit die α_2/β_1 katalysierte Guanylyl-Cyclase-Aktivität vermindert. Dieses sind mögliche posttranskriptionale Regulationsmechanismen, die den NO-cGMP-Signaltransduktionsweg beeinflussen können. In den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit mit Geweben des Herz-Kreislaufsystems lag die Expression der α_{2i} -Splicevariante im RNase-Protection-Assay unter der Nachweisgrenze.

Die β_2 -Untereinheit wurde erstmals von Yuen und Mitarbeitern 1990 aus Rattenniere gereinigt und kloniert. Da die β_2 -Untereinheit erst 1999 auch aus humanem Gewebe kloniert werden konnte (Behrends et al. 2000), beschränkten sich die Untersuchungen zur Expression der β_2 -Untereinheit am Herz-Kreislaufsystem in dieser Arbeit auf Gewebe der Ratte. Die Expression der β_2 -Untereinheit in Herz- und Aortengewebe der Ratte überschritt im Gegensatz zu den unerwartet hohen Expressionsspiegeln der α_2 -Untereinheit die Nachweisgrenze im RNase Protection Assay nicht. In der Niere der Ratte konnte die β_2 -Untereinheit allerdings nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein, die für die β_2 -Untereinheit einen insgesamt niedrigen Expressionsspiegel nachwiesen. Die Erstbeschreiber der β_2 -Untereinheit konnten das Signal der β_2 -Untereinheit im Northern Blot erst nach 14-stündiger Exposition auf dem Autoradiographen nachweisen, während das Signal der β_1 -Untereinheit bereits nach 5 Stunden sichtbar war (Yuen et al. 1990). Ujii und Mitarbeiter konnten 1993 mittels RT-PCR zeigen, daß die β_2 -Untereinheit nur in 29 % ihrer Experimente in interlobulären Arterien und afferenten Arteriolen der Niere, jedoch durchgehend in kortikalen Gefäßen der Rattenniere gemeinsam mit der α_1 -Untereinheit nachweisbar war. Durch die niedrigen Expressionsspiegel ist zu erklären, daß die β_2 -Untereinheit bis heute noch nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. In den meisten bisherigen Untersuchungen der β_2 -Untereinheit konnte kein aktiv cGMP-synthetisierendes heterodimeres Enzym mit einer der bekannten Untereinheiten gefunden werden. Lediglich Gupta und Mitarbeiter zeigten eine NO-sensitive Formation eines α_1/β_2 -heterodimeren Enzyms nach Expression der α_1 - und β_2 -Untereinheit von cDNA der Ratte in

COS-Zellen (Gupta et al. 1997). Da die β_2 -Untereinheit in der C-terminalen Domäne über eine CAAX-Konsensussequenz verfügt (Yuen et al. 1990), ist diese Domäne der β_2 -Untereinheit wahrscheinlich durch die posttranslationale Bindung eines Isoprenoids lipophil. Daher könnte theoretisch die subzelluläre Lokalisation einer die β_2 -Untereinheit enthaltenden Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase an der Plasmamembran lokalisiert sein. In der Tat haben Gupta und Danziger gezeigt, daß die C-terminale Region der β_2 -Untereinheit der Ratte, die die CAAX-Konsensussequenz enthält, essentiell für die Bindung des überexprimierten α_1 / β_2 -Heterodimers an die Plasmamembran in MDCK-Zellen ist (Gupta und Danziger 1998). Die funktionelle Bedeutung dieser Sequenz ist aber noch unklar.

In der Studie von Russwurm und Mitarbeitern 1998 wurden an aus mit Baculovirus infizierten Sf9 Zellen gewonnenen α_1 / β_1 - und α_2 / β_1 - heterodimeren Enzymen EC_{50} -Werte unter DEA / NO-Stimulation von 690 ± 110 nM und 510 ± 92 nM gemessen. Diese Werte waren höher als die EC_{50} -Werte, die in der vorliegenden Arbeit an gereinigtem Cytosol von menschlichem Herzgewebe unter DEA / NO-Stimulation gemessen wurden (184 ± 52 nM). Dieser Unterschied kann jedoch durch die Untersuchungsbedingungen erklärt werden. In der Studie von Russwurm et al. wurde die Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Anwesenheit von 3 mM DTT gemessen, das eine Rechtsverschiebung der DEA / NO-Konzentrationsabhängigen Kurve bewirkt, wie es von Mayer et al. für das Thiol GSH beschrieben wurde (Mayer et al. 1995). Die in dieser Studie gemessenen EC_{50} -Werte für Protoporphyrin IX, die eisenfreie Vorstufe des Häm, in gereinigtem Cytosol von menschlichem Herzgewebe liegen in der gleichen Größenordnung, wie es schon für das isolierte α_1 / β_1 -Heterodimer der löslichen Guanylyl-Cyclase beschrieben wurde ($2,1 \mu\text{M}$, Foerster et al. 1996). Aus diesen Ergebnissen läßt sich vermuten, daß die lösliche Guanylyl-Cyclase im menschlichen Herzen hauptsächlich durch α_1 / β_1 - und α_2 / β_1 -heterodimere Enzyme gebildet wird.

Die mögliche Existenz weiterer Isoformen der löslichen Guanylyl-Cyclase neben den bisher in vivo nachgewiesenen α_1 / β_1 - und α_2 / β_1 -Isoformen (Giuli et al. 1992, Chhajlani et al. 1991, Russwurm et al. 1998) ist trotz der vier bekannten Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase noch nicht geklärt. Nach unserer Definition besteht eine Isoform der löslichen Guanylyl-Cyclase aus einem Heterodimer, im Prinzip könnte sie jedoch auch durch ein Homodimer gebildet werden. Für die Adenylyl-Cyclase, ein Monomer, und die partikuläre Guanylyl-Cyclase, ein Homodimer, war die Identifikation der unterschiedlichen Isoformen im Vergleich zu der löslichen Guanylyl-Cyclase relativ einfach - jedes unterschiedliche Genprodukt stellt eine unterschiedliche Isoform dar. Für die lösliche Guanylyl-Cyclase mit ihren vier bekannten Untereinheiten ergeben sich dagegen 16 verschiedene homo- und heterodimere Kombinationen. Jede dieser Kombinationen könnte eine Isoform darstellen. Bisher konnte jedoch lediglich eine mögliche α_1 / β_2 -Kombination neben den schon in vivo nachgewiesenen α_1 / β_1 - und α_2 / β_1 -Isoformen in Expressionsexperimenten als weitere

Isoform vermutet werden (Gupta et al. 1997). Eine weitere Besonderheit der heterodimeren löslichen Guanylyl-Cyclase ist die Erfordernis der Koexpression der Untereinheiten. So entsteht keine Aktivität wenn die α_1 - und β_1 -Untereinheit, die in unterschiedlichen humanen Zelllinien synthetisiert wurden, zusammengebracht werden. Nur wenn α_1 und β_1 in derselben Zelle gebildet werden, resultiert daraus Enzymaktivität (Shah et al. 1995, Harteneck et al. 1990).

Die Gruppe der Nukleotid-Cyclasen, die GTP oder ATP zu cyclischen Nukleotidmonophosphaten (cGMP und cAMP) umwandeln, beinhaltet neben der löslichen Guanylyl-Cyclase die membranständige Guanylyl-Cyclase und die Adenylyl-Cyclase. Eine in der Evolution konservierte katalytische Domäne definiert diese Enzymgruppe als eine Familie, die nahezu identische Reaktionen katalysiert. Aufgrund ihrer Verwandtschaft und ähnlichen Funktion könnte die Kenntnis über Struktur, katalytische Mechanismen und Regulation von einem Mitglied dieser Familie auf andere übertragbar sein. Die Adenylyl-Cyclase kann aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur löslichen Guanylyl-Cyclase eine Hilfe im Verständnis der löslichen Guanylyl-Cyclase sein. Die Adenylyl-Cyclase wird, anders als die Guanylyl-Cyclasen, die Rezeptor und katalytische Region in einem Protein beinhalten, durch Hormonrezeptoren, die über heterodimere G-Proteine wirken, stimuliert (Wedel et al. 1997). Die Adenylyl-Cyclase ist ein monomeres, in die Membran integriertes Protein. Alle in Säugetieren entdeckten Isoformen werden durch $G_s\alpha$ aktiviert, andere Aktivatoren sind isoformenspezifisch (Hanoune et al. 1997). Die Adenylyl-Cyclase beinhaltet zwei Gruppen von je sechs transmembranären Spiralen und zwei intrazellulären Schleifen. Die intrazellulären Schleifen beinhalten je eine Region, C1 oder C2, die zusammengelagert die katalytische Funktionseinheit bilden. Da dieser Bereich aus zwei Regionen einer einzigen Polypeptidkette gebildet wird, wird sie auch "pseudo-heterodimer" genannt. Es wurden mittlerweile zwei unterschiedliche katalytische Funktionseinheiten entdeckt, eine C2 / C2-homodimere und eine C1 / C2-heterodimere (Zhang et al. 1997, Tesmer et al. 1997). Die membranständige Guanylyl-Cyclase beinhaltet einen extrazellulären Rezeptor-Bereich und eine intrazelluläre katalytische Region, die durch einen einzigen transmembranären Bereich getrennt sind. Die membranständige Guanylyl-Cyclase ist ein homodimeres Enzym, bestehend aus Untereinheiten von ungefähr 120 kDa (Fulle et al. 1994). Mittlerweile wurden sieben membranständige Guanylyl-Cyclasen (GC-A bis GC-G) in Säugetieren nachgewiesen. Drei davon haben bekannte Liganden: GC-A das ANP und BNP, GC-B das CNP und GC-C hitzestabile Enterotoxine von E.coli und Guanylin. Die übrigen bekannten Guanylyl-Cyclasen sind sogenannte Waisen-Rezeptoren, deren aktivierende Liganden noch unbekannt sind (Schulz et al. 1998). Um die lösliche Guanylyl-Cyclase besser zu verstehen, kann die membranständige Guanylyl-Cyclase helfen, die typischen Charakteristika der Guanylyl-Cyclasen zu untersuchen. Zum Beispiel könnte sie helfen die Identität der Aminosäuren zu klären, die den Mitgliedern der Nukleotid-Cyclasen-Familie die Unterscheidung zwischen GTP und ATP ermöglicht.

Die dilatative Kardiomyopathie wird durch eine Erweiterung und eine verminderte Kontraktilität beider Ventrikel charakterisiert. In der Literatur wird beschrieben, daß ein erhöhter cGMP-Spiegel bei einigen Typen der Herzinsuffizienz auftritt (Michel et al. 1990, Jakob et al. 1995). Die Autoren Sadoff et al. beschrieben 1996 bei einer durch Aortenstenose induzierten linksventrikulären Hypertrophie erhöhte cGMP-Spiegel. Nach den Befunden der Autoren war das eine Folge einer erhöhten Guanylyl-Cyclase-Sensitivität und einer maximalen Aktivität des Enzyms (Sadoff et al. 1996). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß bei der Entwicklung der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz Veränderungen der Expression der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase auftreten. Zur Überprüfung dieser Hypothese verwendeten wir spontan hypertrophe Ratten, sogenannte SHR-Ratten. Mittels RNase Protection Assay das Herzmuskelgewebe untersuchten wir auf mRNA-Ebene diesbezüglich im Vergleich zu herzgesunden Wistar-Kyoto-Ratten sogenannte WKY-Ratten. Die Ratten stimmten im durchschnittlichen Alter und Gewicht gut überein. Die Herzen der SHR-Ratten waren gegenüber denen der WKY-Ratten signifikant hypertroph. Neben den vier bekannten Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase wurden auch die membranständige Guanylyl-Cyclase GC-A und ihre Liganden ANP und BNP untersucht. Die Expression von BNP, das im Ventrikelgewebe synthetisiert wird und von dem beschrieben ist, daß die Expression des BNP bei Herzinsuffizienz ansteigt, war bei unseren Untersuchungen mit Herzgewebe der SHR-Ratten deutlich gegenüber den WKY-Ratten erhöht (Ogawa et al. 1991, Mukoyama et al. 1990, Hosoda et al. 1991). Sowohl im Herzgewebe aus dem linken Ventrikel als auch aus dem rechten Ventrikel war die Expression von BNP bei den SHR-Ratten gegenüber den WKY-Ratten erhöht. Auch die Expression von ANP war im Herzgewebe der SHR-Ratten deutlich gegenüber den WKY-Ratten erhöht. Eine erhöhte Expression von GC-A wurde zunächst aufgrund der ersten Experimente angenommen, erhärtete sich in den folgenden Experimenten allerdings nicht. Keine der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase wies im Herzgewebe von SHR-Ratten verglichen mit WKY-Ratten signifikante Unterschiede in der Expression auf. Dieses Ergebnis entspricht dem von Ruetten und Mitarbeitern 1999, die die Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene und mittels Westernblot auf Proteinebene an Herzgewebe von SHR- und WKY-Ratten untersucht hat. Die Arbeitsgruppe konnte sowohl bei 6 Wochen als auch bei 17 Monate alten Ratten keinen Unterschied in der Expression auf mRNA oder Proteinebene nachweisen. Allerdings war ein signifikanter Expressionsanstieg mit höherem Alter der Ratten auf Protein- und mRNA-Ebene bei den untersuchten Untereinheiten nachweisbar (Ruetten et al. 1999). Zusammengefaßt sprechen die Ergebnisse dafür, daß der bei kardialer Hypertrophie erhöhte cGMP-Spiegel nicht über veränderte mRNA-Konzentrationen der löslichen Guanylyl-Cyclase vermittelt wird. Es wäre allerdings denkbar, daß eher eine erhöhte lösliche Guanylyl-Cyclase-Sensitivität oder starke Konzentrationserhöhung der Liganden der membranständigen Guanylyl-Cyclase GC-A ANP und BNP eine wesentliche Rolle für die erhöhten cGMP-Spiegel spielen.

5. Zusammenfassung

Organische Nitrate finden Einsatz in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen wie z. B. der koronaren Herzkrankheit. Sie wirken über eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) gefäßrelaxierend, indem sie die endogene Bildung dieses Botenstoffes imitieren. Der für den vasodilatatorischen Effekt entscheidende NO-Rezeptor ist die lösliche Guanylyl-Cyclase, ein cytosolisches Enzym, bestehend aus einem α/β -Heterodimer und einer prosthetischen Hämgruppe. In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Methoden zum Nachweis der Expression dieses Enzyms am Herz-Kreislaufsystem von Mensch und Ratte etabliert. Die mRNA der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheiten konnte dadurch mittels RT-PCR und RNase Protection Assay nachgewiesen werden. Außerdem konnte die β_1 -Untereinheit der Ratte mittels Westernblot auf Proteinebene nachgewiesen werden. Hinsichtlich der α_1 - und β_1 -Untereinheiten entsprechen die Ergebnisse dem in der Literatur beschriebenen ubiquitären Vorkommen der beiden Untereinheiten in den Organen von Mensch und Ratte. Zusätzlich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals die mRNA der α_2 -Untereinheit in humanem Herzmuskelgewebe nachgewiesen. Die Menge war dabei der α_1 -mRNA vergleichbar, was die Ko-Existenz von α_1/β_1 - und α_2/β_1 -Heterodimeren nahelegt. Dieser Befund erweitert die herkömmliche Auffassung, nach welcher das Enzym am menschlichen Herzen nur in der α_1/β_1 -heterodimeren Form vorkommt. Die Expression der β_2 -Untereinheit lag im Myokard- und Aortengewebe der Ratte unterhalb der Nachweisgrenze des RNase Protection Assays, was darauf hinweist, daß die Bedeutung der β_2 -Untereinheit in diesen Organen wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung ist. Die hier an menschlichem Myokard-Cytosol unter Stimulation mit DEA/NO und Protoporphyrin IX gemessenen Aktivitäten der löslichen Guanylyl-Cyclase stehen im Einklang mit den aus humanem Plazentagewebe bekannten enzymatischen und pharmakologischen Eigenschaften der α_1/β_1 - und α_2/β_1 -Heterodimere. Die in der Literatur beschriebene Beobachtung erhöhter cGMP-Spiegel in hypertrophem Herzmuskelgewebe veranlaßte uns zu prüfen, ob die myokardiale Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase im hypertrophen Herzen sich von derjenigen im gesunden Herzen unterscheidet. Anhand von RNase Protection Versuchen an Myokardproben kardial hypertrophierter und herzgesunder Ratten ließen sich jedoch keine Unterschiede nachweisen. Daher ist anzunehmen, daß die veränderten cGMP-Spiegel nicht mit der mRNA-Konzentration der löslichen Guanylyl-Cyclase zu erklären sind.

6. LITERATUR

Aaji C, Borst P (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochem Biophys Acta* 269: 192-200

Arnold WP, Mittal CK, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3203-3207

Asano T, Hidaka H (1977) Purification of guanylate cyclase from human platelets and effect of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 78: 910-918

Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD (1963) Isolation of adenosine 3':5'-monophosphate and guanosine 3':5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11: 330-334

Aswad DW, Greengard P (1981) A specific substrate from rabbit cerebellum for guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 256: 3487-3493

Axelsson KL, Wikberg JES, Andersson RGG (1979) Relationship between nitroglycerine cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci* 24: 1779-1786

Azam M, Gupta G, Chen W, Wellington S, Warburton D, Danziger RS (1998) Genetic mapping of soluble guanylyl cyclase genes. *Hypertension* 32: 149-154

Beavo JA, Reifsnnyder DH (1990) Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 11: 150-155

Behrends S, Harteneck C, Schultz G, Koesling D (1995) A variant of the α_2 -subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J Biol Chem* 270: 21109-21113

Behrends S, Kazmierczak B, Steenpaß A, Knauf B, Bullerdiek J, Scholz H, Eiberg H (1999) Assignment of GUCY1B2, the Gene Coding for the β_2 Subunit of Human Guanylyl Cyclase to Chromosomal Band 13q14.3 between Markers D13S168 and D13S155. *Genomics* 55: 126-127

Behrends S, Vehse K, Scholz H, Bullerdiek J, Kazmierczak B (2000) Assignment of GUCY1A3, a candidate gene for hypertension, to chromosome bands 4q31.1 \rightarrow q31.2 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 88: 204-205

Böhme E, Schultz G (1974) Separation of cyclic nucleotides by thin layer chromatography on polyethyleneimine cellulose. *Meth Enzymol* 38: 27-38

Böhme E, Jung R, Mechler I (1974) Guanylate cyclase in human platelets. *Meth Enzymol* 38: 199-202

Böhme E, Graf H, Schultz G (1978) Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9: 131-143

Böhme E, Spies C, Grossmann G, Herz J (1981) Stimulation of soluble guanylyl cyclase by sydnonimines; relaxants of smooth muscle and inhibitors of platelet aggregation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316: 26

Brandwein HJ, Lewicki JA, Murad F (1981) Reversible inactivation of guanylate cyclase by mixed disulfide formation. *J Biol Chem* 256: 2958-2962

Brüne B, Ullrich V (1988) Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 32: 497-504

Brüne B, Schmidt KU, Ullrich V (1990) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 192: 683-686

Buechler WA, Nakane M, Murad F (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 351-357

Burnette WN (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulfate-polyarylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protean A. *Anal Biochem* 112: 195-203

Chan PS, Lin MC (1974) Isolation of cyclic AMP by inorganic salt coprecipitation. *Meth Enzymol* 38: 38-41

Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV (1989) Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate-cyclases. *Nature* 341: 68-72

Chhajlani V, Frandberg PA, Ahlner J, Axelsson KL, Wikberg JE (1991) Heterogeneity in human soluble guanylate cyclase due to alternative splicing. *FEBS Lett* 290: 157-158

Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin H, Goeddel DV, Schultz S (1989) A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 338: 78-83

Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG (1975) Characterisation of particulate and soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 250: 374-381

Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S (1986) Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure: results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 314: 1547-1552

Cook NJ, Hanke W, Kaupp UB (1987) Identification, purification, and functional reconstruction of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2110-2114

Cornwell TL, Lincoln TM (1989) Regulation of intracellular Ca^{2+} levels in cultured vascular smooth muscle cells: Reduction of Ca^{2+} by atriopeptin and 8-Br-cGMP is mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264: 1146-1155

Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40: 923-931

Craven PA, DeRubertis FR (1978) Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide and related activators by heme and hemoproteins. *J Biol Chem* 253: 8433-8443

Craven PA, DeRubertis FR, Pratt DW (1979) Electron spin resonance study of the role of NO catalase in the activation of guanylate cyclase by NaN_3 and NH_2OH . *J Biol Chem* 254: 8213-8222

Deguchi T, Yoshioka M (1982) L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 257: 10147-10151

DeJonge HR (1975) The localization of guanylate cyclase in rat small intestine epithelium. *FEBS Lett* 53: 237-242

DeJonge HR (1981) Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brush borders. *Adv Cycl Nucl Res* 14: 315-323

DeRubertis FR, Craven PA (1976) Properties of the guanylate cyclase-guanosine 3':5'-monophosphate system of rat renal cortex: activation of guanylate cyclase and calcium independent modulation of tissue guanosine 3':5'-monophosphate by sodium azide. *J Biol Chem* 251: 4651-4658

Diamont J (1978) Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Adv Cycl Nucl Res* 9: 327-340

Duda T, Goraczniak RM, Sharma RK (1991) Site-directed mutational analysis of a membrane guanylate cyclase cDNA reveals the atrial natriuretic factor signalling site. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7882-7886

Felbel J, Trockur B, Ecker T, Landgraf W, Hofmann F (1988) Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea. *J Biol Chem* 263: 16764-16771

Fesenko EE, Kolesnikow SS, Luyubarski AL (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membranes of retinal rod outer segments. *Nature* 313: 310-313

Field M, Graf LH, Laird WJ, Smith PL (1978) Heat-stable enterotoxine of escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2800-2804

Fleischmann D, Devisevich M (1979) Guanylate cyclase of isolated bovine rod axonemes. *Biochemistry* 18: 5060-5066

Flynn TG, De Bold ML, DeBold AJ (1983) The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 859-865

Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Koesling D (1996) A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of α_1 and β_1 subunits. *Eur J Biochem* 240: 380-386

Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R (1986) Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res* 58: 531-538

Friebe A, Schultz G, Koesling D (1996) Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 15: 6863-6868

Friebe A, Schultz G, Koesling D (1998) Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 53: 123-127

Fülgraff G, Palm D (1997) *Pharmakotherapie – Klinische Pharmakologie*. Gustav Fischer Verlag, 10. neubearbeitete Auflage, S 243-246

Fulle HJ, Garbers DL (1994) Guanylyl cyclases: a family of receptor-linked enzymes. *Cell Biochem Funct* 12: 157-165

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376

Furchgott RF, Vanhoutte PM (1988) Endothelium derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018

Furuyama T, Inagaki S, Takagi H (1993) Localisation of α_1 and β_1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 20: 335-344

Garbers DL, Hardman JG, Rudolph FB (1974) Kinetic analysis of sea urchin sperm guanylate cyclase. *Biochemistry* 13: 4166-4171

Garbers DL, Chrisman TD, Suddath JL, Hardman JG (1975) Formation of pyrophosphate by soluble guanylate cyclase from rat lung. *Arch Biochem Biophys* 166: 136-138

Garbers DL (1976) Sea urchin sperm guanylate cyclase: purification and loss of cooperativity. *J Biol Chem* 251: 4071-4077

Garbers DL, Radany EW (1981) Characteristics of the soluble and particulate forms of guanylyl cyclase. *Adv Cycl Nucl Res* 14: 241-254

Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Frackler J, Ramdev P, Arnette D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, Loscalzo J, Stamler JS (1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10957-10961

Gerzer R, Brash AR, Hardman JG (1986) Activation of soluble guanylate cyclase by arachidonic acid and 15-lipogenase products. *Biochem Biophys Acta* 886: 383-389

Gerzer R, Radany EW, Garbers DL (1982) The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 678-686

Gerzer R, Böhme E, Hofmann F, Schultz G (1981) Soluble guanylyl cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* 132: 71-74

Giuli G, Scholl U, Bulle F, Guellaen G (1992) Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett* 304: 83-88

Giuli G, Roechel N, Scholl U, Mattei MG, Guellaen G (1993) Colocalization of the genes coding for the α_3 and β_3 subunits of soluble guanylyl cyclase to human chromosome 4 at q31.3-q33. *Hum Genet* 91: 257-260

Goldberg ND, Graff G, Haddox MK, Stephenson JH, Glass DB, Moser ME (1978) Redox modulation of splenic cell guanylate cyclase activity: Activation by hydrophilic and hydrophobic oxidants represented by ascorbic and dehydroascorbic acids, fatty acids hydroperoxides, and prostaglandin endoperoxides. *Adv Cycl Nucl Res* 9: 101-130

Graff G, Stephenson JH, Glass G, Haddox MK, Goldberg ND (1978) Activation of soluble splenic cell guanylate cyclase by prostaglandin endoperoxides and fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 253: 7662-7676

Gupta G, Danziger RS (1998) Basolateral targeting of the α_1 / β_2 form of nitric oxide-activated guanylyl cyclase is achieved by elements in the β_2 carboxyl terminus. *Circulation* 98: 488-491

Gupta G, Mohammad A, Yang L, Danziger RS (1997) The β_2 -subunit inhibits stimulation of the α_1 / β_1 -form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *J Clin Invest* 6: 1488-1492

Haddox MK, Stephenson JH, Moser ME, Goldberg ND (1978) Oxidative-reductive modulation of guinea pig splenic cell guanylate cyclase activity. *J Biol Chem* 253: 3143-3152

Halbrugge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Walter U (1990) Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kD protein in human platelets is responsible to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* 265: 3088-3093

Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Garcia R, Thibault G, Gutkowska J, Cantin M, Genest J (1984) Effects of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 515-527

Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, Shen T, Lipskaya L, Miyamoto N, Suzuki Y, Defer N (1997) Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 128: 179-194

Hansbrough JR, Garbers DL (1981) Speract: Purification and characterisation of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J Biol Chem* 256: 1447-1452

Hardman JG, Sutherland EW (1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3':5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 244: 6363-6370

Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G (1991) Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 292: 217-222

Harteneck C, Koesling D, Söling A, Schultz G, Böhme E (1990) Expression of soluble guanylate cyclase: Catalytic activity requires two subunits. *FEBS Lett* 272: 221-223

Haslam RJ, Davidson MML, Davies T, Lynham JA, McClenaghan MD (1978) Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv Cycl Nucl Res* 9: 533-552

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z (1987) Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476

Hobbs AJ (1997) Soluble guanylyl cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sciences* 18: 484-491

Hosoda K, Nakao K, Mukoyama M, Saito Y, Jougasaki M, Shirakami G, Suga S, Ogawa Y, Yasue H, Imura H (1991) Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. *Hypertension* 17: 152-1156

Hughes JM, Murad F, Chang B, Guerrant RL (1978) Role of cGMP in the action of heat-stable enterotoxine of *E. coli*. *Nature* 271: 755-756

Ignarro LJ (1991) Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 41: 485-490

Ignarro LJ, Buga RG, Wood KS, Kadowitz PJ (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by an endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: Stimulation by acetylcholin, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 237: 893-900

Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS (1982) Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2870-2873

Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS (1984) Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: A unifying concept. *Adv Cycl Nucl Res* 17: 267-274

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

Ives HE, Casnellie JE, Greengard P, Jamieson JD (1980) Subcellular localisation of cyclic GMP-dependent protein kinase and its substrates in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 255: 3777-3785

Jakob G, Mair J, Pichler M, Puschendorf B (1995) Ergometric testing and sensitivity of cGMP in diagnosing asymptomatic left ventricular dysfunction. *B Heart J* 73: 145-150

Kambayashi Y, Nakao K, Mukoyama M, Saito Y, Ogawa Y, Shiono S, Inouye K, Yoshida N, Imura H (1990) Isolation and sequence determination of human brain natriuretic peptide in human atrium. *FEBS Lett* 259: 341-345

Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri J, Kuno T, Chang MS, Waldmann SA, Murad F (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* 256: 19-22

Katsuki S, Murad F (1977) Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 13: 330

Kimura H, Mittal CK, Murad F (1975) Activation of guanylate cyclase from rat liver and other tissues by sodium azide. *J Biol Chem* 250: 8016-8022

Kimura H, Mittal CK, Murad F (1975) Increases in cyclic GMP levels in brain and liver with sodium azide as activator of guanylate cyclase. *Nature* 257: 700-702

Kimura H, Murad F (1974) Nonenzymatic formation of guanosine 3':5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 249: 329-331

Kimura H, Murad F (1975) Subcellular localisation of guanylate cyclase. *Life Sci* 17: 837-844

Klatt P, Schmidt K, Mayer B (1992) Brain nitric oxide synthase is a hemoprotein. *Biochem J* 288: 15-17

Koch K-W, Stryer L (1988) Highly cooperative feedback control of retinal rod cyclase by calcium ions. *Nature* 334: 64-66

Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch KD, 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, Schultz G, Böhme E (1991) Sequence homologies between guanylyl cyclases and structural analogies to other signal transducing proteins. *FEBS Lett* 280: 301-306

Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhof A, Frank R, Schultz G, Böhme E (1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. *FEBS Lett* 266: 128-132

Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252: 120-123

Lincoln TM, Cornwell TL (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 7: 328-338

Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, Goeddel DV (1989) Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J* 8: 1377-1384

Marletta MA, Yonn RS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS (1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706-8711

Mayer B, Schrammel A, Klatt P, Koesling D, Schmidt K (1995) Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 270: 17355-17360

Mayer B, John M, Böhme E (1990) Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 277: 215-219

Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ (1981) Evidence of the inhibitory role of cGMP in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57: 946-955

Michel JB, Mercadier JJ, Galen FX, Urbain R, Dussaule JC, Phillippe M, Corvol P (1990) Urinary cGMP as an indicator of experimental congestive heart failure in rats. *Cardiovasc Res* 24: 946-952

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142

Muenzel T, Kurz S, Heitzer T, Harrison DG (1996) New insights into mechanisms underlying nitrate tolerance. *Am J Cardiol* 77: 24C-30C

Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jougasaki M, Imura H (1990) Increased brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med* 323: 757-758

Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jourasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H (1991) Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *J Clin Invest* 87: 1402-1412

Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273

Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H (1978) Guanylate cyclase: Activation by nitrite, nitrocompounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Nucleotide Res* 9: 145-158

Murrell W (1879) Nitroglycerin as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1: 80-81

Myers PR, Minor RL, Guerra R, Bates JN, Harrison DG (1990) Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161-163

Nakamura T, Gold GH (1987) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325: 442-444

Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F (1988) Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Com* 159: 1139-1147

Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylyl cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 265: 16841-16845

Nakatani K, Yau KW (1985) Cyclic GMP opens the light-sensitive conductance in retinal rods. *Biophys J* 47: 365a

Niroomand F, Rössle A, Mülsch A, Böhme E (1989) Under aerobic conditions, soluble guanylate cyclase is specifically stimulated by glutathione. *Biochem Biophys Res Commun* 16: 75-80

Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Shirakami G, Itoh H, Hosoda K, Saito Y, Arai H, Suga S, Jougasaki M, Yamada T, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H (1990) Rat brain natriuretic peptide: tissue distribution and molecular form. *Endocrinology* 126: 2225-2227

Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Jougasaki M, Imura H (1991) Natriuretic peptide as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 69: 491-500

Ornstein L (1964) Disc electrophoresis. I: Background and theory. *Ann NY Acad Sci* 121: 321-349

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327: 525-526

Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1251- 1256

Pandey KN, Singh S (1990) Molecular cloning and expression of murine guanylate cyclase/atrial natriuretic factor receptor cDNA. *J Biol Chem* 265: 12342-12348

Papapetropoulos A, Cziraki A, Rubin JW, Stone CD, Catravas JD (1996) cGMP accumulation and gene expression of soluble Guanylate Cyclase in human vascular tissue. *J Cell Physiol* 167: 213-221

Rapoport RM, Drazin MB, Murad F (1982) Sodium nitroprusside-induced protein phosphorylation in intact rat aorta is mimicked by 8-bromo cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sc USA* 79: 6470-6474

Rapoport RM, Drazin MB, Murad F (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP dependent protein phosphorylation. *Nature* 306: 174-176

Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HHHW (1999) Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 85: 534-541

Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D (1998) Functional properties of a natural occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* 335: 125-130

Ruth P, Wang GX, Boekhoff I, May B, Pfeifer A, Penner R, Korth M, Breer H, Hofmann F (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-triphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2623-2627

Sadoff JD, Scholz PM, Tse J, Weiss HR (1996) Increased guanylate cyclase activity is associated with an increase in cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate in left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 3: 838-845

Sandberg M, Natarajan V, Ronander I, Kalderon D, Walter U, Lohmann SM, Jahnsen T (1989) Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type 1 β isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. *FEBS Lett* 255: 321-329

Sarcovic B, Brookes V, Martin TJ, Kemp BE, Robinson PJ (1989) Atrial natriuretic peptide-dependent phosphorylation of smooth muscle cell particulate fraction proteins is mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264: 20648-20654

Schmidt H, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher K-E, Klein M, Niroomand F, Böhme E (1988) Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 154: 213-216

Scholz H, Schwabe U (2000) Taschenbuch der Arzneibehandlung, Angewandte Pharmakologie. Gustav Fischer Verlag, 12. neubearbeitete Auflage, S 119-120, 125-128, 659-660, 636-637

Schuler GD, Boguski MS, Steward EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tom P, Aggarwal A, Bajorek E, Bentolila S, Birren BB, Butler A, Castle AB, Chiannikulchai N, Chu A, Clee C, Cowles S, Day PJR, Dibling T, East C, Drouot N, Dunham I, Duprat S, Edwards C, Fan JB, Fang N, Fizames C, Garrett C, Green L, Hadley D, Harris M, Harrison P, Brady S, Hicks A, Holloway E, Hui L, Hussain S, Louis-Dit-Sully C, Ma J, MacGilvery A, Mader C, Maratukulam A, Matisse TC, McKusick KB, Morissette J, Mungall A, Muselet D, Nusbaum DC, Page DC, Peck A, Perkins S, Piercy M, Qin F, Quackenbush J, Ranby S, Reif T, Rozen S, Sanders C, She X, Silva J, Slonim DK, Soderlund C, Sun WL, Tabat P, Thangarajah T, Vege-Czarny N, Vollrath D, Voyticky S, Wilmer T, Wu X, Adams MD, Auffray C, Walter NAR, Brandon R, Dehejia A, Goodfellow PN, Houlgatte R, Hudson JR, Ide SE, Iorio KR, Lee WY, Seki N, Nagase T, Ishikawa K, Nomura N, Phillips C,

Polymeropoulos MH, Sandusky M, Schmitt K, Berry R, Swanson K, Torres R, Venter JC, Sikela JM, Beckmann JS, Weissenbach J, Myers RM, Cox DR, James MR, Bentley D, Deloukas P, Lander ES, Hudson TJ (1996) A gene map of the human genome. *Science* 274: 540-546

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

Schulz S, Green CK, Yuen PST, Garbers DL (1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63: 941-948

Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, Garbers DL (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58: 1155-1162

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

Shah S, Hyde DR (1995) Two *Drosophila* genes that encode the α and β subunits of the brain soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 270: 15368-15376

Singh S, Lowe DG, Thorpe DS, Rodriguez H, Kuang WJ, Dangott LJ, Chinkers M, Goeddel DV, Garbers DL (1988) Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature* 334: 708-712

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo JL (1992) S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterisation of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 444-448

Stanton BA, Karlson K (1992) Molecular cloning of cGMP-gated renal cation channel cDNA. *FASEB J* 6: A1808

Stone JR, Marletta MA (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

Stryer L, Hurley JB, Fung BKK (1981) First stage of amplification in the cyclic nucleotide cascade of vision. *Curr Top Membr Transp* 15: 93-108

Takai Y, Kaibuchi U, Nishizuka Y (1982) Counteraction of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase activation by cAMP and cGMP in platelets. *J Biochem* 91: 403-406

Takio K, Wade RD, Smith SB, Krebs EG, Wash KD, Titani K (1984) Guanosine cyclic 3':5'-phosphate-dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry* 23: 4207-4218

Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with $G_s\alpha$ -GTP γ S. *Science* 278: 1907-1916

Thorpe DS, Garbers DL (1989) The membrane form of guanylate cyclase: homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. *J Biol Chem* 264: 6545-6549

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

Tsai SC, Adamik R, Mangianello VC, Vaughan M (1981) Reversible inactivation of soluble liver guanylate cyclase by disulfides. *Res Commun* 100: 637-643

Ujiie K, Drewett JG, Yuen PST, Star RA (1993) Differential expression of mRNA for guanylyl cyclase-linked EDRF receptor subunits in rat kidney. *J Clin Invest* 91: 730-734

Utz J, Ullrich V (1991) Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 41: 1195-1201

Waldmann SA, Rapoport RM, Murad F (1984) Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cGMP in rat tissues. *J Biol Chem* 259: 14332-14334

Waldmann SA, Murad F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39: 163-196

Walter U (1981) Distribution of cyclic GMP-dependent protein kinase in various rat tissues and cell lines determined by a sensitive and specific radioimmunoassay. *Eur J Biochem* 118: 339-346

Wedel BJ, Garbers DL (1997) New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. *FEBS Lett* 410: 29-33

Wedel BJ, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G, Koesling D (1995) Functional domains of soluble guanylyl-cyclase. *J Biol Chem* 270: 24871-24875

Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989) The cDNAs of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 251: 191-196

Whalin ME, Scammell JG, Strada SJ, Thompson WJ (1991) Phosphodiesterase II, the cGMP-activable cyclic nucleotide phosphodiesterase, regulates cyclic AMP metabolism in PC12 cells. *Mol Pharmacol* 39: 711-717

White AA, Auerbach GD (1969) Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochem Biophys Acta* 191: 686-697

Winqvist RJ, Faison EP, Waldman SA, Schwartz K, Murad F, Rapoport RM (1984) Atrial natriuretic factor elicits an endothelium independent relaxation and activates particulate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11993-11997

Wu XB, Brune B, von Appen F, Ullrich V (1992) Reversible activation of soluble guanylate cyclase by oxidizing agents. *Arch Biochem Biophys* 294: 75-82

Yamaguchi M, Rutledge LJ, Garbers DL (1991) The primary structure of the rat guanylyl cyclase A/atrial natriuretic peptide receptor gene. *J Biol Chem* 266: 20414-20420

Yoshida Y, Sun HT, Cai JQ, Imai S (1991) Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca^{2+} pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240 kDa protein. *J Biol Chem* 266: 19819-19825

Yu F, Warburton D, Wellington S, Danziger RS (1996) Assignment of GUCIA2, the gene coding for the α_2 subunit of soluble guanylyl cyclase to position 11q21-q22 on human chromosome 11. *Genomics* 33: 334-336

Yuen PST, Potter LR, Garbers DL (1990) A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 29: 10872-10878

Zhang G, Liu Y, Ruoho AE, Hurley JH (1997) Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* 386: 247-253

LEBENS LAUF

geboren am 3.07.1974 in Hamburg

1980-1984	Grundschule Harkshörn, Norderstedt
1984-1991	Gymnasium Harksheide, Norderstedt
1991-1993	Gymnasium Alstertal, Hamburg
10/1993-4/2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Sep. 1995	Ärztliche Vorprüfung
Sep. 1996	Erstes medizinisches Staatsexamen
April 1999	Zweites medizinisches Staatsexamen
April 2000	Drittes medizinisches Staatsexamen
11/1996	Beginn der Experimente für die Doktorarbeit im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. Scholz und Dr. S. Behrends

Hamburg, 16. Juni 2000

Erklärung

Ich erkläre, daß ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Expression NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase am Herz-Kreislaufsystem

im Institut für experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. med Hasso Scholz) mit der Unterstützung von Herrn Dr. Sönke Behrends ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher in keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den

Bettina Knauf

Danksagung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von November 1996 bis Dezember 1997 am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt. Herrn Professor Scholz als Direktor dieses Instituts danke ich zunächst dafür, daß er diese Arbeit ermöglicht und mich in der zügigen Anfertigung stets unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sönke Behrends, der mich von Anfang an mit viel Diskussionsbereitschaft, Motivation und freundschaftlicher Unterstützung begleitet hat.