

UNTERSUCHUNGEN ZU ISOFORMEN DER
STICKSTOFFMONOXID-SENSITIVEN GUANYLYL-CYCLASE
BEIM MENSCHEN UND BEI DER RATTE (RATTUS NORVEGICUS, BERK.)

Als Dissertationsschrift zur Erlangung des Doktorgrades (doctor rerum naturalium)
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg vorgelegt von

Dipl. Biol. Markus Koglin
aus Essen

Hamburg 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Scholz; PD Dr. med. S. Behrends
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. W. Becker

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet.

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
BAY 41-2272	5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine
Bluo-gal	5-Bromo-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
bp	DNA-Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNP	natriuretisches Peptid Typ C
CO	Kohlenmonoxid
DEA/NO	1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EC ₅₀	halbmaximale Effektorkonzentration
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor (<i>endothelium derived relaxing factor</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EtOH	Ethanol
FPLC	Flüssigkeitschromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEK	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
KLH	Protein der Napfschnecke (<i>keyhole limpet hemocyanin</i>)
K _m	Michealis-Menten-Konstante

LB	Luria Bertoni
MOI	Infektionshäufigkeit (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
nNOS	neuronal NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-on
³² P	Phosphor 32
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PPIX	Protoporphyrin IX
RACE	schnelle Amplifikation von cDNA-Enden (<i>rapid amplification of cDNA-ends</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
S.E.M.	mittlerer Fehler des Mittelwertes (<i>standard error of means</i>)
Sf	Spodoptera frugiperda
TBE	Tris-gepufferte Lösung mit EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung (<i>Tris-buffered-saline-tween</i>)
TCID ₅₀	Viruskonzentration, die 50 % der Zellkultur infiziert
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Enzymeinheit)
V _{max}	maximale katalytische Rate eines Enzyms
YC-1	3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl]-1-benzylindazol

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Familie der Nukleotid-Cyclasen	1
1.2. NO-Synthasen	3
1.3. Lösliche Guanylyl-Cyclasen	3
1.3.1. Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclasen	3
1.3.2. Aufbau der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclasen	5
1.3.3. Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclasen	6
1.3.4. Modulatoren der löslichen Guanylyl-Cyclasen	8
1.4. cGMP-Effektorsysteme	9
1.5. Therapeutische Anwendung von Aktivatoren und Inhibitoren der löslichen Guanylyl-Cyclasen	10
1.6. Zielsetzung	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Materialien	13
2.1.1. Fein- und Biochemikalien	13
2.1.2. Substanzen und Hilfsmittel	14
2.1.3. Enzyme	15
2.1.3.1. Diverse Enzyme	15
2.1.3.2. Restriktionsendonukleasen	15
2.1.4. DNA und Vektoren	15
2.1.5. Reagenziensysteme	15
2.1.6. Lösungen und Puffer	16
2.1.7. Stammlösungen	16
2.1.8. Gele	16
2.1.9. Geräte	16
2.2. Methoden	17
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1.1. Klonierung von DNA in Plasmidvektoren mittels Restriktionsendonucleasen	17
2.2.1.2. Transformation von DNA in E.coli	19
2.2.1.3. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA	19
2.2.1.4. Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA	19
2.2.1.5. Analyse der präparierten Plasmid-DNA	20
2.2.1.6. Nukleotidaustausch in Zielsequenzen mittels PCR	20

2.2.2. Proteinbiosynthese in Sf9-Zellen	21
2.2.2.1. Klonierung von Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten und Mutanten in den Transfervektor pFASTBAC	21
2.2.2.1.1. Klonierung der α_2 -Untereinheit der Ratte	21
2.2.2.1.2. Klonierung in den Transfervektor pFASTBAC	22
2.2.2.2. Transposition	24
2.2.2.3. Kultivierung der Sf9-Zellen	25
2.2.2.4. Transfektion der Sf9-Zellen	25
2.2.2.5. Amplifikation der isolierten Viren	26
2.2.2.6. Titerbestimmung der Viruslösungen	26
2.2.2.7. Infektion von Sf9-Zellen zur Herstellung von rekombinatem Protein	26
2.2.2.8. Gewinnung des cytosolischen und membranären Proteins aus Sf9-Zellen	27
2.2.3. Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität	27
2.2.4. Nachweis der Proteinexpression mittels Immunoblots	28
2.2.4.1. Quantitativer Proteinnachweis	28
2.2.4.2. Herstellung spezifischer Antiseren	29
2.2.4.3. Western-Blot-Analyse	29
2.2.5. Anreinigung rekombinanter Proteine aus Sf9-Zellen mittels FPLC	30
2.2.5.1. Herstellung der cytosolischen Fraktion	30
2.2.5.2. Anreinigungsstufen	30
2.2.5.2.1. Anionenaustausch-Chromatographie mittels Q-Sepharose	30
2.2.5.2.2. Adsorptionschromatographie mittels Hydroxyapatit	31
2.2.5.2.3. Gelfiltrationschromatographie mittels Superdex	31
2.2.5.2.4. Centricon-Verfahren	32
2.2.5.3. Untersuchung des angereinigten Proteins	32
2.2.6. Statistische Auswertung	32
3. ERGEBNISSE	33
3.1. Charakterisierung der β_2 -Untereinheit der Ratte	33
3.1.1. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 -Untereinheit der Ratte	33
3.1.2. Enzymaktivitätsuntersuchungen an der neuen β_2 -Variante der Ratte	35
3.1.2.1. Untersuchungen an β_2	35
3.1.2.2. Untersuchungen an β_2 E596A	37
3.1.2.3. Substratabhängigkeit der beiden β_2 -Varianten	37
3.1.2.4. Einfluss von Aktivatoren und Inhibitoren der löslichen Guanylyl- Cyclase auf die β_2 -Enzymaktivität	39
3.1.2.4.1. Konzentrationsabhängige Aktivierung durch DEA/NO	39
3.1.2.4.2. Konzentrationsabhängige Inhibition durch ODQ	40
3.1.2.4.3. Einfluss von Tween 20 und Protoporphyrin IX	41
3.1.2.5. Untersuchungen verschiedener β_2 -Mutanten	43

3.2. Charakterisierung der α_2 -Untereinheit der Ratte	45
3.2.1. Klonierung und Sequenzanalyse der α_2 -Untereinheit der Ratte	45
3.2.2. Untersuchungen der α_2 -Untereinheit und aminoterminaler Deletionsmutanten der α_2 -Untereinheit	45
3.2.2.1. Expression der α_2 -Varianten im Baculovirus/Sf9-System	45
3.2.2.2. Messung der Enzymaktivität der α_2 -Varianten	48
3.2.3. Substratabhängigkeit der α_2 -Varianten	49
3.2.4. Konzentrationsabhängiger Einfluss von DEA/NO	50
3.2.5. Einfluss von YC-1 auf $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$	51
3.2.6. Einfluss von BAY 41-2272 auf die α_2 -Untereinheit und aminoterminaler Deletionsmutanten der α_2 -Untereinheit	52
3.2.6.1. Einfluss von BAY 41-2272 auf α_2/β_1	52
3.2.6.2. Einfluss von BAY 41-2272 auf $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$	53
3.3. Untersuchungen an der α_1 -Untereinheit und aminoterminaler Deletionsmutanten der α_1 -Untereinheit	55
3.3.1. Expression der α_1 -Varianten im Baculovirus/Sf9-System	55
3.3.2. Messung der Enzymaktivität der α_1 -Varianten	56
3.3.3. Substratabhängigkeit der α_1 -Varianten	58
3.3.4. Konzentrationsabhängiger Einfluss von DEA/NO	59
3.3.5. Einfluss von YC-1 auf die α_1/β_1 -Varianten	60
3.3.6. Einfluss von BAY 41-2272 auf die α_1/β_1 -Varianten	61
3.3.7. Untersuchungen an angereinigten α_1/β_1 - und $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ -Enzymkomplexen	62
4. DISKUSSION	64
4.1. Charakterisierung eines Enzymkomplexes aus der neu klonierten β_2 -Untereinheit der Ratte	65
4.2. Bedeutung des Carboxyterminus der β_2 -Untereinheit der Ratte	72
4.3. Charakterisierung der α_2 -Untereinheit der Ratte	74
4.4. Bedeutung des Aminoterminus der α_1 -Untereinheit	77
5. ZUSAMMENFASSUNG	79
6. LITERATURVERZEICHNIS	80
7. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	92

1. Einleitung

Die Entdeckung des NO/cGMP-Signalweges begann 1963, als kurze Zeit nach dem Nachweis von cAMP als intrazellulärem Botenstoff (Sutherland und Rall 1957) auch das verwandte Molekül cGMP erstmals im Urin und später in vielen Geweben identifiziert werden konnte (Ashman et al. 1963, Goldberg et al. 1973). Die cGMP-bildenden Enzyme, die Guanylyl-Cyclasen, wurden daraufhin in mehreren Zellpräparationen gefunden (Hardman und Sutherland 1969). Eine membranständige und eine lösliche Form, die sich in ihren kinetischen und physikalischen Eigenschaften unterschieden, konnten identifiziert werden (Chrisman et al. 1975, Kimura und Murad 1975). 1977 konnte gezeigt werden, dass die lösliche Guanylyl-Cyclase durch Glyceroltrinitrat und andere NO-freisetzende Substanzen aktiviert wird (Katsuki et al. 1977, Miki et al. 1977, Arnold et al. 1977, Schultz und Schultz 1977). Diese Enzymaktivierung durch NO wurde als ein nicht-physiologisches Phänomen aufgefaßt, da zu diesem Zeitpunkt NO in biologischen Systemen unbekannt war. 1980 zeigten Furchgott und Mitarbeiter die Existenz einer vom Endothel produzierten Substanz, die erforderlich war, um die Relaxation von Blutgefäßen zu vermitteln (Furchgott und Zawadzki 1980). Sie bezeichneten diese Substanz als "endothelium derived relaxing factor" (EDRF). 1986 schlugen Ignarro und Moncada unabhängig voneinander vor, dass EDRF mit NO identisch ist (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987, Moncada et al. 1988). Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass ein lösliches Enzym in Makrophagen NO aus der Aminosäure L-Arginin bildete. Es wurde später gereinigt und als NO-Synthase bezeichnet (Hibbs et al. 1988, Marletta 1988, Hevel et al. 1991). Damit waren die beiden wesentlichen Komponenten des NO/cGMP-Signalweges identifiziert: NO-produzierende NO-Synthasen und die cGMP-bildende lösliche Guanylyl-Cyclase.

1.1. Familie der Nukleotid-Cyclasen

Die lösliche Guanylyl-Cyclase bildet gemeinsam mit der membranständigen Guanylyl-Cyclase und der Adenylyl-Cyclase die Superfamilie der Nukleotid-Cyclasen (Hurley 1998). Gemeinsam ist den drei Enzymfamilien das evolutionär konservierte katalytische Zentrum, das von zwei Polypeptidabschnitten aufgebaut wird (Abb. 1). Dieses katalytische Zentrum wird bei der Familie der Adenylyl-Cyclasen von zwei einander homologen cytosolischen Schleifen einer Polypeptidkette gebildet. Demgegenüber liegen die entsprechenden beiden katalytischen Abschnitte der Guanylyl-Cyclase auf verschiedenen Polypeptidketten. Im Falle der homodimeren membranständigen Guanylyl-Cyclasen sind diese identisch, im Falle der heterodimeren löslichen Guanylyl-Cyclase sind diese unterschiedlich, aber homolog (Abb. 1). Die Adenylyl-Cyclasen sind Effektoren von G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Neun verschiedene, funktionell unterschiedliche Isoformen des Enzyms sind beschrieben (Hurley 1998). Durch die Untersuchung der Adenylyl-Cyclase konnte die Struktur des katalytischen Zentrums der Nukleotid-Cyclasen aufgeklärt werden (Zhang et al. 1997, Tesmer et al. 1997). Diese Strukturaufklärung erlaubt auch Voraussagen zur räumlichen Anordnung der

Polypeptidketten innerhalb des katalytischen Zentrums der Guanylyl-Cyclasen (Liu et al. 1997). Die membranständigen Guanylyl-Cyclasen gehören zur Gruppe der rezeptorgekoppelten Enzyme. Bisher konnten beim Menschen sieben Isoformen, A-G, kloniert werden (Wedel und Garbers 2001). Sie liegen im Gegensatz zu den löslichen Guanylyl-Cyclasen physiologisch als Homodimer oder Homooligomer vor (Wilson und Chinkers 1995). Als gemeinsames Merkmal besitzen sie eine einzelne, membrandurchspannende α -Helix, die die aminoterminal, extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne von dem, im Intrazellularräum gelegenen carboxyterminalen Abschnitt trennt (Drewett und Garbers 1994). Dieser Abschnitt wird in eine Proteinkinase-ähnliche Domäne und eine weiter carboxyterminal gelegene katalytische Domäne unterteilt.

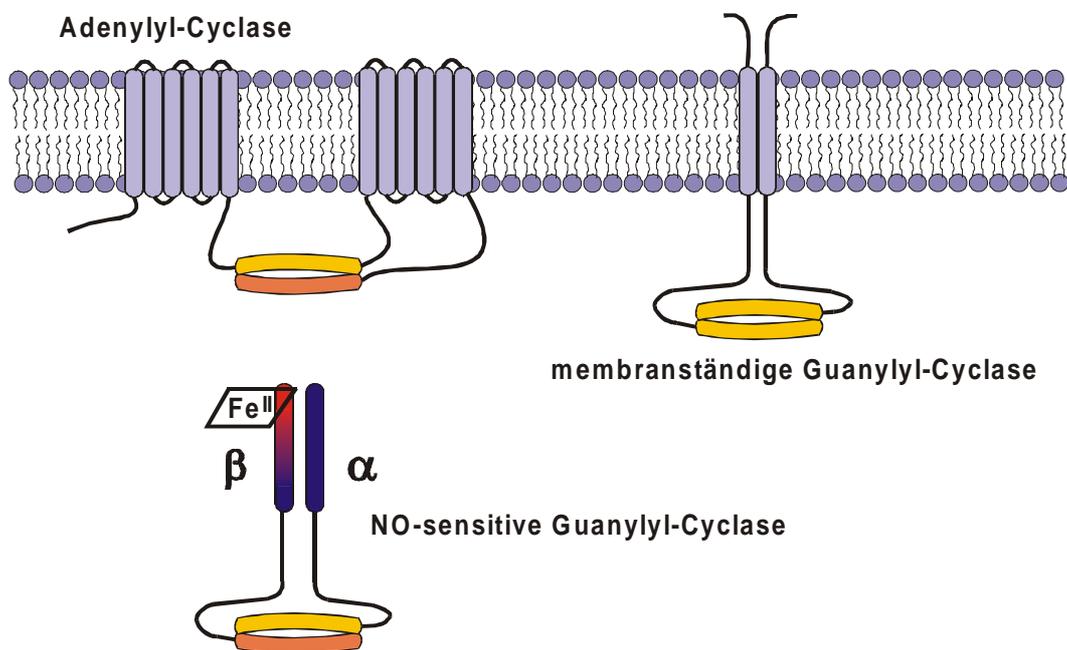


Abbildung 1: Schematische Abbildung der Nucleotid-Cyclase-Superfamilie: Adenylyl-Cyclase, membranständige und lösliche Guanylyl-Cyclase. Transmembrandomänen sind violett dargestellt. Die Bereiche der, bei den Nucleotid-Cyclasen konservierten katalytischen Regionen sind gelb und orange dargestellt. Aminoterminal Domänen der löslichen Guanylyl-Cyclase sind für die α -Untereinheit blau und für die β -Untereinheit blau/rot dargestellt (Abbildung modifiziert nach Denninger und Marletta 1999).

Die Aktivierung der membranständigen Guanylyl-Cyclasen erfolgt über die Bindung von Peptidhormonen an die extrazelluläre Rezeptor-Bindungsdomäne (Drewett und Garbers 1994). Bisher konnten vier Peptidhormone der membranständigen Guanylyl-Cyclasen identifiziert werden (Drewett und Garbers 1994, Wedel und Garbers 2001). Das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das diesem verwandte natriuretische Peptid Typ B (BNP) aktivieren in physiologischen Konzentrationen die Guanylyl-Cyclase A, die über vielfältige Mechanismen eine Rolle bei der Regulation des systemischen Blutdruckes spielt (Drewett und Garbers 1994). Das natriuretische Peptid Typ C (CNP) gilt als physiologischer Aktivator der Guanylyl-Cyclase B (Drewett und Garbers 1994). Es hat wie

ANP und BNP Effekte auf den systemischen Blutdruck, ist aber auch an der Proliferation von Zellen und der Differenzierung von verschiedenen Geweben beteiligt (Yasoda et al. 1998, Lee 2000). Die Guanylyl-Cyclase C stellt den Rezeptor für das Peptid Guanylin dar. Sie wird vor allem im Intestinaltrakt exprimiert und spielt dort eine Rolle bei der Wasser- und Chloridionenexkretion in das Darmlumen (Drewett und Garbers 1994). Für die weiteren Isoformen der membranständigen Guanylyl-Cyclasen konnten bisher keine aktivierenden Peptidhormone identifiziert werden (Wedel und Garbers 2001). Die membranständigen Guanylyl-Cyclasen unterscheiden sich im Aktivierungsmechanismus von den löslichen Guanylyl-Cyclasen, weisen aber einen ähnlichen Aufbau des homologen katalytischen Bereiches auf (Denninger und Marletta 1999).

1.2. NO-Synthasen

NO wird im Körper durch die NO-Synthasen (NOS) gebildet. Diese katalysieren die Reaktion der Aminosäure L-Arginin mit molekularem Sauerstoff zu NO und L-Citrullin. Drei Isoformen sind bekannt (Andrew und Mayer 1999). Von diesen werden zwei konstitutiv im Endothel (eNOS) und in Neuronen (nNOS) exprimiert. Sie werden vornehmlich durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit einer daraus resultierenden Bindung eines Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes aktiviert (Cho et al. 1992, Kone 2000). Die dritte Isoform (iNOS) liegt nicht konstitutiv vor. Ihre Expression wird besonders in Zellen des Immunsystems durch bakterielle Endotoxine oder inflammatorische Zytokine induziert (Hecker et al. 1999). Sie liegt an Calmodulin gebunden vor und bildet unabhängig vom intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel große Mengen an NO (Cho et al. 1992). Dieses freigesetzte NO wirkt im Rahmen einer Immunantwort cGMP-unabhängig über eine Nitrosylierung von Proteinen und oxidativen Stress cytotoxisch (Brüne et al. 1996, Liaudet et al. 2000).

1.3. Lösliche Guanylyl-Cyclasen

1.3.1. Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclasen

Bei der Adenylyl-Cyclase und der membranständigen Guanylyl-Cyclase wird eine Isoform durch ein Gen definiert. Diese einfache Beziehung gilt nicht für die lösliche Guanylyl-Cyclase, da sie aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut wird, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Die Klonierung von Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase gelang nach Reinigung des Enzyms aus Rinderlunge (Koesling et al. 1988, Koesling et al. 1990) bzw. Rattenlunge (Nakane et al. 1988, Nakane et al. 1990). Durch Koexpression der klonierten cDNAs der Untereinheiten des Rinder- bzw. Rattenlungenenzym (α_1 und β_1) wurde in vitro NO-stimulierbare Enzymaktivität erhalten (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991). Zwei weitere cDNAs für potentielle Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten wurden durch molekularbiologische Techniken identifiziert. Mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide in der Polymerasekettenreaktion und durch das Durchsuchen von Gendatenbanken konnte eine cDNA aus humanem fetalen Hirngewebe kloniert werden, die die größte

Homologie mit der α_1 -Untereinheit aufwies und deshalb mit α_2 bezeichnet wurde (Harteneck et al. 1991). Eine weitere Untereinheit konnte aus Nierengewebe der Ratte kloniert werden und wurde wegen der größeren Ähnlichkeit zur β_1 -Untereinheit mit β_2 bezeichnet (Yuen et al. 1990). Koexpressionsexperimente der beiden neuen cDNAs ergaben NO-stimulierbare Enzymaktivität für die Kombination α_2/β_1 (Harteneck et al. 1991). Der potentielle Dimerisierungspartner der β_2 -Untereinheit ist noch nicht identifiziert worden (Abb. 2). Sowohl die α_1 -Untereinheit (Ujii et al. 1993) als auch die α_2 -Untereinheit (Pilz et al. 1994) wurden als mögliche Dimerisierungspartner vorgeschlagen. Für die lösliche Guanylyl-Cyclase als Heterodimer einer α - und einer β -Untereinheit ergeben sich grundsätzlich vier verschiedene denkbare heterodimere Isoformen, nämlich α_1/β_1 , α_2/β_1 , α_1/β_2 bzw. α_2/β_2 . Koexpression der cDNA der β_2 -Untereinheit mit allen bekannten cDNAs der anderen Untereinheiten führte allerdings nicht zu messbarer Enzymaktivität. Ergebnisse, nach denen die Koexpression der α_1 - mit der β_2 -Untereinheit in vitro zu katalytischer Aktivität führt, sind stark umstritten (Yuen et al. 1990, Gupta et al. 1997, Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). Aus den Koexpressionsexperimenten lässt sich neben der Existenz der α_1/β_1 -Isoform die wahrscheinliche Bildung eines heterodimeren α_2/β_1 -Enzymkomplexes in vivo ableiten (Abb. 2). Tatsächlich konnte die heterodimere α_2/β_1 -Enzymisoform durch Immunpräzipitation und Immunoblot an Cytosol aus menschlicher Placenta nachgewiesen werden (Russwurm et al. 1998). Ein Vergleich der heterodimeren α_2/β_1 -Enzymisoform mit der klassischen α_1/β_1 -Isoform im Baculovirus/Sf9-Expressionssystem zeigte weitgehende Übereinstimmung in den pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften und identische Absorptionseigenschaften der prosthetischen Hämgruppe (Russwurm et al. 1998).

Kürzlich konnte eine sogenannte β_3 -Untereinheit bei dem Insekt *Manduca sexta* identifiziert werden (Nighorn et al. 1999). Für diese Untereinheit konnte in Abwesenheit einer weiteren Untereinheit enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Ein Aminosäurevergleich zwischen der β_2 -Untereinheit der Ratte und der β_3 -Untereinheit aus *Manduca sexta* wies in der katalytischen Domäne eine hohe Homologie auf (56 %). Aufgrund der hohen Homologie zwischen der β_2 -Untereinheit der Ratte und der β_3 -Untereinheit aus *Manduca sexta* stellt sich die Frage, ob die β_2 -Untereinheit der Ratte möglicherweise auch einen homodimeren Enzymkomplex bildet (Abb. 2).

Der heterodimere α_1/β_1 -Enzymkomplex bildet das am weitesten im menschlichen Körper verbreitete Enzym (Budworth et al. 1999). Auch die α_2 -Untereinheit konnte beim Menschen auf mRNA-Ebene in vielen Geweben nachgewiesen werden und scheint ein ähnlich ubiquitäres Verteilungsmuster wie die α_1 -Untereinheit aufzuweisen (Behrends et al. 1995, Hobbs 2000). Im Gegensatz dazu zeigt die β_2 -Untereinheit ein sehr viel spezifischeres, und zum Teil entwicklungsabhängiges Expressionsmuster (Behrends et al. 2001). Die höchsten Expressionsspiegel finden sich im Nierengewebe von geschlechtsreifen Ratten (Yuen et al. 1990, Behrends et al. 2001). Eine weitgehend spezifische Expression in der Niere konnte auch für die humane β_2 -Untereinheit

gezeigt werden (Behrends und Vehse 2000). Darüber hinaus zeigte sich eine tumorspezifische Expression der humanen β_2 -Untereinheit in Adenokarzinomen des Magens (Behrends und Vehse 2000) und eine geringgradige Expression am menschlichen Herzen (Behrends et al. 1999).

Die Gene der Untereinheiten der klassischen heterodimeren α_1/β_1 -Isoform der löslichen Guanylyl-Cyclase lokalisieren nach Ergebnissen einer französischen Arbeitsgruppe beim Menschen auf dem Chromosom 4 in der Region q31.3-q33 (Giuli et al. 1993). Das Gen der α_2 -Untereinheit konnte auf dem humanen Chromosom 11 (q21-q22) lokalisiert werden (Yu et al. 1996). Das Gen der β_2 -Untereinheit konnte auf dem humanen Chromosom 13 in der Bande q14.3 lokalisiert werden (Behrends et al. 1999).

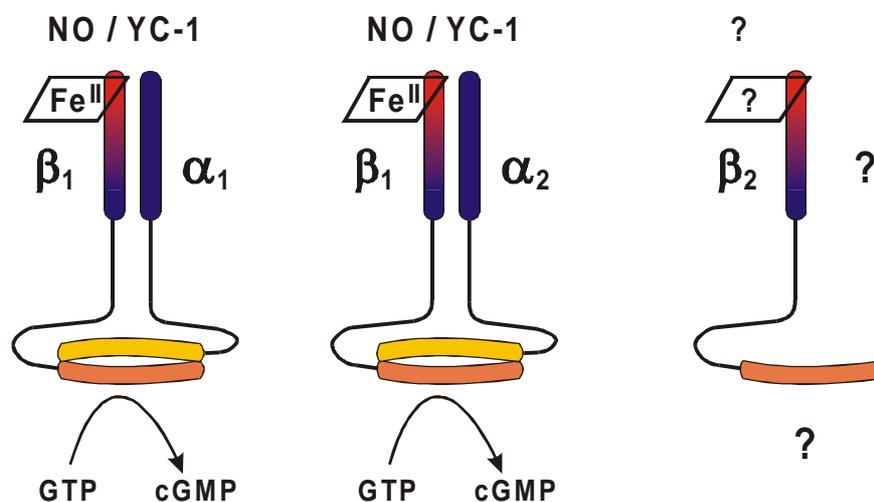


Abbildung 2 Schematische Abbildung von möglichen Guanylyl-Cyclase-Isoformen. Das natürliche Vorkommen der α_1/β_1 - und der α_2/β_1 -Isoform wurde durch Immunpräzipitationsexperimente nachgewiesen (Koesling 1999, Russwurm et al. 1998). Für beide heterodimeren Enzymkomplexe konnte NO- und YC-1-Sensitivität nachgewiesen werden. Für die β_2 -Untereinheit war unklar, in welcher Form diese am Aufbau von Guanylyl-Cyclase-Isoformen beteiligt ist und ob ein solcher Enzymkomplex NO- bzw. YC-1-sensitive Guanylyl-Cyclase-Aktivität aufweist und eine prosthetische Hämgruppe besitzt. Die katalytischen Regionen sind gelb bzw. orange dargestellt. Aminoterminalen Domänen der löslichen Guanylyl-Cyclase sind für die α -Untereinheiten blau und für die β -Untereinheiten blau/rot dargestellt (nach Denninger und Marletta 1999).

1.3.2. Aufbau der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclasen

Die vier bei Säugetieren bekannten Untereinheiten sind nach demselben Grundprinzip aufgebaut. Drei Domänen werden innerhalb der Polypeptidkette unterschieden: eine carboxyterminale, katalytische Domäne, eine Dimerisierungsdomäne und eine aminoterminalen Häm-Bindungsdomäne (Wedel et al. 1995). Wedel und Mitarbeiter konnten erstmals zeigen, dass die alleinige Expression der carboxyterminalen Bereiche der α_1 - und der β_1 -Untereinheit für basale Enzymaktivität ausreicht (Wedel et al. 1995). Dadurch konnten die katalytischen Domänen erstmals im carboxyterminalen Bereich lokalisiert werden. Die Untereinheiten weisen in diesem Bereich große Ähnlichkeit mit den membranständigen Guanylyl-Cyclasen und den katalytischen Domänen der Adenylyl-Cyclasen auf (Liu et al. 1997). Dies weist neben der ähnlichen enzymatischen Reaktion

dieser Nukleotid-Cyclasen auf ihre Entwicklung aus einem gemeinsamen evolutionären Vorgänger hin (Denninger und Marletta 1999). Die starke Homologie der katalytischen Domänen ermöglicht, Beobachtungen bei den membranständigen Guanylyl-Cyclasen und den Adenylyl-Cyclasen auf die löslichen Guanylyl-Cyclasen zu übertragen oder aber spezifische Unterschiede zwischen den Enzymen zu identifizieren (Liu et al. 1997, Hurley 1998). Wie bei den Adenylyl-Cyclasen und den membranständigen Guanylyl-Cyclasen sind bei den löslichen Guanylyl-Cyclasen mindestens zwei katalytische Domänen für enzymatische Aktivität erforderlich (Liu et al. 1997). Dabei ist bei den bekannten löslichen Guanylyl-Cyclasen im Gegensatz zu der homodimeren, membranständigen Enzymform die Bildung eines Heterodimers notwendig (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991). Die löslichen Guanylyl-Cyclasen gleichen darin den Adenylyl-Cyclasen, die zwei ähnliche, aber nicht identische katalytische Domänen auf ihrer Polypeptidkette besitzen (Hurley 1998). Der genaue Aminosäureabschnitt, der für die Dimerisierung der löslichen Guanylyl-Cyclasen verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Allerdings dimerisieren aminoterminal verkürzte Untereinheiten, so dass die potentielle Lokalisation der Dimerisierungsdomäne auf 80 Aminosäuren direkt vor der katalytischen Domäne eingeschränkt werden konnte (Wedel et al. 1995). Für die membranständigen Guanylyl-Cyclasen konnte gezeigt werden, dass ein Bereich von 43 Aminosäuren vor der katalytischen Domäne essentiell für die Dimerisierung der Untereinheiten ist (Wilson und Chinkers 1995). Aufgrund der Sequenzhomologie ist es wahrscheinlich, dass die analogen Regionen der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase die Dimerisierung vermitteln. Für die aminoternale Domäne der β_1 -Untereinheit konnte gezeigt werden, dass diese essentiell für die Bindung einer prosthetischen Hämgruppe ist (Zhao et al. 1998, Zhao und Marletta 1999). Die β_2 -Untereinheit weist als Besonderheit eine Konsensussequenz für eine potentielle posttranslationale Fettsäuremodifikation auf (CVVL). Eine Isoprenylierung der β_2 -Untereinheit konnte bisher aber nicht gezeigt werden.

1.3.3. Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclasen

Die Arbeiten zu den pharmakologischen Eigenschaften und zum Aktivierungsmechanismus des Enzyms durch NO haben sich bisher hauptsächlich auf den aus Rinderlunge isolierten, heterodimeren α_1/β_1 -Enzymkomplex konzentriert. NO stimuliert diese lösliche Guanylyl-Cyclase durch Bindung an die prosthetische Hämgruppe und führt zu einer bis zu 400-fachen Aktivierung des gereinigten Enzyms (Humbert et al. 1990, Stone und Marletta 1995). Das Absorptionsspektrum der Hämgruppe des Rinderlungenenzym weist ein Maximum bei 431 nm auf und wird als Soret-Bande bezeichnet (Gerzer et al. 1981). Dies legt ein fünffach koordiniertes Häm mit einem zweiwertigen zentralen Eisenatom und einem Histidin als axialen Liganden in der fünften Koordinationsbindung nahe (Stone und Marletta 1994, Abb. 3). Die koordinative Bindung von NO an die sechste Position des zentralen Eisenatoms führt zur Bildung eines fünfkoordinierten Nitrosyl-Häm-Komplexes (siehe Abbildung 3). Dabei zieht NO das Eisen aus der Ebene des Porphyrin-Ringes, was zur Lösung der Histidin-Eisen-Bindung führt. Das resultierende, ebenfalls fünfkoordinierte Nitrosylhäm hat ein

Absorptionsmaximum bei 398 nm. Es wird angenommen, dass die Öffnung der Histidin-Eisen-Bindung das Signal für die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase durch NO vermittelt. Protoporphyrin IX, der eisenfreie Vorläufer des Häm, stimuliert das Enzym NO-unabhängig (Ignarro et al. 1982). Da Protoporphyrin IX kein Eisen enthält, ähnelt die Struktur dem NO-Häm-Komplex, bei welchem das Eisen aus der Ebene des Porphyrinringes gezogen wird (Abb. 3). In beiden Fällen ist das axiale Histidin nicht gebunden.

Durch gerichtete Mutagenese aller konservierten Histidine konnte das Histidin 105 der β_1 -Untereinheit als axialer Ligand identifiziert werden (Wedel et al. 1994, Zhao et al. 1998). Zhao und Marletta konnten durch spektrometrische Untersuchungen zeigen, dass der aminotermine Bereich der β_1 -Untereinheit für die Bindung der Hämgruppe hinreichend ist (Zhao und Marletta 1999). Obwohl nur die β_1 -Untereinheit für die Bindung der Hämgruppe verantwortlich zu sein scheint, konnten Wedel et al. 1995 zeigen, dass auch die aminotermine Domäne der α_1 -Untereinheit bei der Übertragung des NO-Signals auf die katalytische Domäne von Bedeutung ist. Eine aminotermine Deletionsmutante der α_1 -Untereinheit zeigte zwar eine basale enzymatische Aktivität, war aber nahezu insensitiv gegenüber NO (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996).

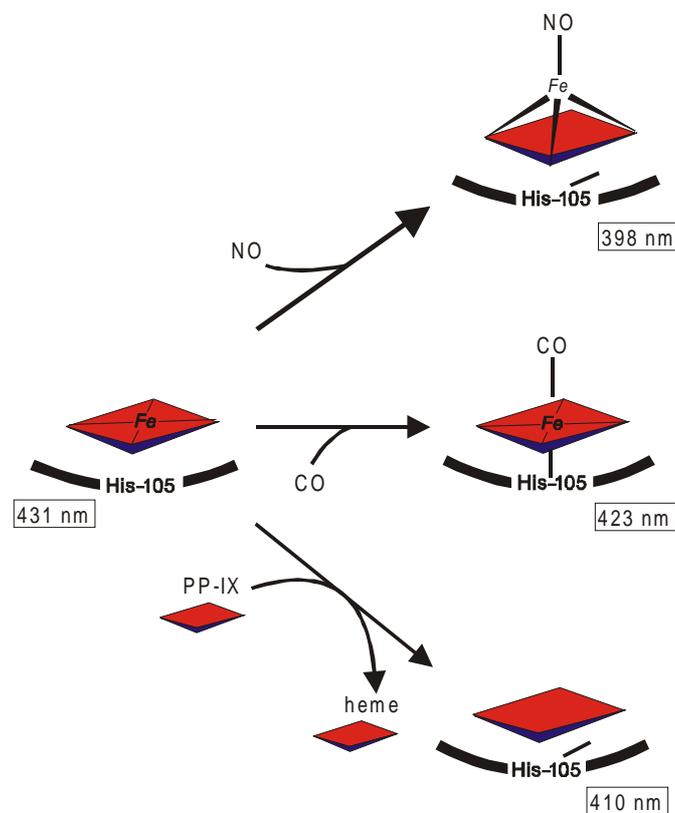


Abbildung 3: Aktivierungsmechanismus nach Ignarro (Abbildung aus Koesling 1999). Während CO als Ligand zu einem sechsfach koordinierten Häm-Eisen führt (rechts, Mitte), wird durch die Bindung von NO ein fünffach koordinierter Zustand unter Auflösung der Bindung zwischen Häm-Eisen und Histidin 105 (His105) erreicht (rechts, oben). Das eisenfreie Hämvorläufermolekül Protoporphyrin IX (PPIX) ahmt den Zustand unter der Stimulation mit NO nach (rechts, unten).

Wie NO bindet auch CO an die Hämgruppe der löslichen Guanylyl-Cyclase mit hoher Affinität (Cary und Marletta 2001). Im Gegensatz zu NO, das eine bis zu 400-fache Aktivierung des Enzyms auslösen kann, liegen die Stimulationsfaktoren für CO nur im Bereich von vier- bis sechsfach. Während die Bindung von NO einen Bruch der Bindung zwischen dem hämgebundenen Eisen und dem Histidin 105 der β_1 -Untereinheit bedingt, führt CO zur Bildung eines sechskoordinierten Häm-Komplexes (Abb. 3). Der Carbonyl-Häm-Komplex weist ein Absorptionsmaximum bei 423 nm auf. Die physiologische Bedeutung der Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase durch CO und die Rolle von CO als Signalmolekül wird intensiv untersucht und diskutiert (Cary und Marletta 2001).

1.3.4. Modulatoren der löslichen Guanylyl-Cyclasen

Zusätzlich zu den aktivierenden Substanzen NO und CO sind Modulatoren der Guanylyl-Cyclase entdeckt worden. Garthwaite und Mitarbeiter zeigten, dass das Quinoxalinderivat 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-on (ODQ) ein potenter und selektiver Inhibitor der Guanylyl-Cyclase in Hirnschnitten ist (Garthwaite et al. 1995, Abb. 4A). Im Gegensatz zu klassischen Inhibitoren wie Methylenblau zeigt diese Substanz eine hohe Spezifität und führt zu keiner Inhibition von NO-Synthasen (Garthwaite et al. 1995). Das Absorptionsspektrum der Hämgruppe der löslichen Guanylyl-Cyclase aus Rinderlunge weist in der Gegenwart von ODQ ein nach 393 nm verschobenes Maximum auf (Schrammel et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die durch ODQ vermittelte Inhibition der löslichen Guanylyl-Cyclase durch eine Oxidation des Eisenatoms der prosthetischen Hämgruppe erfolgt, so dass eine Aktivierung durch NO nicht mehr erfolgen kann (Schrammel et al. 1996, Zhao et al. 2000).

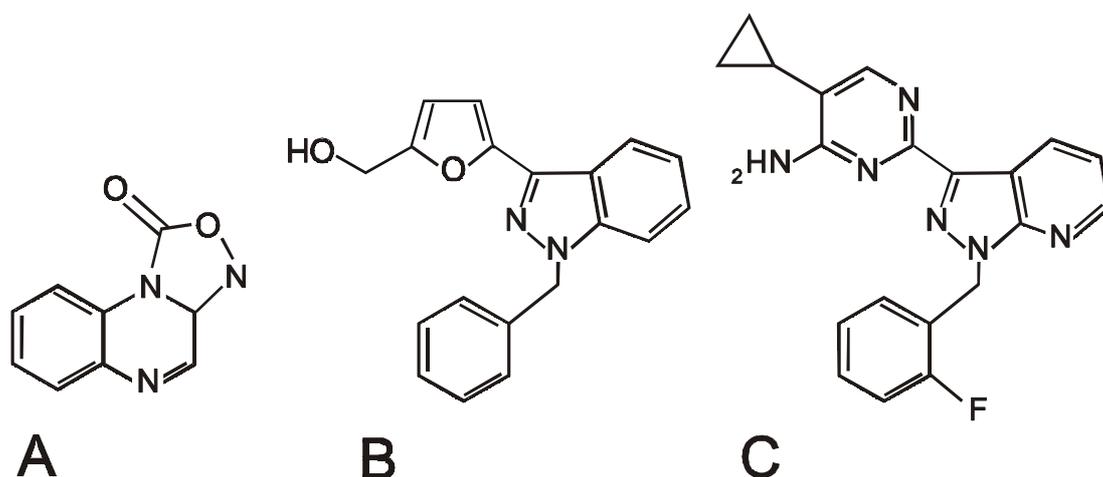


Abbildung 4: Chemische Strukturen von ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-on (A), von YC-1, 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazol (B) und von BAY 41-2272, 5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine (C). ODQ ist ein Hemmstoff der löslichen Guanylyl-Cyclase. YC-1 und BAY 41-2272 sind Aktivatoren der löslichen Guanylyl-Cyclase.

Die Substanz YC-1, ein Benzylindazol-Derivat (siehe Abbildung 4B), wurde zunächst als ein Inhibitor der Thrombozytenaggregation beschrieben, der zu einer Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration führte (Wu et al. 1995). YC-1 führt zu einer Aktivierung der gereinigten Guanylyl-Cyclase um das Zehnfache (Friebe et al. 1996, Mülsch et al. 1997). Diese Aktivierung ist unabhängig von NO, erfordert aber die Anwesenheit der prosthetischen Hämgruppe. In der Gegenwart von YC-1 ist die Konzentrationswirkungskurve von NO zu niedrigeren EC₅₀-Werten verschoben und die maximal erreichbare katalytische Rate ist um 40 % gesteigert (Friebe et al. 1996). Der ansonsten schwache Aktivator CO aktiviert bei gleichzeitiger Anwesenheit von YC-1 die Guanylyl-Cyclase in einem ähnlichen Ausmaß wie NO (Friebe et al. 1996). YC-1 verändert die Absorption der Soret Bande in der UV-VIS-Spektroskopie nicht, was gegen eine direkte Interaktion dieser Substanz mit der prosthetischen Hämgruppe des Enzyms spricht (Friebe und Koesling 1998).

Neben YC-1 wurde kürzlich ein weiterer Modulator der löslichen Guanylyl-Cyclase entwickelt (Stasch et al. 2001). BAY 41-2272, 5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine (siehe Abbildung 4C), besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu YC-1, zeigt aber eine deutlich höhere Potenz gegenüber der klassischen heterodimeren α_1/β_1 -Enzymisoform (Stasch et al. 2001). Im Gegensatz zu YC-1 wirkt BAY 41-2272 spezifischer und zeigt keinen inhibitorischen Einfluss auf Phosphodiesterasen (Stasch et al. 2001a). Mittels Photoaffinitätsmarkierung von BAY 41-2272 konnte eine mögliche Bindungsstelle von BAY 41-2272 auf der α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase wahrscheinlich gemacht werden (Stasch et al. 2001, Becker et al. 2001).

1.4. cGMP-Effektorsysteme

Der intrazelluläre Botenstoff cGMP übt seine Wirkung über verschiedene Effektorsysteme aus, von denen drei bisher genauer charakterisiert werden konnten. cGMP bindet an cGMP-abhängige Kationenkanäle. Die Änderung der Offen-Wahrscheinlichkeit dieser Kanäle durch cGMP hat Einfluss auf das Membranpotential und die Ionenkonzentration der Zelle (Yao et al. 1995, Baylor 1996). cGMP-abhängige Kationenkanäle konnten unter anderem in der Retina, im Herzen, in der Niere, der Aorta, im Hoden, im Hirn und im olfaktorischen System nachgewiesen werden (Biel et al. 1994, McCoy et al. 1995, Baylor 1996). Die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (cGK) führt zu einer Phosphorylierung bestimmter Zielproteine (Ruth 1999). Zwei Enzymisoformen, cGK I und II, konnten identifiziert werden. cGK I spielt eine Rolle bei der Vermittlung der cGMP-Wirkung im Herz-Kreislauf-System und bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation (Lohmann et al. 1997, Pfeifer et al. 1998, Massberg et al. 1999). Für cGK II konnte durch Enzym-defiziente Mäuse eine Rolle beim transepithelialen Na⁺/Cl⁻-Transport im Darm und bei der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems gezeigt werden (Lohmann 1997, Ruth 1999). Eine dritte Enzymfamilie, die durch cGMP reguliert wird, wird durch die Phosphodiesterasen (PDE) gebildet. Sie hydrolysieren die intrazellulären Botenstoffe cAMP und cGMP in die korrespondierenden 5'-Monophosphate. Die PDE werden nach ihrer Regulation und Nukleotidspezifität in zehn

Enzymgruppen eingeteilt (Fujishige et al. 1999). Von diesen werden vier (PDE2, PDE5, PDE6, PDE9) durch cGMP allosterisch reguliert und eine (PDE3) kompetitiv gehemmt (Fujishige et al. 1999).

1.5. Therapeutische Anwendung von Aktivatoren und Inhibitoren der löslichen Guanylyl-Cyclasen

Seit mehr als hundert Jahren werden NO-freisetzende Pharmaka zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit eingesetzt (Murrell 1879). NO-freisetzende Pharmaka verbessern die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur über eine Erweiterung der Koronargefäße (Torfgard und Ahlner 1994). Endogenes NO wird am Herzen im Gefäßendothel und innerhalb der Kardiomyozyten gebildet (Übersicht bei Canty 2000). Die Effekte von NO auf die Kardiomyozyten und die myokardiale Funktion sind dabei stark dosisabhängig. Im niedrigen Dosisbereich kommt es zu einer Steigerung der Kontraktilität, während höhere NO-Konzentrationen zu einer Depression der myokardialen Kontraktilität führen (Vila-Petroff et al. 1999).

Die Effekte von NO-freisetzenden Pharmaka betreffen auch andere Organsysteme. So kommt es durch intravenöse Infusion von Glyceroltrinitrat in klinisch relevanten Dosierungen zu einer Reduktion der Thrombozytenaggregation (Lam et al. 1988, Diodati et al. 1990, Karlberg et al. 1992, Johnstone et al. 1993, Lacoste et al. 1994). Thrombozyten besitzen hohe Guanylyl-Cyclase-Aktivitäten und es kommt durch NO zu einem cGMP-Anstieg und einer Hemmung der Aggregation *in vitro* (Böhme et al. 1974, Böhme et al. 1978, Buechler et al. 1994). Am Corpus cavernosum des Penis kommt es durch NO-vermittelte Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase zu einem cGMP-Anstieg und damit zu einer Muskelrelaxation und Erektion (Kerwin et al. 1995). NO-freisetzende Pharmaka sind bereits in der Therapie der erektilen Dysfunktion in Form von topisch appliziertem Glyceroltrinitrat (Owen et al. 1989) und als Injektionstherapie verwandt worden (Stief et al. 1992, Porst 1993, Truss et al. 1994). An glattmuskulären Organen wie dem Uterus kommt es über die Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges zu einer Relaxation (Lees et al. 1994). Glyceroltrinitrat induzierte Kopfschmerzen werden durch Freisetzung von NO und einer konsekutiven cGMP-abhängigen Dilatation von Gefäßen der schmerzempfindlichen Dura mater vermittelt (Thomsen und Olesen 1998). An der Niere wird eine Beteiligung des NO/cGMP-Weges an der tubuloglomerulären Rückkopplung diskutiert (Übersicht bei Kurtz und Wagner 1998). Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisierung der entsprechenden Untereinheiten bei der Ratte und Kopplungsanalysen mit dem Phänotyp des Hypertonus bei der Dahl-Ratte deuten darauf hin, dass die Untereinheiten α_1 , β_1 und β_2 an der Pathogenese des Bluthochdrucks beteiligt sind (Azam et al. 1998). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnten Gupta et al. 1997 zeigen, dass es in Nieren von Dahl-salzsensitiven Ratten im Vergleich zu Dahl-salzresistenten Ratten zu einer deutlichen Hochregulation der β_2 -mRNA und einer parallelen Abnahme der β_1 -mRNA kommt. Dies korreliert

mit Befunden, nach denen es bei Dahl-Ratten zu einem verminderten cGMP-Anstieg und damit zu einer verminderten Natriuresis nach Gabe von Nitroprussid kommt (Simchon et al. 1996).

ODQ oder seine Derivate sind von großem Interesse bei Erkrankungen wie dem septischen Schock, bei dem eine Drosselung der überschießenden, NO-vermittelten Vasodilatation therapeutisch nützlich wäre. In einem Mausmodell des septischen Schocks kommt es durch Hemmung der Guanylyl-Cyclase mit ODQ zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit (Zingarelli et al. 1999). In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass YC-1 eine effektiv antithrombotisch wirksame Substanz ist (Teng et al. 1997). Darüber hinaus wurde auch ein blutdrucksenkender Effekt von YC-1 bei normotensiven und hypertensiven Ratten nachgewiesen (Rothermund et al. 2000). An isolierten Aortenringen von Kaninchen wird die Konzentrationswirkungskurve von Glyceroltrinitrat durch YC-1 zu niedrigeren EC_{50} -Werten verschoben und die maximal erreichbare Vasodilatation erhöht (Mülsch et al. 1997). Ein kombinierter Einsatz von Glyceroltrinitrat und YC-1-Derivaten ist daher ein potentieller neuer therapeutischer Ansatz in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit. Die Stimulation der löslichen Guanylyl-Cyclase durch BAY 41-2272 resultierte in einer Inhibition der Thrombozytenaggregation in Ratten (Stasch et al. 2001). Darüber hinaus führte die Verabreichung von BAY 41-2272 zu einer deutlichen Reduktion des Blutdrucks und einer erhöhten Lebensdauer bei hypertensiven Ratten (Stasch et al. 2001).

1.6. Zielsetzung

Während über die molekularen Mechanismen der Aktivierung des heterodimeren α_1/β_1 -Enzyms der löslichen Guanylyl-Cyclase relativ viel bekannt ist, ist die Rolle der später gefundenen Untereinheiten α_2 und β_2 noch vergleichsweise unklar. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, diese beiden neueren Untereinheiten insbesondere in Bezug auf die pharmakologischen Eigenschaften gegenüber neuen Enzymmodulatoren näher zu charakterisieren. Im einzelnen lassen sich folgende Ziele abgrenzen:

1. Bildet die β_2 -Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase einen Enzymkomplex mit funktioneller Guanylyl-Cyclase-Aktivität?
2. Kommt die α_2 -Untereinheit bei mehr als einer Spezies vor?
3. Wird der α_2/β_1 -Enzymkomplex durch BAY 41-2272 aktiviert?
4. Kann die Bindungsstelle der neuen NO-unabhängigen Aktivatoren YC-1 und BAY 41-2272 innerhalb der löslichen Guanylyl-Cyclase eingegrenzt werden?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

1.1 2.1.1. Fein- und Biochemikalien

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

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$	NEN (Zaventem, Belgien)
Agarose	Biorad (München)
Aluminiumoxid	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Bluo-gal	Gibco (Karlsruhe)
cGMP	Sigma (Deisenhofen)
dNTP	Boehringer (Mannheim)
EDTA	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol (100 %)	UKE-Apotheke (Hamburg)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Gentamicin	Sigma (Deisenhofen)
GTP	Sigma (Deisenhofen)
IBMX	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat	Sigma (Deisenhofen)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
Kreatinphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Natriumacetat	Sigma (Deisenhofen)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
NaOH	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Biorad (München)
Penicillin	Gibco (Karlsruhe)

Perchlorsäure
Streptomycin
TEA/HCl
TEMED
Tetracyclin
Tris-HCl
Zinkacetat

Merck (Darmstadt)
Gibco (Karlsruhe)
Merck (Darmstadt)
Biorad (München)
Sigma (Deisenhofen)
Sigma (Deisenhofen)
Sigma (Deisenhofen)

2.1.2. Substanzen und Hilfsmittel

Aqua ad injectabilia
Bacto-Agar
BAY 41-2272
Big Dye
DEA/NO
ECL-System
Entwickler G 150
Fetales Rinderserum
Filmmaterial (X-OMAT)
Filterpapier 3MM
Fixierer G 350
Gelfiltrationssäule
Hefe-Extrakt
Hydroxyapatit-Säule
Leersäule für FPLC-System
Long Ranger Gel Solution (Acrylamid)
Nitrocellulose (Protran, 0,45 µm)
ODQ
Ponceau S
Protease-Inhibitor-Cocktail
Proteinstandard
Protoporphyrin IX
Q-Sepharose
Sf-900II SFM-Zellkulturmedium
Spritzen
Sterican[®]-Kanüle
Szintillationsgefäße

Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Becton Dickinson (Heidelberg)
Bayer (Wuppertal)
Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Sigma (Deisenhofen)
Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Agfa-Gevaert (Leverkusen)
Gibco (Karlsruhe)
Kodak (Stuttgart)
Whatman (Maidstone, UK)
Agfa-Gevaert (Leverkusen)
Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Becton Dickinson (Heidelberg)
Biorad (München)
Amersham-Pharmacia (Freiburg)
AT Biochem (Malvern, USA)
Schleicher und Schuell (Dassel)
Alexis (San Diego, USA)
Sigma (Deisenhofen)
Sigma (Deisenhofen)
Biorad (München)
Sigma (Deisenhofen)
Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Gibco (Karlsruhe)
B.Braun (Melsungen)
B.Braun (Melsungen)
Rudolf Franke Labortechnik (Hamburg)

Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
YC-1	Alexis (San Diego, USA)

2.1.3. Enzyme

2.1.3.1. Diverse Enzyme

Advantage cDNA Polymerase Mix	Clontech (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase	Boehringer (Mannheim)
Kreatin-Kinase	Sigma (Deisenhofen)
Lysozym	Roche (Mannheim)
Pfu-turbo DNA Polymerase	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
RNase A	Roche (Mannheim)
T4 DNA Ligase	Boehringer (Mannheim)
Taq DNA Polymerase	Gibco (Karlsruhe)

2.1.3.2. Restriktionsendonukleasen

AscI, BamHI, BsaI, BsmFI, BssHII, BstEII, EagI, EcoRI, HindIII, KpnI, NheI, NotI, PvuII, ScaI, SpeI, StuI, XbaI (alle New England Biolabs, Beverly, USA)

2.1.4. DNA und Vektoren

DNA Standard 1 kb	MBI (St. Leon-Rot)
pcDNA3.1/V5/His-TOPO	Invitrogen (Leek, Niederlande)
pcDNA3.1Zeo+	Invitrogen (Leek, Niederlande)
pFASTBAC	Gibco (Karlsruhe)
pGEM7ZF+	Promega (Heidelberg)
Rat Kidney Marathon-Ready™ cDNA	Clontech (Heidelberg)

2.1.5. Reagenziensysteme

Advantage™ cDNA PCR Kit	Clontech (Heidelberg)
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Eucaryotic TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

2.1.6. Lösungen und Puffer

DNA-Probenpuffer:	1 % Bromphenolblau; 1 % Xylencyanid; 50 % Glycerin; 1 x TBE
FPLC-Puffer 1:	50 mM TEA; 10 mM DTT; 1 mM Benzamidin; pH 8,0
FPLC-Puffer 2:	50 mM TEA; 10 mM DTT; 1 mM Benzamidin; 1 M NaCl; pH 8,0
FPLC-Puffer 3:	10 mM Kaliumphosphat; 10 mM DTT; 1 mM Benzamidin; pH 6,8
FPLC-Puffer 4:	400 mM Kaliumphosphat; 10 mM DTT; 1 mM Benzamidin; pH 6,8
FPLC-Puffer 5:	50 mM TEA; 250 mM NaCl; pH 8,0
Homogenisationspuffer:	50 mM TEA; 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,2 µM Benzamidin; 10 mM DTT; pH 7,6
LB-Medium:	10,0 g Trypton; 5,0 g Hefe-Extrakt; 5,0 g NaCl; H ₂ O ad 1 l; pH 7,4
Laemmli-Puffer:	2 % SDS; 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % 2-Mercaptoethanol; 10 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau
Laufpuffer:	0,1 % SDS; 25 mM Tris; 192 mM Glycin; pH 8,8
Lysis-Puffer:	10 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,2 % SDS; pH 7,4
TBE-Puffer (10 x):	0,9 M Tris; 0,9 M Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8,0
TBST-Puffer:	150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 % Tween 20
Transferpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,02 % SDS; 20 % Methanol

2.1.7. Stammlösungen

1 mM BAY 41-2272	in 25 % (v/v) DMSO
10 mM DEA/NO	in 10 mM NaOH
1 mM ODQ	in 25 % (v/v) DMSO
10 mM Protoporphyrin IX	in 10 mM NaOH
3 mM YC-1	in 25 % (v/v) DMSO

2.1.8. Gele

Agarosegel (DNA):	1 % (w/v) Agarose; 1 x TBE-Puffer; 0,1 µg/ml Ethidiumbromid
Sammelgel:	0,1 % SDS; 6 % Acrylamid; 125 mM Tris/HCl pH 8,8; 1,2 % Ammoniumpersulfat; 0,6 % TEMED
Trenngel:	0,1 % SDS; 10 % Acrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % Ammoniumpersulfat; 0,1 % TEMED

2.1.9. Geräte

Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing	Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Analysenwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Beckman Zentrifuge (J2-21)	Beckman (Palo Alto, USA)

Beckman Zentrifuge (J6-B)	Beckman (Palo Alto, USA)
Blotkammer	Biorad (München)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Digitalkamera	Kaiser (Buchen)
Elektrophoresekammern	Biorad (München)
FPLC-System	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Kühltruhe (-80 °C; -20 °C)	Kryotec (Hamburg)
Magnetrührer	Heidolph (Kelheim)
PCR-Heizblock Express	Hybaid (Heidelberg)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Photometer	Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Pipettierhilfe	Eppendorf (Hamburg)
Power Supply	Biorad (München)
Reinraumwerkbank	Heraeus (Hanau)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Schüttelinkubator für Bakterienkulturen	Teq, CFL Laborgeräte (Emersacker)
Szintillationszähler	Beckman (Palo Alto, USA)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge (Centricon T-2170)	Kontron Instruments (Mailand, Italien)
Vortexer	Heidolph (Kelheim)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)
Zellaufschlussbombe	Parr (Moline, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Klonierung von DNA in Plasmidvektoren mittels Restriktionsendonukleasen

Für einen präparativen Restriktionsenzymverdau wurden 1-3 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl geschnitten. Pro µg DNA wurden 5-10 definierte Einheiten (U) der Restriktionsendonukleasen und die vom Hersteller empfohlenen zehnfach konzentrierten Puffer verwendet. Diese enthalten in der Regel MgCl₂, Puffersubstanzen wie Tris/HCl sowie DTT als Oxidationsschutz für das Enzym. Die Reaktionsansätze wurden mit destilliertem Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt und eine Stunde bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Um bei der Klonierung eine Selbstligation von Vektoren mit kompatiblen Enden zu vermeiden, wurden im Anschluss an den Restriktionsverdau die 5'-Phosphatreste der DNA-Enden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase entfernt. Dazu wurde der Reaktionsansatz zuerst für zehn Minuten auf 65 °C erhitzt, um die Restriktionsendonukleasen zu inaktivieren. Im Anschluss daran wurden dann 5-10 U Phosphatase und 3 µl zehnfach konzentrierter Dephosphorylierungspuffer hinzugegeben. Das Reaktionsvolumen wurde mit destilliertem Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte erneut eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C, um die Phosphatase zu inaktivieren. Erforderte die Klonierungsstrategie das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden zu glatten Enden, so wurden dem Reaktionsansatz 1,25 U pfu-Turbo-Polymerase der Fa. Gibco, 0,4 mM eines dNTP-Mixes sowie die benötigte Menge eines zehnfach konzentrierten pfu-Reaktionspuffers hinzugegeben. Für die Auffüllreaktion wurde der gesamte Ansatz eine halbe Stunde bei 72 °C inkubiert. Die Ansätze wurden im Anschluss an die Inkubation mit 2 µl Probenpuffer versetzt und die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA-Fragmente können nach einer Methode von Aaij und Borst (1972) ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Agarose wurde in einer Endkonzentration von 1 % (w/v) in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml hinzugesetzt. Die einzelnen Fragmente wurden mittels eines UV-Transilluminators detektiert. Anhand des mitgeführten DNA-Standards wurden ihre Größen bestimmt. Definierte Banden wurden mit dem sie umschließenden Gel herausgetrennt. Die so erhaltenen Gelstücke wurden gewogen und mit je 300 µl Gelextraktionspuffer des Gelextraktions-Reagenziensystems der Fa. Qiagen pro 100 mg Gel versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 50 °C wurde die gesamte Lösung auf die vorgesehene Säule gegeben und anschließend so verfahren wie es das Protokoll des Reagenziensystems für die Gelextraktion vorgab. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µl des Elutionspuffers.

Bei der Ligation wird ein Restriktionsfragment über kompatible Enden mit linearisierter Vektor-DNA verbunden, so dass ein zirkuläres DNA-Molekül entsteht. Die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen wird von Ligasen katalysiert. Im allgemeinen wurden bei jeder Klonierung drei Ligationsansätze erstellt, wobei jeder Ansatz ein Endvolumen von 30 µl hatte. Pro Ansatz wurden 1 U T4-DNA-Ligase und 3 µl eines zehnfach konzentrierten Ligasepuffers hinzugegeben. Im Kontrollansatz wurde lediglich Vektor-DNA mit der Ligase behandelt. Dieser Ansatz diente als Negativ-Kontrolle zur Überprüfung der Religationsereignisse in der Vektor-DNA. In den anderen beiden Ansätzen wurde ein konstantes Volumen (in der Regel 3 µl der Agarose-Gelelution) der linearisierten Vektor-DNA mit steigenden Mengen der zu klonierenden DNA-Fragmente gemischt, um die Ligationseffizienz zu kontrollieren. Alle Ansätze wurden mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 30 µl aufgefüllt. Daran schloss sich eine Inkubationsperiode von 1,5 h bei Raumtemperatur an.

2.2.1.2. Transformation von DNA in E.coli

Durch Behandlung von E.coli-Zellen mit CaCl_2 (Maniatis et al. 1989) können diese in einen transienten Zustand der „Kompetenz“ übergehen, währenddessen sie fremde DNA-Moleküle aufnehmen können. Plasmid-DNA, deren Aufnahme dem Bakterium aufgrund der damit erworbenen Antibiotika-Resistenz einen Selektionsvorteil bringt, kann so unabhängig von chromosomaler DNA repliziert werden. Zur Transformation wurden je 100 μl der „kompetenten“ E.coli-Zellen (Subtyp DH5 α) mit je 10 μl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 min bei 42 °C (Hitzeschock) und eine erneute Abkühlung der Proben für 2 min auf Eis. Im Anschluss an die Transformation wurde jede Probe mit 350 μl vorgewärmtem LB-Medium versetzt und für eine Stunde im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. 300 μl jedes Reaktionsansatzes wurden dann auf geeigneten, antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C gelagert.

2.2.1.3. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA

Eine Methode zur Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA ist die alkalische Lyse von Bakterien (Birnboim und Doly 1979). Dazu wurden 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Aufarbeitung der Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Mini-Reagenziensystems (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 30 μl destilliertem Wasser aufgenommen.

2.2.1.4. Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA

Zur Herstellung größerer Mengen gereinigter DNA wurden 200 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit 200 μl der Minipräparationskultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (140 rpm) inkubiert. Die Aufarbeitung der Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Maxi-Reagenziensystems (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde in destilliertem Wasser resuspendiert und photometrisch auf ihre Konzentration hin überprüft. Es wurde eine DNA-Endkonzentration von 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Zur Erzeugung endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde das „endofree“-Plasmid-Maxi-Reagenziensystem (Quiagen) verwendet. Die DNA wurde im Anschluss an diese Präparation mit endotoxinfreiem, destilliertem Wasser aufgenommen und eine Endkonzentration von 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

2.2.1.5. Analyse der präparierten Plasmid-DNA

Die Erstanalyse der isolierten Plasmid-DNA erfolgte nach der Präparation kleiner DNA-Mengen mittels Restriktionsendonukleasen. Die Auswahl einer geeigneten Kombination von verschiedenen Endonukleasen wurde so durchgeführt, dass anhand der sich anschließenden Gelelektrophorese eindeutig festgestellt werden konnte, ob das zu klonierende DNA-Fragment in der korrekten Orientierung in den Vektor inseriert wurde. Prinzipiell wurde ebenso bei der Analyse der Plasmid-DNA nach der Präparation größerer DNA-Mengen verfahren. Hierbei wurden möglichst viele verschiedene Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um so eine umfassende Kontrolle des klonierten Plasmids zu erhalten.

Für eine detaillierte Untersuchung der Plasmide wurde die DNA mittels der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) sequenziert und auf ihre Korrektheit hin verglichen. Für die Sequenzierung wurden 1 µg DNA mit 4 µl "Big Dye" (PerkinElmer) und 10 pmol eines genspezifischen Oligonukleotids gemischt und mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktionen wurden auf einem Thermocycler mit dem folgenden Temperaturprofil in einem 20 µl Reaktionsansatz durchgeführt: 25 Zyklen 96 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 60 °C 4 min. Im Anschluss an die Sequenzierung wurde die DNA im Reaktionsansatz durch die Zugabe von 80 µl destilliertem Wasser, 300 µl 100 % EtOH und 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 7,0) gefällt und getrocknet. Die weiteren Schritte der Sequenzierung wurden in Kooperation mit der Service-Abteilung des Institutes für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

2.2.1.6. Nukleotidaustausch in Zielsequenzen mittels PCR

Um einzelne Nukleotide innerhalb der Plasmid-DNA zu verändern, wurde das "QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis"-Reagenziensystem der Fa. Stratagene verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass mittels synthetisierter Oligonukleotide, welche die veränderte DNA-Sequenz enthalten, eine PCR durchgeführt wird, so dass die neu synthetisierte Plasmid-DNA eine veränderte Sequenz besitzt. Das Ausgangsplasmid wird mit Hilfe einer speziellen Restriktionsendonuklease verdaut, so dass anschließend nur noch die modifizierte DNA-Sequenz vorhanden ist. Die Erzeugung der Punktmutation auf DNA-Ebene wurde nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Transformation in Epicurian Coli XL1-Blue Zellen der Fa. Stratagene mit nachfolgender Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (siehe 3.1.4.). Im Anschluss daran wurde die Plasmid-DNA in Doppelbestimmung mit genspezifischen Oligonukleotiden sequenziert, um den erfolgreichen Nukleotidaustausch zu verifizieren.

2.2.2. Proteinbiosynthese in Sf9-Zellen

Sf9-Insekten-Zellen stammen aus Ovarien von *Spodoptera frugiperda* (Familie Noctuidae, Ordnung Lepidoptera). Die zur Expression von rekombinantem Protein eingesetzten Baculoviren sind doppelsträngige, zirkuläre DNA-Viren, die Insektenzellen befallen. Bei einer Untergruppe der Baculoviren sind mehrere Viren in einen Polyhedrin-Proteinkristall eingebettet, der den Viren außerhalb der Insekten einen mechanischen Schutz bietet. Ein häufig für die Expression verwendeter Vertreter dieser Untergruppe ist der AcMNPV-Virus (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*). Aufgrund der Größe des Baculovirus-Genoms (AcMNPV: 128 kb) gibt es keinen direkten Weg, die Fremd-DNA mit Hilfe nur einmal vorkommender Restriktionsschnittstellen in das Virus-Genom zu integrieren. Zur Integration der gewünschten cDNA in das Virus-Genom wurde das BAC-TO-BAC-System der Fa. Gibco verwendet. Hierbei wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen zunächst in den Donor Plasmid-Vektor pFASTBAC kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde anschließend in kompetente *E.coli*-Zellen (Subtyp DH10BAC) transformiert. Diese *E.coli*-Zellen enthalten eine Bacmid-DNA und ein Helfer-Plasmid, das für Transpositionsproteine kodiert, die eine Rekombination des inklonierten Gens des Donor-Plasmids mit dem Bacmid unterstützen. Dadurch kommt es bei dem Bacmid zu einer Zerstörung des *lacZ* α -Gens, wodurch diese Klone durch Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden können. Minipräparations-DNA dieser Bacmid-Klone wurde nach der Vorschrift des BAC-TO-BAC-Systems isoliert. Mit Hilfe von bacmidspezifischen Oligonukleotiden wurde in der PCR die Rekombination der entsprechenden cDNAs untersucht. Anschließend wurden die positiven Minipräparations-DNAs zur Transfektion von Sf9-Zellen verwendet. Nach einer Inkubationsdauer der transfizierten Sf9-Zellen von 120 Stunden konnten rekombinante Baculovirus-Partikel aus dem Kulturmediumüberstand isoliert werden. Hier wurde zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion eine PCR-Untersuchung mit genspezifischen Oligonukleotiden an dem Zellüberstand durchgeführt.

2.2.2.1. Klonierung von Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten und Mutanten in den Transfervektor pFASTBAC

2.2.2.1.1. Klonierung der α_2 -Untereinheit der Ratte

Für die schnelle Verlängerung von cDNA-Enden ("Rapid amplification of cDNA ends" oder RACE) verwendeten wir Marathon-Ready™ cDNA aus Rattennieren von männlichen Sprague-Dawley-Ratten in einem Alter von 10-12 Wochen (Clontech) mit dem Advantage™ cDNA PCR-Reagenziensystem (Clontech) nach den Angaben des Herstellers. Zwei verschachtelte genspezifische Oligonukleotide aus dem 3'-nichttranslatierten Bereich wurden für die 5'-RACE-PCR mit den entsprechenden Adapteroligonukleotiden verwendet (P136, 5'-AGT CAT TCA CCA TTT CAA GGA TTA TTA CG-3'; P137, 5'-CTG GGC TTG TGC TTT TTG GAG GAG TCT-3'). Die Reaktionen wurden auf einem Thermocycler mit dem folgenden Temperaturprofil in einem 25 μ l Reaktionsansatz

durchgeführt: 94 °C 3 min, 40 Zyklen 94 °C 1 min, 55 °C 45 sec, 72 °C 4 min und ein abschließender Extensionsschritt von 4 min bei 72 °C. Nach der ersten Amplifikation von 5 µl Rattennieren cDNA mit dem äußeren Oligonukleotidpaar waren nach Agarosegelelektrophorese keine gut abgrenzbaren Reaktionsprodukte detektierbar. 1 µl von dieser ersten PCR-Reaktion wurde als Matrize in der zweiten verschachtelten PCR-Reaktion eingesetzt. Nach 32 Zyklen des obigen Programms war nach Agarosegelelektrophorese ein gut sichtbares PCR-Produkt von 2593 bp vorhanden. Dieses Amplifikationsprodukt wurde aus dem Gel eluiert (Gelextraktions-Reagenziensystem, Fa. Qiagen) und in den pcDNA3.1/V5/HisTOPO Vektor unter Verwendung des TOPO-TA-cloning-Reagenziensystems®(Invitrogen) kloniert. Nach Sequenzierung mit mehreren genspezifischen Oligonukleotiden ergab sich eine Sequenz mit hoher Homologie zu der bekannten Sequenz der humanen α_2 -Untereinheit. Allerdings fehlte im Vergleich zu dieser ein Fragment von 121 bp innerhalb der kodierenden Region, die den Leserahmen unterbrach (Position 781-902 der eingereichten Sequenz AF109963). Um zu überprüfen, ob dies tatsächlich die korrekte endogene Sequenz repräsentiert, verwendeten wir zusätzliche Oligonukleotide in der PCR unter den folgenden Bedingungen: 94 °C 3 min, 40 Zyklen 94 °C 1 min, 60 °C 45 sec, 72 °C 80 sec und ein abschließender Extensionsschritt für 4 min bei 72 °C. Die Oligonukleotide P158 (5'-AGC CCC GAA GCG ACT GAA GCT G-3') und P159 (5'-ATG GTG GGG GTG GAA GTA GTG GAG TTT-3') entsprachen den Sequenzabschnitten von Position 268-289 und 1146-1120 der eingereichten Sequenz AF109963. Ein PCR-Produkt von 878 bp, welches das vorher fehlende Fragment zur humanen α_2 -Untereinheit enthielt, wurde kloniert und sequenziert. Um eine vollständige cDNA der α_2 -Untereinheit der Ratte im Vektor pcDNA3.1/V5/HisTOPO mit einem Insert von 2714 bp zu erhalten, wurden die Restriktionsenzyme BsaI und XbaI verwendet. Diese vollständige cDNA wurde in zwei Schritten mit den Restriktionsenzymen NotI und HindIII in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC kloniert und durch Sequenzierung mit mehreren genspezifischen Oligonukleotiden überprüft. Die vollständige zusammengesetzte Sequenz wurde bei der Genbank Datenbank unter dem Zugangscode AF109963 eingereicht.

2.2.2.1.2. Klonierung in den Transfervektor pFASTBAC

Die cDNAs der humanen α_1 - und β_1 -Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase wurden freundlicherweise von Dr. Georges Guellaën, Créteil in dem Vektor pGEM7ZF(+) zur Verfügung gestellt (Giuli et al. 1992). Für die β_1 -Untereinheit wurde ein Fragment von 2044 bp, das die kodierende Region umfaßte, EagI / XbaI aus dem Vektor pGEM7ZF(+) ausgeschnitten und NotI / XbaI in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC einkloniert. Für die α_1 -Untereinheit wurde ein die kodierende Region umfassendes Fragment EcoRI / ScaI aus dem Vektor pGEM7ZF(+) ausgeschnitten und EcoRI / StuI in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC einkloniert. Durch erneutes Schneiden mit AscI (interne Schnittstelle) und BssHII (Restriktionsschnittstelle in pFASTBAC) und Religation wurde die α_1 -cDNA in dem Baculovirustransfervektor um 270 bp im

5'-nichttranslatierten Bereich gekürzt. Erfahrungsgemäß führen kürzere 5'-nichttranslatierte Bereiche zu höheren Expressionsspiegeln im Baculovirussystem. Dieses Konstrukt diente weiterhin zur Erzeugung von aminoterminalen Deletionsmutanten der humanen α_1 -Untereinheit. Das Konstrukt wurde PvuII (interne Schnittstelle) und HindIII geschnitten, anschließend StuI/HindIII in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC inkloniert und mit $\alpha_1\Delta N_{236}$ bezeichnet. Die Deletionsmutante $\alpha_1\Delta N_{364}$ wurde durch Schneiden mit BsmFI/HindIII und Klonierung in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC mit StuI/HindIII nach Auffüllen der BsmFI-Überhänge hergestellt. Zur Erzeugung der Deletionsmutante $\alpha_1\Delta N_{259}$ erfolgte zuerst ein Nukleotidaustausch in der cDNA des humanen α_1 -Konstruktes, um eine geeignete Restriktionsschnittstelle für die Klonierung zu schaffen. Diese Punktmutation wurde mit Hilfe des "QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis"-Reagenziensystems (Stratagene) und genspezifischer Oligonuklotide durchgeführt (P 216: 5'-GCG AGT TTG TGA ATC AGC CCT ACT AGT TGT ACT CCG-3' und P 217: 5'-CGG AGT ACA ACT AGT AGG GCT GAT TCA CAA ACT CGC-3'; das veränderte Nukleotid ist unterstrichen). Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels Sequenzierung kontrolliert. Die Deletionsmutante $\alpha_1\Delta N_{259}$ wurde durch Schneiden des veränderten Konstrukts mit SpeI/HindIII und erneuter Klonierung in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC mit SpeI/HindIII hergestellt. Für die α_2 -Untereinheit der Ratte (siehe Abschnitt 2.2.2.1.1.) wurde auf die NotI/HindIII in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC klonierte cDNA zurückgegriffen. Dieses Konstrukt wurde im 5'-nichttranslatierten Bereich durch Schneiden mit BstEII (Schnittstelle im 5'-nichttranslatierten Bereich) und StuI (Schnittstelle im Vektor) und Religation nach Auffüllen der BstEII-Überhänge gekürzt. Das resultierende Konstrukt wird im folgenden nur noch mit α_2 bezeichnet. Die Deletionsmutante $\alpha_2\Delta N_{104}$ wurde durch Schneiden mit PvuII/HindIII und erneuter Klonierung in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC mit PvuII/HindIII hergestellt. Die Mutante $\alpha_2\Delta N_{247}$ wurde durch Schneiden mit XbaI/KpnI und erneuter Klonierung in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC mit XbaI/KpnI hergestellt. Die Mutante $\alpha_2\Delta N_{401}$ wurde durch Schneiden mit HindIII und erneuter Klonierung in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC mit HindIII hergestellt. Für die Klonierung der β_2 -Untereinheit der Ratte wurde von der cDNA ausgegangen, die durch Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe bereits BamHI/HindIII in dem Vektor pcDNA3.1Zeo+ vorlag (Koglin et al. 2001). Dieses Konstrukt wurde NheI/XbaI geschnitten und über die kompatible SpeI-Schnittstelle in den Baculovirustransfervektor pFASTBAC kloniert. Zur Erzeugung der Punktmutante β_2E596A erfolgte ein Nukleotidaustausch in der cDNA des β_2 -Konstruktes der Ratte (in pFASTBAC). Diese Punktmutation wurde mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide durchgeführt (P 193: 5'-GCC TCT AGG ATG GCA AGT CAC GGG CTT CCC-3' und P 194: 5'-GGG AAG CCC GTG ACT TGC CAT CCT AGA GGC-3'; das veränderte Nukleotid ist unterstrichen). Zur Erzeugung der Punktmutante β_2C739S erfolgte ein Nukleotidaustausch in der cDNA des β_2 -Konstruktes der Ratte. Diese Punktmutation wurde mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide

durchgeführt (P 211: 5'-GGC CCT GTG CTG TCT GCT TTC TCT GTT GTG CTG TGA TCA CG-3' und P 212: 5'-CGT GAT CAC AGC ACA ACA GAG AAA GCA GAC AGC ACA GGG CC-3'; das veränderte Nukleotid ist unterstrichen). Zur Erzeugung der Deletionsmutante $\beta_2\Delta C_{45}$ erfolgte ein Nukleotidaustausch in der cDNA des β_2 -Konstruktes der Ratte. Hierdurch wurde ein Stop-Codon in der Sequenz erzeugt und der Leserahmen unterbrochen. Diese Punktmutation wurde mit Hilfe genspezifischer Oligonuklotide durchgeführt (P 209: 5'-GGA GAC CCA GCA GAC GCT TCT AAT TAA GTC ACA CTT GCT GGG-3' und P 210: 5'-CCC AGC AAG TGT GAC TTA ATT AGA GAC GTC TGC TGG GTC TCC-3'; das veränderte Nukleotid ist unterstrichen). Diese drei neuen Konstrukte wurden mittels Sequenzierung kontrolliert.

2.2.2.2. Transposition

DH10BAC-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Christiane Kleuss, Freie Universität Berlin, zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden mit der CaCl_2 -Methode (Maniatis et al. 1989) in einen kompetenten Zustand gebracht und bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, etwa 500 ng des entsprechenden pFASTBAC-Konstruktes wurden mit je 100 μl Zellsuspension vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt und es wurden je 900 μl LB-Medium hinzugefügt. Diese Ansätze wurden bei 37°C für 4 Stunden inkubiert und Verdünnungen der Probe von 1:10, 1:100 und 1:1000 in LB-Medium angesetzt. 100 μl jeder Verdünnung wurden auf eine Agarplatte ausplattiert, die zusätzlich 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, 7 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin, 300 $\mu\text{g/ml}$ Bluo-gal und 40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG enthielten. Die so ausplattierten Ansätze wurden bei 37°C inkubiert, wobei die Blau-Weiß-Differenzierung erst nach 36-48 Stunden deutlich erkennbar wurde. Zur Isolierung von rekombinanter Bacmid-DNA wurden große, weiße Kolonien von den entsprechenden Platten ausgewählt und in 4 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, 7 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Überführung von 1,5 ml dieser Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Gefäß wurden die Bakterien bei 14000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das bakterielle Sediment wurde in 300 μl einer Lösung, bestehend aus 15 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA und 100 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA, resuspendiert. 300 μl einer Lösung, bestehend aus 0,2 N NaOH, 1 % SDS, wurden hinzugefügt und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unter ständigem Mischen wurden langsam 300 μl einer Lösung von 3 M K-Acetat (pH 5,5) hinzugefügt und die Probe für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min wurde der Überstand in vorbereitete 2 ml Eppendorf Gefäße pipettiert und mit 800 μl Isopropanol durch Invertieren gemischt. Nach Inkubation der Probe für 5-10 min auf Eis wurde erneut bei 14000 rpm für ca. 25 min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 μl 70 %igem Ethanol gewaschen und unter einer Reinraumwerkbank getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 40 μl destilliertem Wasser aufgenommen. Die Rekombination der cDNA der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten wurde mit Hilfe von bacmid-spezifischen Oligonukleotiden in der PCR an diesen

Bacmid-Präparationen überprüft (M13/pUC_forward: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'; M13/pUC_reverse: 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3').

2.2.2.3. Kultivierung der Sf9-Zellen

Die Sf9-Zellen wurden im Brutschrank bei 27 °C inkubiert. Wenn nicht anders angegeben wurde das serumfreie Medium Sf-900II SFM der Firma Gibco mit Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 50 U/ml (Penicillin) und 50 µg/ml (Streptomycin) verwendet. Dem Medium wurde vor seiner Verwendung noch fetales Rinderserum (Gibco) in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugesetzt. Medium mit fetalem Rinderserum wird im weiteren nur noch mit Sf-900II SFM (++) bezeichnet. Sf9-Zellen in Gewebekulturschalen wurden jeden zweiten Tag mit frischem Medium versehen. Hierzu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Die Zellen wurden anschließend durch Klopfen abgelöst und gezählt. Je nach Ausgangszellzahl der Suspension wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 mit frischem Medium verdünnt, so daß eine Zellzahl von ca. $0,5 \times 10^6$ Sf9-Zellen/ml vorlag. Schüttelkulturen wurden mit mindestens 50×10^6 Zellen bei einer Zelldichte von ca. $0,5 \times 10^6$ Sf9-Zellen/ml gestartet. Die Zellen verdoppelten sich dann etwa alle 18-24 Stunden. Zelldichten über $3,5 \times 10^6$ Sf9-Zellen/ml wurden durch Zugabe von Medium vermieden.

2.2.2.4. Transfektion der Sf9-Zellen

Pro Ansatz wurden 5×10^5 Sf9-Zellen in eine 35 mm Schale gegeben. 2 ml des Mediums Sf-900II SFM (++) wurden hinzugegeben und die Schalen bis zu einer Stunde bei 27 °C inkubiert, damit sich die Zellen am Schalenboden anheften konnten. Für jede Transfektion wurden ca. 5 µl der entsprechenden positiven Bacmid-DNA in 100 µl Sf-900II SFM Medium und 6 µl Cellfectin Reagenz (Gibco) in 100 µl Sf-900II SFM Medium vorbereitet. Diese beiden Lösungen wurden vereinigt und 15-45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für jede Transfektion wurden den 200 µl der Mischung aus Cellfectin und DNA 800 µl Sf-900II SFM Medium zugegeben, vorsichtig gemischt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 5 Stunden in einem Inkubator bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionsmischung abgenommen und die adherierten Zellen wurden mit 2 ml Sf-900II SFM Medium gewaschen, anschließend mit 2 ml frischem Sf-900II SFM (++) Medium versetzt und im Inkubator bei 27 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach 5 Tagen in einer PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden auf das Vorhandensein von rekombinanten Viren im Zellkulturmedium getestet. Bei einem positiven Befund wurde der Überstand für die Amplifikation von Viren verwendet.

2.2.2.5. Amplifikation der isolierten Viren

Durch PCR-Untersuchung überprüfte Transfektionsüberstände, welche die gewünschten rekombinanten Baculoviren enthielten, wurden für die erste Amplifikation eingesetzt. Dazu wurden 500 µl des Transfektionsüberstands mit 50 ml einer Zellsuspension mit $1,8 \times 10^6$ Sf9-Zellen/ml gemischt und für 72 h als Schüttelkultur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 2500 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4 °C aufbewahrt. Für die 2. bzw. 3. Amplifikation wurden 50 ml einer Zellsuspension mit $1,8 \times 10^6$ Sf9-Zellen/ml mit 2-3 ml der vorhergehenden Amplifikation gemischt. Anschließend wurde verfahren wie für die erste Amplifikation beschrieben.

2.2.2.6. Titerbestimmung der Viruslösungen

Die Titerbestimmungen der Viruslösungen wurden nach der Endpunktverdünnungsmethode durchgeführt (Reed und Muench 1938). Dabei wird die Verdünnung von Viruslösungen ermittelt, die 50 % der Kulturen infiziert. Dieser TCID₅₀-Wert wurde nach der folgenden Gleichung in den entsprechenden „plaque forming unit“ (pfu)-Wert umgerechnet:

$$\text{pfu} = 0,69 \times \text{TCID}_{50}.$$

Praktisch wurden 100 µl Zellen mit einer Dichte von 10^5 Sf9-Zellen pro ml Sf-900II SFM (++) Medium in die Vertiefungen einer "96-well" Gewebekulturschale gegeben. Verdünnungen der Virusüberstände in einer Konzentration von 10^{-1} bis 10^{-8} (erste Amplifikation) oder 10^{-4} bis 10^{-11} (zweite und dritte Amplifikation) wurden in je elf verschiedenen Vertiefungen getestet, wobei eine zwölfte Vertiefung uninfiziert als Negativkontrolle diente. Nach 5 Tagen Inkubation bei 27 °C wurde optisch am Mikroskop durch die Morphologie der Sf9-Zellen bestimmt, ob es bei der gegebenen Viruskonzentration zu einer Infektion gekommen war. Eine ausführliche Erläuterung der Methode mit ihrer statistischen Basis findet sich bei Dougherty (1964) und Hughes und Wood (1986).

2.2.2.7. Infektion von Sf9-Zellen zur Herstellung von rekombinantem Protein

Das für die Infektion von Sf9-Zellen geeignete Verhältnis von Viren (pfu) zu Zellen wird MOI („multiplicity of infection“) genannt und hat als Einheit pfu/Zelle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zellen in der Regel mit MOI-Werten von 0,5 – 3 infiziert. Für die Herstellung von Sf9-Zellen im präparativen Maßstab wurden diese in Schüttelkultur vermehrt. In 100 ml-Erlenmeyer-Kolben wurden 36×10^6 Sf9-Zellen in einem Volumen von 30 ml mit dem für die gewünschte MOI benötigten Volumen an Virus-Lösung versetzt und 74 Stunden bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit bis zu drei verschiedenen rekombinanten Viren angeimpft, welche für Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten kodieren.

2.2.2.8. Gewinnung des cytosolischen und membranären Proteins aus Sf9-Zellen

Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher überführt und sedimentiert (4 °C, 2500 x g, 10 min). Die Überstände wurden verworfen und die Zellen in je 4 ml Homogenisationspuffer (1 mM EDTA, pH 8,0, 50 mM TEA/HCl, pH 7,6, 10 mM DTT und 0,2 µM Benzamidin) resuspendiert und anschließend durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Sterican[®]-Kanüle (0,45 x 25 mm, B.Braun) aufgeschlossen. Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 800 x g für 2 min bei 4 °C (ohne Zentrifugenbremse) abgetrennt. Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und die Membranen für 30 min bei 4 °C und mit 40000 x g von der cytosolischen Fraktion abgetrennt. Die Membranfraktion wurde mit 4 ml des Homogenisationspuffers gewaschen (40000 x g, 4 °C, 10 min) und anschließend in einem geeigneten Volumen Homogenisationspuffer resuspendiert. Für die Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurden in der Regel 10 µl (40-50 µg Protein) der cytosolischen oder membranären Sf9-Zellfraktion eingesetzt. Diese Fraktionen wurden nur am Tag der Aufarbeitung für die Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität genutzt. Für die nachfolgende Proteinbestimmung wurden die cytosolischen bzw. membranären Fraktionen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für Nachweise der rekombinanten Proteine mittels spezifischer Antikörper in Immunoblots wurden Aliquots jeder Aufarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.2.3. Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität

Die Methode zur Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität beruht auf der Messung von aus $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ gebildetem $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ (Schultz und Böhme 1984). 40-50 µg Protein wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl in Anwesenheit von 0,025 mg Kreatin-Kinase, 50 mM TEA/HCl (pH 7,4), 1 mM IBMX, 3 mM MgCl_2 , 5 mM Kreatinphosphat, 1 mM cGMP, 0,5 mM GTP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von cGMP erhöht man nicht nur die Wiederfindungsrate von $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$, sondern verringert auch den durch Phosphodiesterasen abgebauten Anteil an $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$. Bei Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter stimulierten Bedingungen wurde den Ansätzen in unterschiedlichen Konzentrationen entweder DEA/NO und/oder Guanylyl-Cyclase-Modulatoren zugegeben. Nach 10 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 (Tischzentrifuge: 8 min bei 14000 rpm) abgetrennt, das $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ verblieb im Überstand. In Säulen wurde Aluminiumoxid mit 2 ml 0,1 N Perchlorsäure angesäuert und 900 µl Überstand der Inkubationsansätze noch während der Ansäuerung zugegeben und das $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ an die Säule gebunden. Die Säule wurde zweimal mit 5 ml demineralisiertem Wasser gespült. Anschließend wurde das $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ mit 5 ml 250 mM Natriumacetat (pH 6,5) in Szintillationsgefäße eluiert. Die Zerfälle pro Minute (cpm) des ^{32}P wurden durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler 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 [³²P]cGMP konnte so nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Zählrate des Leerwertes von den Zählraten der Ansätze abgezogen. Die Wiederfindungsrate wurde in einigen Ansätzen durch den Einsatz von [³²P]cGMP anstatt [α -³²P]GTP bestimmt, da während der Probenaufbereitung ein Teil des cGMP mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitierte bzw. nicht vollständig von den Aluminiumoxidsäulen 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 [α -³²P]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:

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

- v spez. Aktivität der Guanylyl-Cyclase (nmol cGMP x min⁻¹ x mg Protein⁻¹)
- C Zählrate der Probe (cpm)
- C₀ Zählrate des Leerwertes (cpm)
- C_t Zählrate des eingesetzten [α -³²P]GTP (cpm)
- S Menge des eingesetzten Substrates 5'-GTP pro Ansatz (nmol)
- W Wiederfindungsrate von cGMP (bestimmt mit [³²P]cGMP, um Verluste durch Kopräzipitation mit ZnCO₃ oder unvollständige Elution von der Säule zu quantifizieren)
- RG Reinheitsgrad des [α -³²P]GTP
- P Proteinmenge pro Inkubationsansatz (mg)
- t Inkubationsdauer (min)

2.2.4. Nachweis der Proteinexpression mittels Immunoblots

2.2.4.1. Quantitativer Proteinnachweis

Die quantitative Proteinanalyse erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford et al. 1976). Für das Bradford-Reagenz wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue (G 250) in 50 ml 95 %igem Ethanol gelöst und mit 100 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt. Die Mischung wurde mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von einem Liter gebracht. Als Standard wurde Plasma γ Globulin (Biorad Protein Standard I) verwendet. Für die Bestimmung der cytosolischen und membranären Proteinkonzentrationen wurden 10 μ l Probe mit 90 μ l destilliertem Wasser gemischt und anschließend 5 ml des Bradford-Reagenzes hinzugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 10 Minuten wurde die Proteinmenge photometrisch bestimmt.

2.2.4.2. Herstellung spezifischer Antiseren

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden spezifische Antiseren gegen die einzelnen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase hergestellt. Geeignete, möglichst immunogene Peptidsequenzen wurden mit Hilfe der Computerprogramme Protean (DNAstar™) und Antheprot Version 4.0 (Web server <http://pbil.ibcp.fr/NPSA>) ausgewählt. Die ausgewählten Peptide wurden von der Firma Eurogentech synthetisiert, über ein Cystein an KLH gekoppelt und je zwei Kaninchen pro Peptidsequenz injiziert. Für die Herstellung der humanen α_1 -Antikörper wurden zwei Peptidsequenzen parallel injiziert. Am Tag 0 wurde Präimmenserum entnommen, und die erste Injektion von KLH-gekoppeltem Peptidantigen vorgenommen. Am Tag 14, 28 und 56 wurde die Injektion wiederholt. Testblutungen wurden an den Tagen 38 und 66, die finale Blutung der Kaninchen am Tag 80 vorgenommen. Die Aminosäuresequenzen der Peptide für die einzelnen Untereinheiten waren: EP990255: H2N-CSRKNTGTEETKQDDD-COOH (β_1 -Untereinheit, Mensch, AK 6889), EP990258: H2N-CKKVSYNIGTMFLRETSL-COOH (α_2 -Untereinheit, AK 6884). EP012493: H2N-FTPRSREELPPNFP-CONH2 + EP012494: H2N-CFQKKDVEDGNANFLGKASGID-COOH (α_1 -Untereinheit, Mensch, AK 1200). Die Antiseren gegen die α_2 -Untereinheit und die humane β_1 -Untereinheit wurden an dem jeweiligen spezifischen Peptid affinitätsaufgereinigt (Fa. Eurogentech). Die Bezeichnung der Antikörper erfolgte durch die Angabe der entsprechenden Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und die letzten vier Ziffern der Kennnummer des entsprechenden Kaninchens.

2.2.4.3. Western-Blot-Analyse

Für die Untersuchung der Proteinexpression wurde aus infizierten Sf9-Zellen eine cytosolische bzw. membranäre Fraktion präpariert und der Proteingehalt bestimmt. Zwischen 20 μ g und 60 μ g Gesamtprotein wurden im Immunoblot eingesetzt. Die Antikörper wurden in Verdünnungen zwischen 1:250 und 1:4000 verwendet. Die Spezifität der Antikörper wurde durch Peptidverdrängung mit dem für die Immunisierung verwendeten synthetischen Peptid in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml überprüft. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese (10 %iges Trenngel, 150 V) im Elektrophoresepuffer erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (1 h bei 250 mA in Transferpuffer). Nach einer Anfärbung der Proteine mittels Ponceau S Färbung erfolgte die Markierung des Proteinstandards mit einem Kugelschreiber direkt auf der Nitrocellulosemembran. Zur Entfernung der Färbelösung und zum Absättigen freier Proteinbindungsstellen auf der Membran erfolgte eine einstündige Inkubation in TBST-Puffer mit einem Anteil von 5 % Milchpulver (w/v) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST-Puffer (je 5 Minuten) folgte eine 90 minütige Inkubation des ersten Antikörpers in TBST-Puffer (0,5 % Milchpulver) bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten Waschphase von 3 x 5 Minuten erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem 1:4000 verdünnten, Peroxidase gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG Antikörper in TBST-Puffer (0,5 % Milchpulver) bei

Raumtemperatur. Nach nochmaligem Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran mit Hilfe des "ECL Western blotting detection Systems" der Fa. Amersham entwickelt.

2.2.5. Anreinigung rekombinanter Proteine aus Sf9-Zellen mittels FPLC

2.2.5.1. Herstellung der cytosolischen Fraktion

Für die Reinigung von NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase wurden Sf9-Zellen in Schüttelkultur vermehrt. Insgesamt wurden 1200 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von $1,2 \times 10^6$ Sf9-Zellen/ml mit dem, für die gewünschte MOI benötigten Volumen an Virus-Lösung versetzt und 74 Stunden bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher überführt und sedimentiert (4 °C, 2500 x g, 10 min). Die Überstände wurden verworfen und die Zellen in 120 ml FPLC-Puffer 1 (50 mM TEA/HCl, pH 8,0, 10 mM DTT und 1 mM Benzamidin) resuspendiert und mit 720 µl einer Protease-Inhibitor-Mischung versetzt. Diese Suspension wurde anschließend in einer sogenannten Zellaufschlussbombe (Parr®) bei 4 °C und 60 bar für eine Stunde unter Stickstoffbegasung inkubiert. Nach der einstündigen Äquilibrationsphase wurde der Druck schlagartig verringert, wodurch es zum Zellaufschluß kam. Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 800 x g für 2 min bei 4 °C (ohne Zentrifugenbremse) abgetrennt. Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, und die Membranen für 30 min bei 4 °C und mit 40000 x g von der cytosolischen Fraktion abgetrennt. Die Membranfraktion wurde anschließend verworfen.

2.2.5.2. Anreinigungsstufen

Alle Chromatographie-Schritte wurden mit einem FPLC-System der Fa. Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Beladung der Säulen mit proteinhaltigen Suspensionen, das Waschen der Säulen und die Elution von den Säulen wurden mittels der Absorption bei 280 nm in einer Durchflussküvette kontrolliert.

2.2.5.2.1. Anionenaustausch-Chromatographie mittels Q-Sepharose

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 quaternäre Ammonium-Gruppen des Trägermaterials und anschließendes Aufheben dieser Bindung durch kompetitives Verdrängen der Proteine durch Anionen anorganischer Salze. Die Anionenaustausch-Chromatographie wurde mit 20 ml Q-Sepharose Fast Flow in einer C 20/16 Säule mit dem Adapter AC 16 der Fa. Pharmacia Biotech durchgeführt. Als Puffersystem wurden FPLC-Puffer 1 und 2 verwendet. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Säule mit drei Säulenvolumina FPLC-Puffer 1 äquilibriert. Cytosolisches Protein wurde auf die äquilibrierte Q-Sepharose-Säule mit einer Flussrate von 1,5 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit FPLC-Puffer 1 bei einer Flussrate von 1,5 ml/min gewaschen, bis sich die Absorption nicht mehr veränderte. Hiernach

wurde die Säule mit einer Konzentration von 100 mM NaCl (90 % FPLC-Puffer 1, 10 % FPLC-Puffer 2) gewaschen, bis sich die Absorption nicht mehr veränderte. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten, wobei die NaCl-Konzentration über ein Volumen von 60 ml von 100 mM auf 1000 mM gesteigert wurde. Das Elutionsvolumen wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt und auf Guanylyl-Cyclase-Aktivität (siehe 2.2.3.) hin untersucht. Alle Fraktionen, in denen Guanylyl-Cyclase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend vereinigt.

2.2.5.2.2. Adsorptionschromatographie mittels Hydroxyapatit

Hydroxyapatit ist eine kristalline Form des Kalziumphosphats, das DNA und Proteine über die Interaktion mit deren Phosphatgruppen bindet. Diese Bindung kann durch eine Erhöhung der Phosphat-Konzentration im Puffersystem aufgehoben werden. Dieser zweite Chromatographie-Schritt wurde mit einer Keramik-Hydroxyapatit-Säule der Fa. Biorad (8 x 1,6 cm) durchgeführt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Säule mit drei Säulenvolumina FPLC-Puffer 3 äquilibriert. Die im ersten Chromatographie-Schritt vereinigten Fraktionen wurden unmittelbar auf die Hydroxyapatit-Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Als Puffersystem wurde FPLC-Puffer 3 und 4 verwendet. Anschließend wurde die Säule mit FPLC-Puffer 3 bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen bis sich die Absorption nicht mehr veränderte. Hiernach wurde die Säule mit einer Konzentration von 37 mM Kaliumphosphat (91 % FPLC-Puffer 3, 9 % FPLC-Puffer 4) gewaschen, bis sich die Absorption nicht mehr veränderte. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten, wobei die Kaliumphosphat-Konzentration über ein Volumen von 30 ml von 37 mM auf 400 mM gesteigert wurde. Das Elutionsvolumen wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt und auf Guanylyl-Cyclase-Aktivität (siehe 2.2.3.) hin untersucht. Alle Fraktionen, in denen Guanylyl-Cyclase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend vereinigt.

2.2.5.2.3. Gelfiltrationschromatographie mittels Superdex

Das Prinzip der Gelfiltration beruht darauf, dass native, globuläre Proteine aufgrund ihrer Zusammensetzung (Homomer, Dimer etc.) eine unterschiedliche Größe aufweisen. In der Gelfiltrationsmatrix wandern größere Proteine schneller, da sie schlechter mit den Poren der Matrix interagieren können als kleinere Proteine, so dass hierdurch eine Trennung von nativen Proteinen unterschiedlicher Größe erreicht wird. Dieser abschließende Chromatographie-Schritt wurde mit einer Superdex 200 Säule (60 x 16 cm) der Fa. Pharmacia Biotech durchgeführt. Vor Gebrauch wurde die Säule mit einem Säulenvolumen FPLC-Puffer 5 äquilibriert. Die im zweiten Chromatographie-Schritt vereinigten Fraktionen wurden unmittelbar auf die Gelfiltrationssäule mit einer Flussrate von 0,75 ml/min aufgetragen und eluiert. Aufgrund der Säulencharakteristika wurde lediglich FPLC-Puffer 5 verwendet. Im Anschluss an die Chromatographie wurden die Elutionsfraktionen (2 ml) auf Guanylyl-Cyclase-Aktivität hin untersucht (2.2.3.). Alle Fraktionen, in denen Guanylyl-Cyclase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend vereinigt.

2.2.5.2.4. Centricon-Verfahren

Die vereinigten Fraktionen, in denen Guanylyl-Cyclase-Aktivität zu messen war, wurden im Anschluss an die Gelfiltration aufkonzentriert. Dazu bedienten wir uns dem Centricon-Verfahren (Fa. Millipore). Hierzu wurde die Guanylyl-Cyclase-Lösung mittels Zentrifugation (20000 x g, 4 °C) durch eine Cellulosemembran filtriert, bis ein Endvolumen von etwa 200 µl erreicht war. Aufgrund der Porengröße der Membran, die nur einen Membrandurchgang von Proteinen mit einer molekularen Masse von weniger als 30 kDa erlaubt, wurde so der Guanylyl-Cyclase-Enzymkomplex aufkonzentriert, da dieser eine deutlich höhere Molekülmasse aufweist.

2.2.5.3. Untersuchung des angereinigten Proteins

Von dem Konzentrat wurden direkt nach dem letzten Zentrifugationsschritt des Centricon-Verfahrens 100 µl für eine photometrische Untersuchung eingesetzt. Hierbei wurde die Absorption der Protein-Lösung unter verschiedenen Versuchsbedingungen über einen Wellenlängenbereich von 350-550 nm detektiert. Nach der Messung wurden die hier eingesetzten 100 µl sowie die restlichen 100 µl Konzentrat mit 10 % Glycerol versetzt und bei -80 °C für spätere Untersuchungen eingefroren.

2.2.6. Statistische Auswertung

Der Student t-Test wurde verwendet, wenn lediglich zwei Gruppen auf signifikante Unterschiede in ihren Mittelwerten hin untersucht wurden. Für eine multivariante Untersuchung mehrerer Gruppen erfolgte eine Analyse mittels eines einseitigen ANOVA-Tests einschließlich eines Newman-Keuls-Nachfolgetests. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der β_2 -Untereinheit der Ratte

3.1.1. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 -Untereinheit der Ratte

Zehn Jahre nach der Klonierung der β_2 -Untereinheit aus Rattenniere (Yuen et al. 1990) konnte noch keine katalytische Aktivität dieser Untereinheit gezeigt werden. Ein Vergleich der kürzlich klonierten humanen β_2 -Untereinheit (Behrends und Vehse 2000) mit der β_1 -Untereinheit der Ratte zeigte, dass in einem Leserahmen Homologien zum aminoterminalen Abschnitt der β_1 -Untereinheit vorhanden sind. Hier fand sich ein „MYG“-Motiv, welches auch in β -Untereinheiten evolutionär weit entfernter Spezies wie der Fruchtfliege (*Drosophila*, Shah und Hyde 1995), des Tabakswärmers (*Manduca*, Nighorn et al. 1998, Nighorn et al. 1999) und des japanischen Knochenfisches Medaka (*Oryzias latipes*, Mikami et al. 1998, Mikami et al. 1999) konserviert ist. Dies warf die Frage auf, ob die β_2 -Untereinheit der Ratte ebenfalls ein solches Motiv beinhalten könnte und ob das Fehlen dieses Motives für die mangelnde enzymatische Aktivität der β_2 -Untereinheit verantwortlich sein könnte. Die von Yuen und Mitarbeitern veröffentlichte Sequenz ist im Vergleich zur β_1 -Untereinheit aminoterminal um 62 Aminosäuren verkürzt (Yuen et al. 1990). Im 5'-nichttranslatierten Bereich der veröffentlichten Sequenz existieren Homologien zur β_1 -Untereinheit und eine Konsensussequenz für eine Intron/Exon-Grenze. Daher vermutete Koesling, dass es sich bei der veröffentlichten Sequenz um eine unvollständige mRNA handelte (Koesling 1995). Koesling konnte im 5'-nichttranslatierten Bereich einen verlängerten Klon isolieren, der ein zusätzliches Exon einschließt. Dieser Klon weist starke Homologien zu der von Behrends und Vehse klonierten menschlichen β_2 -Untereinheit auf, allerdings fehlt bei diesem Klon in der abgeleiteten Aminosäuresequenz das Methionin des Startmotivs „MYG“. Ein anderes Methionin wurde von Koesling als Startcodon angenommen, so dass der erhaltene Klon im Vergleich zur β_1 -Untereinheit aminoterminal um neun Aminosäuren verlängert ist. Bei diesem Klon konnte ebenso wie bei dem von Yuen isolierten Klon keine Enzymaktivität festgestellt werden (Koesling 1995). Daher vermuteten wir, dass der von Koesling isolierte Klon ein weiter im 5'-Bereich liegendes Exon mit dem zwischen den Spezies hochkonservierten Startmethionin noch nicht einschließt. Mit Hilfe der RACE-PCR konnten wir innerhalb der Arbeitsgruppe eine neue Sequenz aus dem 5'-Bereich isolieren, die ein zuvor nicht identifiziertes Exon mit einem Startmethionin einschließt. Abbildung 5 zeigt die aus dieser cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz mit einem konservierten „MYG“-Motiv der β_2 -Untereinheit der Ratte im Vergleich zu Aminosäuresequenzen anderer β -Untereinheiten. Ebenso wie bei der β_2 -Untereinheit der Ratte liegt das „MYG“-Motiv der humanen β_2 -Untereinheit am Ende des ersten Exons. Dieses Muster findet sich ebenfalls bei der genomischen Sequenz der β_1 -Untereinheit der Fruchtfliege *Drosophila*, des Medaka-Fisches *Oryzias latipes* und auch der humanen β_1 -Sequenz.

rat β 2	MYGFINTCLQSLVTEKFGEE	TWEKLKASAEVQD--AFMTY	TVYDDIITIKLIQEACKVLD	VSMEAILKLFGEYFFKFCMK	78
hum β 2	MYGFINTCLQSLVIEKFGEE	TWEKLKTSAEVQD--AFMTY	TMYDDVITIKLIQEACNILG	VSMEAILKLFGEY-FQF* M	74/1
man β 3	MYGLLENMAEYIRQTYGEE	RWEDIRRQAGVEQP-SFSVH	QVYPENLITRLAKKAQEVLG	ITEREFMDQMGVYFVGFVSQ	80
rat β 1	MYGFVNHALELLVIRNYGPE	VWEDIKKEAQLDEEGQFLVR	IYDDSKTYDLVAAAASKVLN	LNAGEILQMFQKMFVFCQE	80
rat β 2	SGYDRMLRTLGGNLTEFIEN	LDALHSYLALSQEMNAPSF	RVEEGADG-AMLLHYYSDRH	GLCHIVPGIIEAVAKDFFDT	157
hum β 2	SGYDRMLRTLGGNLMEFIEN	LDALHSYLALSQEMNAPSF	RVERGADG-KMFLHYYSDRS	GLCHIVPGIIEAVAKDFFDI	80
man β 3	YGYDRVLSVLGRHMRDFLNG	LDNLHEYLKFSYPRMRAPSF	ICEN-ETRQGLTLHYRSKRR	GFVYYAMGQIREVARHFYHK	158
rat β 1	SGYDTILRLVLSNVREFLQN	LDALHDHLATIYPGMRAPSF	RCTDAEKGGKGLILHYYSERE	GLQDIVIGIITVAQQIHGT	160
rat β 2	DVAMSILDMNEEVERTGKKE	HVVFLVQKAHRQIRGAKAS	RPQGSSEDSQADQEQALQGTLL	RMKERYLNIPVCPGKESHST	237
hum β 2	DVIMDILDMNEEVERTGKKE	HVVFLIVQKAHRKMRKTKPK	RLQDSQGMERDQEQALQAAFL	KMKEKYLNVSACPVKKSHWD	160
man β 3	E--MRIELL-----REELLF	DTVHVTFQ-----	-----LTFDNRAFTLASL	AMTREEKHLP-----	202
rat β 1	EIDMKVIQQ-----RSEECD	HTQFLIEEKESK-----	-----EEDFYED-----	-----	194
rat β 2	AVRASVLFGKGPLRDTFQPV	YPERLWVEEEVFCDAFFPFI	VFDEALRVKQAGVNIQKYVP	GILTQKFALDEYFSIIHPQV	317
hum β 2	VVRSIVMFGKGHMNTFEPI	YPERLWIEEKFCAFFPFI	VFDESLQVKQARVNIQKYVP	GLQTQNIQLDEYFSIIHPQV	240
man β 3	-ISASVLF-----	-----EIFPFCI	VFGSDMVVRSIGNSLMVILP	DLVG--KKITNWFDLVRPLI	254
rat β 1	-----LDRFEEN	GTQDSRISPYTFCKAFFPFI	IFDRDLVVTTQCGNAIYRVLP	QLQPGKCSLLSVFSLVRPHI	261
rat β 2	TFNISSICKFINSQFVLKTR	KEMMP-KAR-----	----KSQPMLKLRGQMIWME	SLRCMIFMCSPNVRSLLQELE	381
hum β 2	TFNIFSIIRRFINSQFVLKTR	REMMP-VAW-----	----QSRTTLKLGQMIWME	SMWCMVYLCSPKLRSLLQELE	304
man β 3	AFKFQTIILNRTNNIFELVTV	EAVMHEKAPDKRNELLRLSD	ETDGTTEKNLRLKGQMIYMD	NWRMMMYLGTVPMPDLSALV	334
rat β 1	DISFHGILSHINTVFLRSK	EGLLDVEKLE-----CED	ELTGAEISCLRRLKGQMIYLP	EADSIIFLCSPSVMNLDLDT	334
rat β 2	ESKMHLSDIAPHDTTRDLIL	LNQQLAEEMELSCQLEKKK-	EELRVLSNHLAIEKKKTETL	LYAMPLPEHVNQLKEGRK--	458
hum β 2	ELNMHLSDIAPNDTTRDLIL	LNQQLAEIELSNQLERKK-	EELQVLSKHLAIEKKKTETL	LYAMPLPKHVNQLREGKK--	381
man β 3	STGLYINDLSMHDFSRLDML	AGTQQSVELKLALDQEQQKS	KKLEESMRKLDDEEMKRTDEL	LYQMIPKQVADRNRNGENPI	414
rat β 1	RRGLYLSDIPLHDATRDVLV	LGEQFREEYKLTQELEILT-	DRLQLTLRALDEKKTDTL	LYSVLPSPSVANELRHKRP--	411
rat β 2	VAAGEFETCTILFSDVVFTT	NICAACEP----IQIVNMLN	SMYSKFDRLTSVHD---VYK	VETIGDAYMVVGGVPPVPE	531
hum β 2	VAAGEFKSCTILFSDVVFTT	NICTACEP----IQIVNVLN	SMYSKFDRLTSVHA---VYK	VETIGDAYMVVGGVPPVIGN	454
man β 3	DTCMFDSVLSILFSDVVFTT	EICSRITP----MEVVSMLN	AMYSIFDTLTERNR---VYK	VETIGDAYMVVSGAPEKEDN	487
rat β 1	VPAKRYDNVTILFSGIVGFN	AFCSKHASGEGAMKIVNLLN	DLYTRFDTLTDSRKNPFVYK	VETVGDQKYMVTSGLPEPCIH	491
rat β 2	HAQRVANFALGMRISAKEVM	NPVTGEP IQIRVGIHTGPVL	AGVVGDKMPRYCLFGDVTNT	ASRMESHGLPSKVHLSPTAH	611
hum β 2	HAQRVANFALGMRISAKEVT	NPVTGEP IQLRVGIHTGPVL	ADVVGDKMPRYCLFGDVTNT	ASRMESHGLPNKVHLSPTAY	534
man β 3	HAEKVCDMALDMVDAITDLK	DPSTGSHLSIRVGVHSGAVV	AGIVGLKMPRYCLFGDSVNT	ASRMESTSEAMRIHISQTTQ	567
rat β 1	HARSICHLALDMMEIAGVQQ	--VDGESVQITIGIHTGEVV	TGVIGQRMPRYCLFGNTVNL	TSRTETTGEKGRKINVSEYTY	569
rat β 2	RALK-----NKGFEIVRRGE	IEVKGKGR-MTTYFLIQNLN	ATEDEIMGRPSAPADGKEVC	TPGNQVRKSPAVPRNTDHQQ	685
hum β 2	RALK-----NQGFKIIERGE	IEVKGKGR-MTTYFLIQNLN	ATEDEIMGRSKTPVDHKGST	QKASLPTTKLQGSVQPSCPE	608
man β 3	ELLS-----PSYMTVERGE	IQVKGKGAMKTYWLEGRESR	PSLTKMI SPQLQPGTELEWE	RAADVRSIAEHSAAQQLNNK	641
rat β 1	RCLMSPENSDDQFHLEHRGP	VSMKGGKKEPMQVWFLSRKNT	GTEETNQDEN*		619
rat β 2	QVYKGPADASN ⁶¹ VTLAGSP	VAGRNSTDAVNNQSPDETQ	TSVVASGPVLSAF ⁶¹ VVL*		742
hum β 2	HSSLASWLL*				617
man β 3	EIMNQHLPNVSNPPTSLVN	SSGNLMALQVQSTTVRNSQM	AVTSPLEERMYSPTVTFQDV	ARRSIANSPNRAERERESRS	721
man β 3	NSTSVAAVWTDAESIDPPRT	ADSLNSSVCYSSTSPCRVGT	APAPKDRNNDSSFLETLATA	SCGWPPSESCVDLLIGCEQC	801
man β 3	TRMSPTHSAPAAVADTYAAL	RPDTASTGPRHSGDEIETDT	EYQDANMEMNQAHTCENSND	HPKQKGVGRFRARIAPGYHK	881
man β 3	NCNHKQMSKDSIKDKQIPGG	NVQPHGHHHTKNNHHQCCG	AFGNPHVRHKTSNSSCRLI*		940

Abbildung 5: Aminosäurevergleich der isolierten β_2 -Untereinheit der Ratte mit der humanen β_2 -Untereinheit, der β_3 -Untereinheit aus *Manduca sexta* und der β_1 -Untereinheit der Ratte. Identische Aminosäuren mit der β_2 -Untereinheit der Ratte sind grau unterlegt. Die Sequenz der β_2 -Untereinheit der Ratte ab Aminosäure 61 (unterstrichen) ist identisch mit der cDNA, die in anderen Expressionsstudien verwendet wurde (Gupta et al. 1997). Die humane β_2 -Untereinheit zeigt zwei verschiedene Leseraster (siehe Behrends und Vehse 2000; *, Stopcodon). Durch Punktmutation veränderte Aminosäuren sind eingerahmt.

Ein Aminosäurevergleich der neuen β_2 -Variante der Ratte zeigte eine Aminosäureähnlichkeit von 78 % im Vergleich zur Sequenz der menschlichen β_2 -Untereinheit. Auffällig ist bei dem Sequenzvergleich zwischen diesen beiden Untereinheiten, dass die humane β_2 -Untereinheit carboxyterminal verkürzt vorliegt (Abb. 5). Die carboxyterminale Verkürzung in der humanen Sequenz führt zu einem Fehlen einer potentiellen Isoprenylierungssequenz, welche in der Sequenz der β_2 -Untereinheit der Ratte als „CVVL“-Motiv zu finden ist. Eine solche Sequenz findet sich u.a. bei allen ras-Proteinen und ist dort ein Erkennungssignal, welches eine Isoprenylierung dieser Proteine zur Folge hat (Hancock et al. 1989).

3.1.2. Enzymaktivitätsuntersuchungen an der neuen β_2 -Variante der Ratte

3.1.2.1. Untersuchungen an β_2

Zunächst wurden Sf9-Zellen mit der α_1 - und der β_1 -Untereinheit koinfiziert (Abb. 6). Hierbei ergab sich eine basale cGMP Produktion von 1156 ± 134 pmol cGMP / min x mg (n = 3), die erheblich über den Kontrollwerten lag. Die Spezifität der cGMP-Produktion wurde überprüft, indem DEA/NO oder zusätzlich der NO-unabhängige Modulator YC-1 hinzugegeben wurden (Friebe et al. 1996, Mülsch et al. 1996).

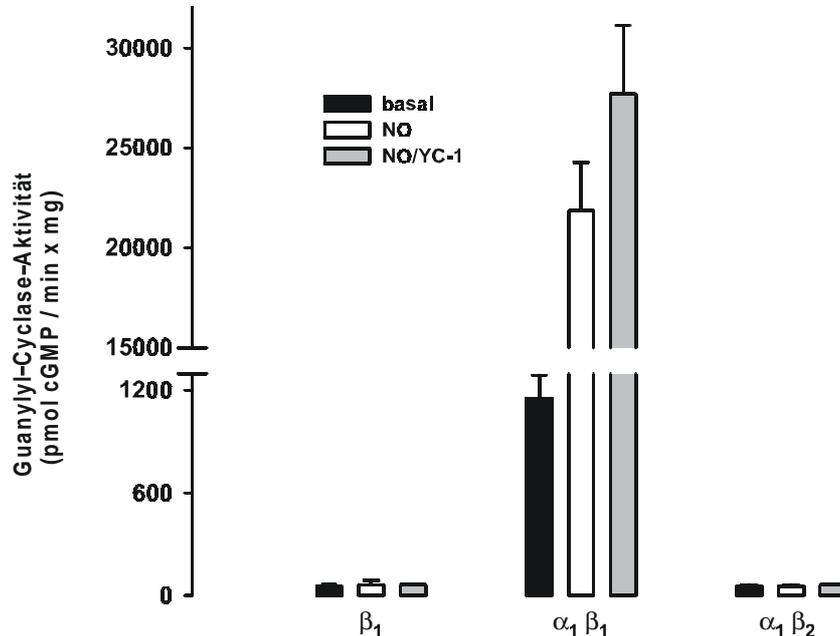


Abbildung 6: Guanylyl-Cyclase-Aktivität in cytosolischen Fraktionen aus infizierten Sf9-Zellen. Die cytosolischen Fraktionen wurden unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO (weiße Säulen) oder in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO und 100 μ M YC-1 (graue Säulen) untersucht. Die Messungen wurden in Gegenwart von 3 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

In Gegenwart von DEA/NO konnte eine deutliche Zunahme der Guanylyl-Cyclase-Aktivität auf 21843 ± 2432 pmol cGMP / min x mg ($n = 3$) gemessen werden. Diese wurde in der zusätzlichen Gegenwart von YC-1 noch weiter gesteigert. In Übereinstimmung mit publizierten Daten wurden diese Enzymaktivitäten nur bei Koexpression der α_1 - und der β_1 -Untereinheit erhalten (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991). Die alleinige Expression der β_1 -Untereinheit diente daher als Negativkontrolle. Eine Koexpression der hier beschriebenen β_2 -Untereinheit, die das konservierte Startsequenzmotiv „MYG“ aufweist, mit der α_1 -Untereinheit zeigte in Anwesenheit von Magnesiumionen als divalentem Kation keine Enzymaktivität (Abb. 6). Die gemessene cGMP-Produktion im Cytosol aus Sf9-Zellen entsprach der beschriebenen Negativkontrolle. Die basale cGMP-Produktion, die durch Zugabe von DEA/NO bzw. YC-1 nicht weiter gesteigert wurde, kann auf eine schwache endogene Guanylyl-Cyclase-Aktivität der Sf9-Zellen zurückgeführt werden.

Während der Durchführung dieser Experimente wurde die Klonierung der sogenannten β_3 -Untereinheit bei dem Insekt *Manduca sexta* veröffentlicht, die in Abwesenheit einer weiteren Untereinheit nur in Anwesenheit von 4 mM $MnCl_2$ Enzymaktivität aufwies (Nighorn et al. 1999). Der Aminosäurevergleich zwischen der β_2 -Untereinheit der Ratte wies in der katalytischen Domäne (Aminosäuren 454-596 der β_2 -Untereinheit der Ratte) die höchste Homologie mit dieser β_3 -Untereinheit auf (Abb. 5).

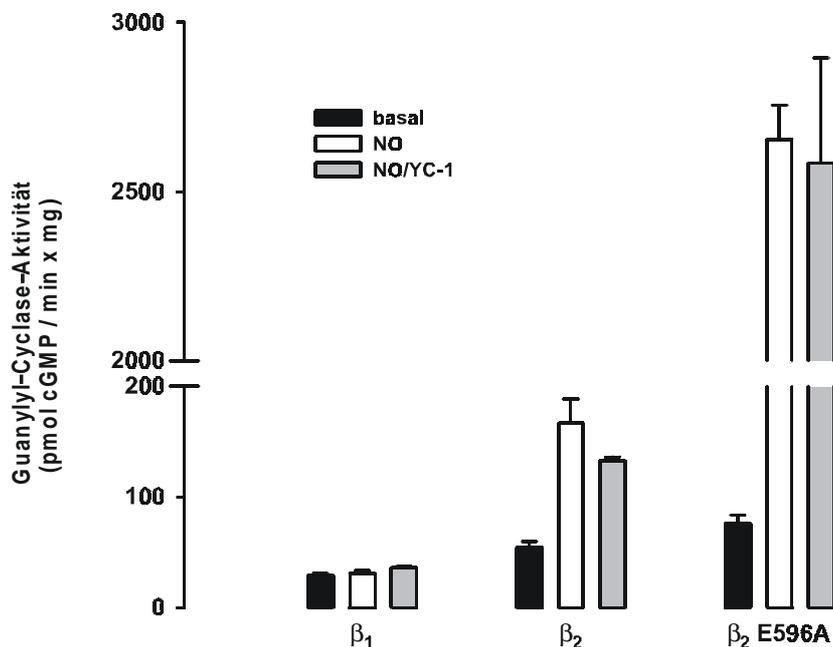


Abbildung 7: Guanylyl-Cyclase-Aktivität in cytosolischen Fraktionen aus infizierten Sf9-Zellen. Die cytosolischen Fraktionen wurden unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO (weiße Säulen) oder in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO und 100 μ M YC-1 (graue Säulen) untersucht. Die Messungen wurden in Gegenwart von 3 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Um zu untersuchen, ob die Sequenzhomologie zwischen diesen beiden β -Untereinheiten in der katalytischen Domäne auch ein ähnliches Verhalten auf biochemischer Ebene zeigt, wurde die β_2 -Untereinheit der Ratte in Abwesenheit einer weiteren Guanylyl-Cyclase-Untereinheit in Gegenwart von Mangan als divalentem Kation untersucht (Abb. 7). Zur Kontrolle wurden die Sf9-Zellen wiederum nur mit der β_1 -Untereinheit infiziert. Unter basalen Bedingungen konnte eine signifikant höhere cGMP-Produktion nach Infektion der Sf9-Zellen mit der β_2 -Untereinheit ($46,65 \pm 2,93$ pmol cGMP / min x mg; n = 9) im Vergleich zur Kontrolle ($23,66 \pm 3,43$ pmol cGMP / min x mg; n = 7) ermittelt werden. Die Zugabe des NO-Donors DEA/NO führte zu einer signifikanten Erhöhung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Cytosol von β_2 infizierten Sf9-Zellen auf $151,54 \pm 20,67$ pmol cGMP / min x mg (n = 15), nicht hingegen in der cytosolischen Fraktion von β_1 infizierten Zellen ($32,16 \pm 2,73$ pmol cGMP / min x mg; n = 7). Die zusätzliche Gabe von YC-1 führte nicht zu einem weiteren Anstieg in der Guanylyl-Cyclase-Aktivität ($128,46 \pm 3,56$ pmol cGMP / min x mg; n = 6).

3.1.2.2. Untersuchungen an β_2 E596A

Die Mutagenese eines Glutamatrestes innerhalb der katalytischen Domäne der homomeren, membrangebundenen Guanylyl-Cyclase A führt zu einem konstitutiv aktiven Enzym, welches nicht mehr durch seinen natürlichen Liganden ANP reguliert werden kann (Wedel et al. 1997). Diese Veränderung im katalytischen Zentrum wurde von uns auch an der β_2 -Untereinheit durchgeführt. Die resultierende Punktmutante wurde mit β_2 E596A bezeichnet (Abb. 7). Die Mutation dieser einzelnen Aminosäure führte zu einem Enzym, das in der Gegenwart von DEA/NO eine 32-fache Steigerung in der cGMP-Produktion zeigte (von $83,51 \pm 11,13$ auf 2655 ± 100 pmol cGMP / min x mg; n = 7). Die Mutagenese des Glutamatrestes schien zunächst keine signifikante Veränderung in der basalen Guanylyl-Cyclase-Aktivität hervorzurufen ($46,65 \pm 2,93$ pmol cGMP / min x mg für β_2 zu $83,51 \pm 11,13$ pmol cGMP / min x mg für β_2 E596A; n = 9 bzw. n = 7). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für den nichtmutierten Enzymkomplex der β_2 -Untereinheit konnte auch hier keine Aktivitätszunahme in der zusätzlichen Gegenwart von YC-1 detektiert werden.

3.1.2.3. Substratabhängigkeit der beiden β_2 -Varianten

Zur weiteren Charakterisierung der beiden β_2 -Untereinheiten, β_2 und β_2 E596A, wurden die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der angebotenen Substratkonzentration untersucht. Abbildung 8 zeigt die Enzymaktivität in Abhängigkeit der GTP-Konzentration unter basalen Bedingungen in einem Lineweaver-Burk-Diagramm für beide β_2 -Varianten (Abb. 8A: β_2 und Abb. 8B: β_2 E596A). Durch die Mutation des Glutamatrestes im katalytischen Zentrum kam es zu einer deutlichen Verminderung der Substrataffinität im Vergleich mit der nichtmutierten β_2 -Untereinheit, die sich als signifikante Erhöhung im K_m -Wert zeigte (Tab. 1). Dieser Effekt konnte sowohl unter basalen als auch unter DEA/NO-stimulierten Bedingungen beobachtet werden. Ein Vergleich der V_{max} -Werte

zeigte, dass die Enzymaktivität von β_2 E596A unter basalen Bedingungen deutlich höher war als von β_2 . Dies steht im scheinbaren Gegensatz zu den Daten aus Abbildung 7, allerdings wurde dort eine Substrat-Konzentration von 500 μ M GTP gewählt. Durch die Untersuchung der Enzymkinetik konnte aber ermittelt werden, dass die Substratsättigung der β_2 E596A-Mutante erst bei einer GTP-Konzentration von $1626 \pm 93 \mu$ M GTP erreicht ist (Tab. I; n = 3).

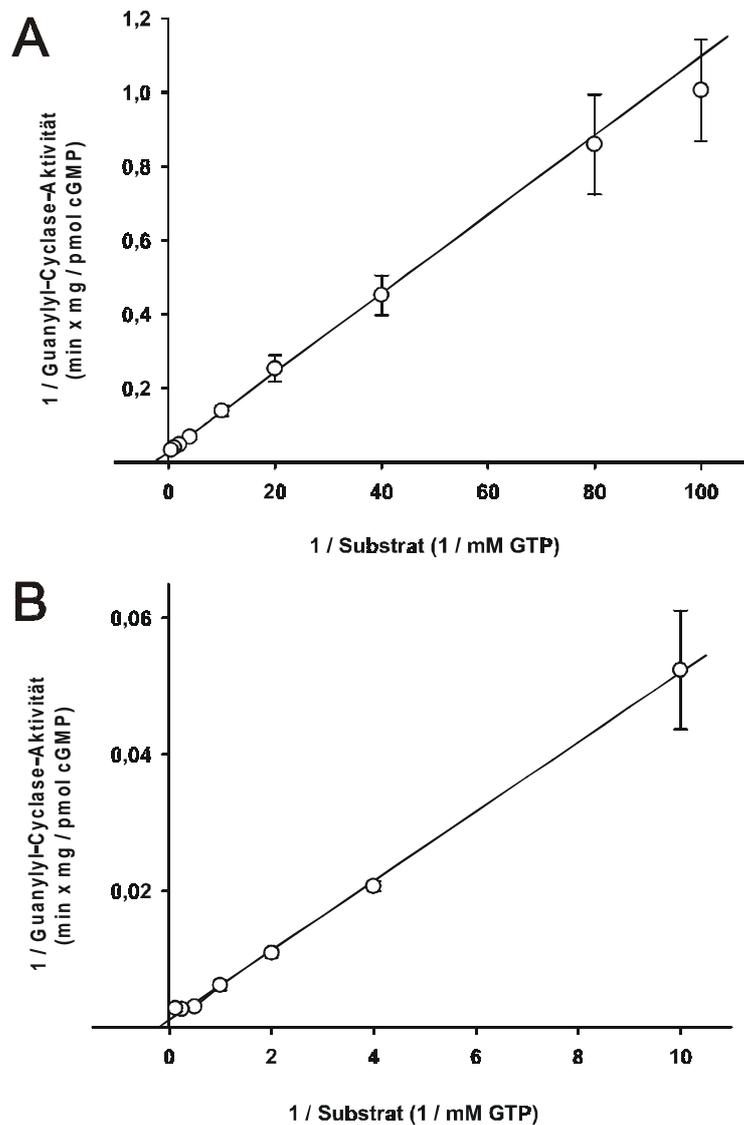


Abbildung 8: Basale Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Zur Ermittlung der K_m - und V_{max} -Werte wurde die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk gewählt. Die Abbildung zeigt die Substratabhängigkeit für β_2 (A) und für β_2 E596A (B) in Anwesenheit einer freien Mn^{2+} -Konzentration von 4 mM. Es wurden GTP-Konzentrationen zwischen 0,01 und 8 mM eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Unter NO-stimulierten Bedingungen erhöhte sich bei beiden β_2 -Varianten die Substrataffinität, was sich in verringerten K_m -Werten ausdrückt. So führte die Gabe von 100 μM DEA/NO zu einer 3-fachen Reduzierung des K_m -Wertes bei β_2 (von 375 ± 33 auf 136 ± 16 μM GTP; $n = 3$) und einer 5-fachen Reduzierung bei $\beta_2\text{E596A}$ (von 1626 ± 93 auf 341 ± 46 μM GTP; $n = 3$). Die V_{max} -Werte erhöhten sich von 36 ± 2 auf 144 ± 29 $\text{pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für β_2 (4-fach; $n = 3$) und von 515 ± 59 auf 4750 ± 659 $\text{pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\beta_2\text{E596A}$ (9-fach; $n = 3$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von DEA/NO die Affinität der β_2 -Varianten zu ihrem Substrat deutlich erhöht.

K _m -Werte		
Untereinheiten	μM GTP	
	basal	+DEA/NO
β_2	375 ± 33	136 ± 16
$\beta_2\text{E596A}$	1626 ± 93	341 ± 46
V _{max} -Werte		
Untereinheiten	$\text{pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$	
	basal	+DEA/NO
β_2	36 ± 2	144 ± 29
$\beta_2\text{E596A}$	515 ± 59	4750 ± 659

Tabelle 1: K_m - und V_{max} -Werte von β_2 und $\beta_2\text{E596A}$ unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen in der Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 100 μM DEA/NO (+DEA/NO). Die Messungen wurden in der Gegenwart von 4 mM Mn^{2+} durchgeführt.

3.1.2.4. Einfluss von Aktivatoren und Inhibitoren der löslichen Guanylyl-Cyclase auf die β_2 -Enzymaktivität

3.1.2.4.1. Konzentrationsabhängige Aktivierung durch DEA/NO

Um einen direkten Vergleich der EC_{50} -Werte zwischen β_2 und $\beta_2\text{E596A}$ zu erhalten, wurden die ermittelten Ergebnisse als relative Werte dargestellt (Abb. 9; $n = 3$). Maximale Enzymaktivitäten wurden als 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu ausgedrückt. Beide β_2 -Varianten zeigten eine deutliche, konzentrationsabhängige Aktivierung durch DEA/NO. Für β_2 bzw. $\beta_2\text{E596A}$ ergaben sich maximale Aktivitäten von 158 ± 21 bzw. 2442 ± 233 $\text{pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$. Die ermittelten EC_{50} -Werte beider Konzentrations-Wirkungskurven unterschieden sich nicht signifikant voneinander (34 ± 9 nM DEA/NO für β_2 und 43 ± 5 nM DEA/NO für $\beta_2\text{E596A}$). Um diese Ergebnisse mit der α_1/β_1 -Isoform zu vergleichen, wurde auch für dieses Heterodimer eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt. Es ergab sich eine maximale Enzymaktivität von

21843 ± 2432 pmol cGMP / min x mg. Ein direkter Vergleich der EC₅₀-Werte zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden β₂-Varianten und α₁/β₁. So war der EC₅₀-Wert für α₁/β₁ mit 414 ± 68 nM DEA/NO um eine Größenordnung nach rechts verschoben, d.h. beide β₂-Varianten wiesen unter diesen Versuchsbedingungen eine höhere Affinität zu NO auf als α₁/β₁.

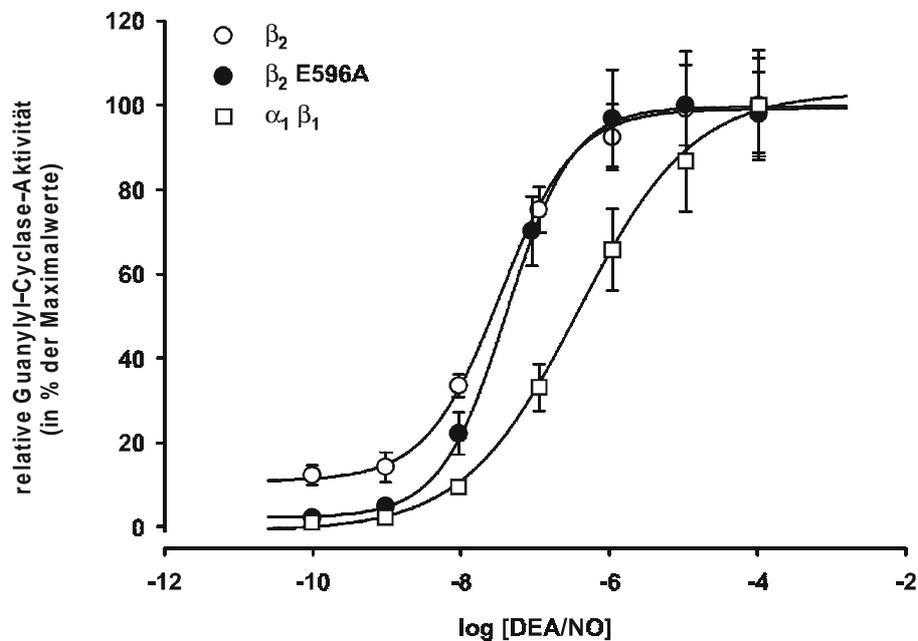


Abbildung 9: Einfluss steigender DEA/NO-Konzentrationen (von 0,1 nM bis 100 μM) auf die Enzymaktivität verschiedener Guanylyl-Cyclase-Isoformen. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Isoformen untereinander in einer Abbildung wurden die Enzymaktivitäten als prozentuale Werte der maximalen cGMP-Produktion dargestellt. Die Kurven zeigen die enzymatischen Aktivitäten von β₂ (offene Kreise), β₂E596A (geschlossene Kreise) und α₁/β₁ (offene Quadrate). Die Messungen wurden in Gegenwart von 4 mM Mn²⁺ durchgeführt. Alle Werte stellen Mittelwerte (± S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen dar.

3.1.2.4.2. Konzentrationsabhängige Inhibition durch ODQ

Der Einfluss des gut charakterisierten Inhibitors der löslichen Guanylyl Cyclase, ODQ (Garthwaite et al. 1995), wurde unter NO-stimulierten Bedingungen getestet. Zur Kontrolle wurde die cytosolische Fraktion von α₁/β₁ infizierten Sf9-Zellen eingesetzt (Abb. 10; n = 3). Auch hier wurden zur besseren direkten Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Guanylyl-Cyclase-Isoformen relative Werte dargestellt. Die maximal ermittelte Enzymaktivität wurde als 100 % gesetzt und alle anderen Ergebnisse daran angeglichen. Für α₁/β₁ ergab sich eine maximale Enzymaktivität von 50838 ± 2663 pmol cGMP / min x mg, welche durch steigende ODQ-Konzentrationen signifikant verringert werden konnte. Der IC₅₀-Wert für α₁/β₁ konnte mit 5,3 ± 1,2 μM ODQ berechnet werden. Ein inhibitorischer Effekt durch ODQ war auch in den cytosolischen Fraktionen von β₂ bzw. β₂E596A infizierten Sf9-Zellen deutlich nachweisbar. Die maximalen Enzymaktivitäten von 139 ± 32 pmol cGMP / min x mg für β₂ bzw. 2710 ± 361 pmol cGMP / min x mg für β₂E596A konnten durch steigende ODQ-Konzentrationen signifikant vermindert werden. Die hieraus

resultierenden IC_{50} -Werte ($2,4 \pm 1,0 \mu\text{M ODQ}$ für β_2 und $2,5 \pm 0,4 \mu\text{M ODQ}$ für $\beta_2\text{E596A}$) waren weder untereinander, noch im Vergleich zu dem IC_{50} -Wert für α_1/β_1 signifikant verschieden.

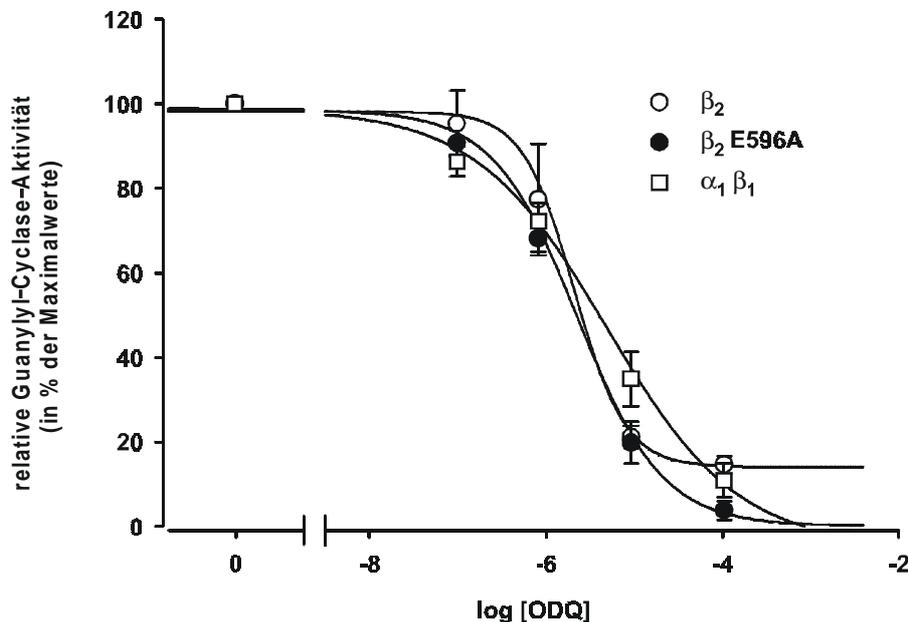


Abbildung 10: Einfluss steigender ODQ-Konzentrationen auf die Enzymaktivität verschiedener Guanylyl-Cyclase-Isoformen. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Isoformen untereinander in einer Abbildung wurden die Enzymaktivitäten als prozentuale Werte der maximalen cGMP-Produktion dargestellt. Die Kurven zeigen die enzymatischen Aktivitäten von β_2 (offene Kreise), $\beta_2\text{E596A}$ (geschlossene Kreise) und α_1/β_1 (offene Quadrate) in Anwesenheit von $1 \mu\text{M DEA/NO}$. Die Messungen wurden in Gegenwart von 4 mM Mn^{2+} durchgeführt. Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen dar.

3.1.2.4.3. Einfluss von Tween 20 und Protoporphyrin IX

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine Inkubation von α/β -Isoformen der löslichen Guanylyl-Cyclase mit dem Detergenz Tween 20 zu einem Verlust der Häm-Gruppe führt, und damit die NO-Sensitivität aufgehoben wird (Foerster et al. 1996). Um zu untersuchen, ob auch die beiden β_2 -Varianten eine prosthetische Hämgruppe binden, wurde die cGMP-Produktion von β_2 und $\beta_2\text{E596A}$ in Anwesenheit von 1 % Tween 20 untersucht (Abb. 11, A und B). Die Enzymaktivität wurde sowohl unter basalen Bedingungen als auch in Anwesenheit von $100 \mu\text{M DEA/NO}$ gemessen. Die Zugabe von 1 % Tween 20 verringerte die basale Enzymaktivität bei beiden β_2 -Varianten, allerdings nicht in signifikantem Ausmaß. Die Kombination von Tween 20 und $100 \mu\text{M Protoporphyrin IX}$ unter basalen Bedingungen führte zu einer Zunahme der cGMP-Produktion für β_2 (von $46,65 \pm 6,20$ auf $61,69 \pm 7,03 \text{ pmol cGMP / min x mg}$; Abb. 11A; $n = 8$ bzw. $n = 5$) und einer signifikanten Erhöhung der Enzymaktivität bei $\beta_2\text{E596A}$ (von $63,06 \pm 3,92$ auf $269,22 \pm 16,50 \text{ pmol cGMP / min x mg}$; Abb. 11B; $n = 3$). Deutlichere Effekte wurden in Anwesenheit von $100 \mu\text{M DEA/NO}$ beobachtet. Die Zugabe von 1 % Tween 20 führte hier bei beiden β_2 -Varianten zu einer signifikanten Verringerung in der Enzymaktivität. Tween 20 reduzierte die NO-stimulierte cGMP-Produktion bei β_2 von $151,54 \pm 23,31$ auf $36,51 \pm 4,50 \text{ pmol cGMP / min x mg}$ (Abb. 11 A; $n = 15$ bzw. $n = 3$) und bei $\beta_2\text{E596A}$ von $1911,39 \pm 86,04$ auf

71,45 ± 4,82 pmol cGMP / min x mg (Abb. 11 B; n = 3). Eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität konnte durch die zusätzliche Inkubation mit 100 µM Protoporphyrin IX erreicht werden (Abb. 11, A und B)

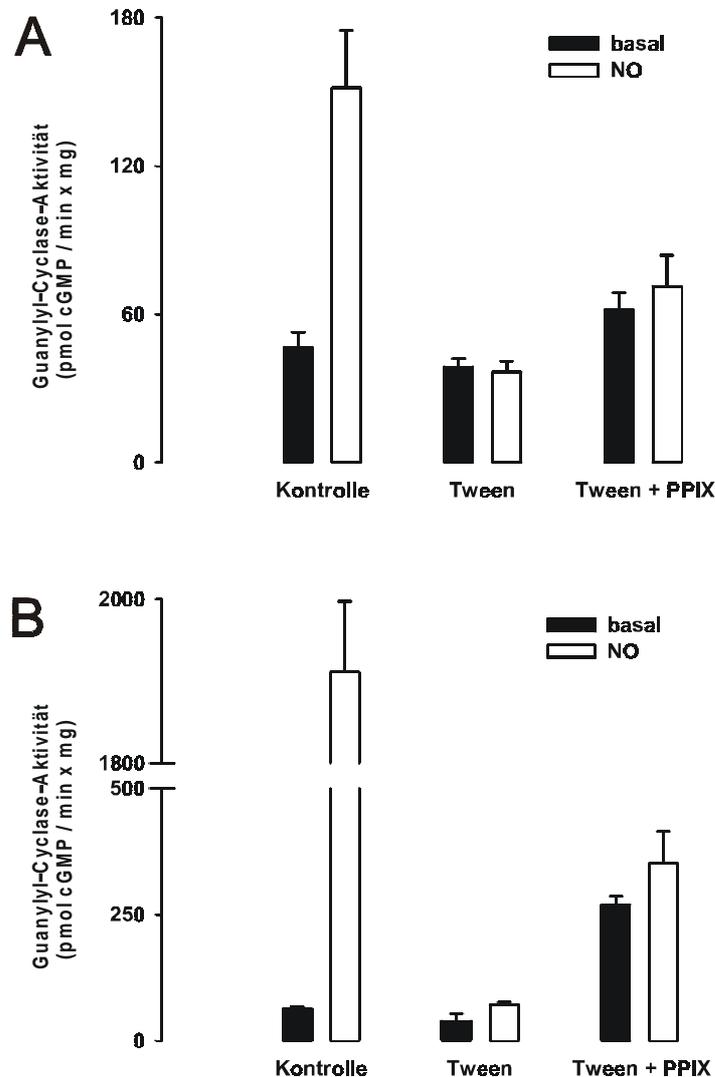


Abbildung 11: Einfluss von Tween 20 und Protoporphyrin IX (PPIX) auf die Guanylyl-Cyclase-Aktivität in der cytosolischen Fraktion von β_2 (A) oder β_2E596A (B) infizierten Sf9-Zellen. Die cytosolischen Fraktionen wurden in Abwesenheit (schwarze Säulen) oder in Anwesenheit von 100 µM DEA/NO (weiße Säulen) auf ihre Enzymaktivität hin untersucht. Tween wurde in einer Konzentration von 1 % (v/v) und PPIX in einer Konzentration 100 µM eingesetzt. Die Messungen wurden in Gegenwart von 4 mM Mn^{2+} durchgeführt. Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar.

Die verminderte Aktivierung der β_2 -Varianten durch Protoporphyrin IX im Vergleich zu DEA/NO zeigte, dass Protoporphyrin IX ein weniger effektiver Aktivator der Guanylyl-Cyclase-Isoformen ist als DEA/NO (Ignarro et al. 1984). Die Anwesenheit von Tween 20 führte in diesen Versuchen zu einem Verlust der NO-Sensitivität bei beiden β_2 -Varianten. Die durch Protoporphyrin IX stimulierte cGMP-Produktion konnte durch Tween 20 nicht inhibiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von Tween 20 mit dem Verlust einer möglichen Häm-Gruppe in

Einklang zu bringen ist, wie dies für die bisher bekannten Isoformen der löslichen Guanylyl-Cyclase beschrieben ist (Foerster et al. 1996).

3.1.2.5. Untersuchungen verschiedener β_2 -Mutanten

Die carboxyterminale Aminosäuresequenz der β_2 -Untereinheit der Ratte (CVVL) weist auf eine mögliche Isoprenylierung dieser Untereinheit hin. Wir untersuchten, ob die An- oder Abwesenheit dieser Isoprenylierungssequenz eine Veränderung in der Verteilung der enzymatischen Aktivität zwischen cytosolischer und membranärer Fraktion infizierter Sf9-Zellen zur Folge hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden Mutanten hergestellt. Dabei wurden eine carboxyterminale Deletionsmutante ($\beta_2\Delta C_{45}$) und eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch (β_2C739S), wie im Methodenteil beschrieben, erzeugt. Der Aminosäureaustausch in β_2C739S führt zu einem Verlust der potentiellen Isoprenylierungssequenz, da der Serinrest eine entscheidende Voraussetzung für eine Isoprenylierung ist (Zhang und Casey 1996).

Ein Vergleich der Enzymaktivität von $\beta_2\Delta C_{45}$ und β_2C739S mit β_2 und $\beta_2 E596A$ in Anwesenheit von 4 mM Mn^{2+} zeigte, dass beide Varianten basale und NO-stimulierbare Enzymaktivität aufwiesen (Abb. 12A). In der cytosolischen Fraktion ergab sich für β_2C739S eine basale cGMP Produktion von $49,49 \pm 4,35$ pmol cGMP / min x mg (n = 11), welche durch die Zugabe von 100 μ M DEA/NO auf $442,26 \pm 34,80$ pmol cGMP / min x mg (n = 9) gesteigert werden konnte. Damit war die NO-stimulierte Enzymaktivität signifikant höher als bei β_2 ($151,54 \pm 23,31$ pmol cGMP / min x mg; n = 15) aber niedriger als bei β_2E596A ($2655,40 \pm 198,67$ pmol cGMP / min x mg; n = 12). Ein vergleichbares Resultat wurde für $\beta_2\Delta C_{45}$ erhalten (Abb. 12A). Die Messungen der enzymatischen Aktivitäten aller vier β_2 -Varianten in der membranären Fraktion unter 4 mM Mn^{2+} zeigten, dass das Verhältnis der Enzymaktivität zwischen Cytosol- und Membranfraktion etwa 1:1 betrug (Abb. 12A). Durch die Eliminierung der Isoprenylierungssequenz konnte also keine Veränderung der enzymatischen Aktivitätsverteilung in der Gegenwart von 4 mM Mn^{2+} erreicht werden.

Die Messungen aller vier Varianten in der Gegenwart von 3 mM Mg^{2+} zeigte, dass für β_2 und β_2E596A weder in der cytosolischen noch in der membranären Fraktion Enzymaktivität nachzuweisen war (Abb. 12B). Im Gegensatz dazu ließen sich für β_2C739S und $\beta_2\Delta C_{45}$ unter diesen Bedingungen Enzymaktivitäten nachweisen, die durch 100 μ M DEA/NO signifikant gesteigert wurden (von $40,20 \pm 37,56$ auf $276,31 \pm 47,48$ pmol cGMP / min x mg für β_2C739S ; n = 11 bzw. n = 4, und von $54,55 \pm 31,69$ auf $274,21 \pm 36,71$ pmol cGMP / min x mg für $\beta_2\Delta C_{45}$; n = 9 bzw. n = 4). Die Enzymaktivität dieser beiden Varianten fand sich nahezu ausschließlich in der cytosolischen Fraktion (Abb. 12B).

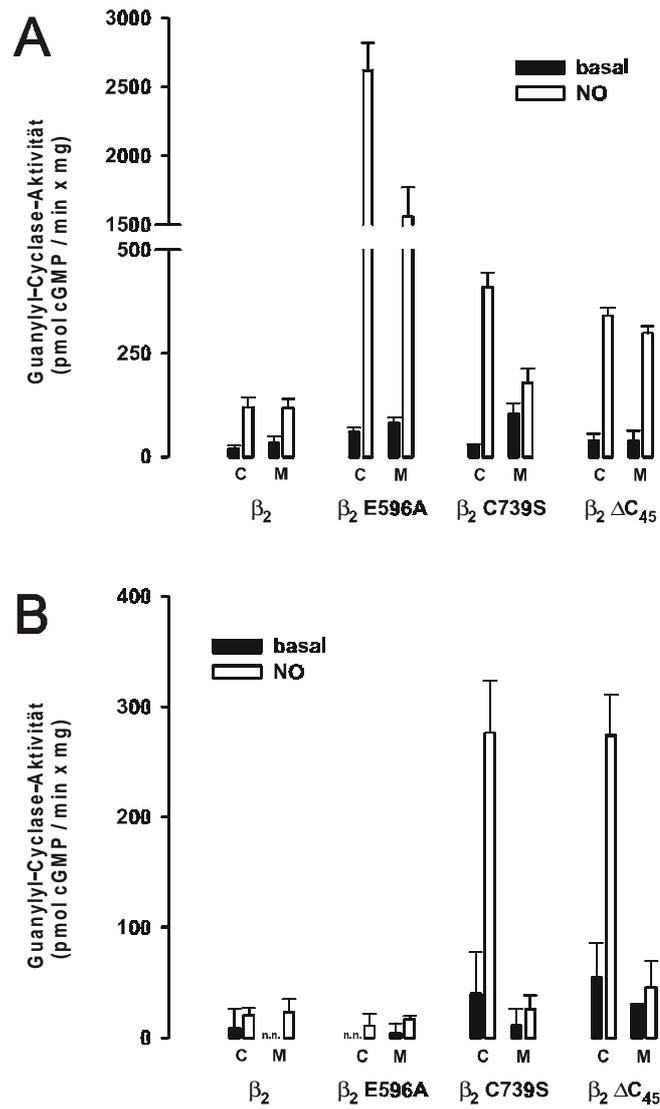


Abbildung 12: Guanylyl-Cyclase-Aktivität in cytosolischen (C) und membranären (M) Fraktionen von β_2 , β_2 E596A, β_2 C739S oder $\beta_2\Delta C_{45}$ infizierten Sf9-Zellen. Die einzelnen Fraktionen wurden entweder in Gegenwart von 4 mM Mn^{2+} (A) oder 3 mM Mg^{2+} (B) untersucht. Die schwarzen Säulen repräsentieren Basalbedingungen, wohingegen die weißen Säulen den Einfluss von 100 μ M DEA/NO zeigen (n.n.: nicht nachweisbar). Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens vier unabhängigen Versuchen dar.

3.2. Charakterisierung der α_2 -Untereinheit der Ratte

3.2.1. Klonierung und Sequenzanalyse der α_2 -Untereinheit der Ratte

Nach der Identifikation der cDNAs der α_1 - und β_1 -Untereinheit konnte, neben der cDNA der β_2 -Untereinheit, die cDNA der α_2 -Untereinheit aus einer Genbibliothek aus fetalem, menschlichen Gehirn isoliert werden. Koexpressionsexperimente der neuen cDNA von α_2 mit β_1 in COS-Zellen zeigten die Bildung einer funktionellen, NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase an (Harteneck et al. 1991). Die humane α_2 -Untereinheit konnte später auf Proteinebene in Plazentagewebe nachgewiesen werden (Russwurm et al. 1998). Einige Autoren haben die universelle Bedeutung der α_2 -Untereinheit in Frage gestellt, weil diese nur beim Menschen und sonst bei keiner anderen Spezies in voller Länge kloniert werden konnte (Denninger und Marletta 1999). Dies hat uns veranlasst, die Sequenz der α_2 -Untereinheit aus einer anderen Spezies zu klonieren. Mit Hilfe der "5'-RACE-PCR" wurde ausgehend vom 3'-nichttranslatierten Bereich eine vollständige Sequenz der α_2 -Untereinheit aus der Rattenniere von männlichen, geschlechtsreifen Sprague-Dawley Ratten kloniert (siehe Methodenteil). Die neue Sequenz wurde bei der Genbank Datenbank unter dem Zugangscode AF109963 eingereicht. Abbildung 13 zeigt einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der α_2 -Untereinheit der Ratte mit der entsprechenden menschlichen Untereinheit. Die Sequenzähnlichkeit zwischen diesen Sequenzen betrug 90 % und war damit höher als bei einem Vergleich der beiden entsprechenden α_1 -Untereinheiten (84%, Denninger und Marletta 1999).

3.2.2. Untersuchungen der α_2 -Untereinheit und aminoterminaler Deletionsmutanten der α_2 -Untereinheit

Um die Funktion des Aminoterminus der α_2 -Untereinheit zu untersuchen, klonierten wir eine Serie von Deletionsmutanten mit fortschreitender aminoterminaler Deletion. Die unveränderte α_2 -Untereinheit und die Deletionsmutanten wurden mit der β_1 -Untereinheit koexprimiert. Abhängig von der Positionierung der neuen Startcodons wurden die Deletionsmutanten mit $\alpha_2\Delta N_{104}$, $\alpha_2\Delta N_{247}$ und $\alpha_2\Delta N_{401}$ bezeichnet. Die neuen Startmethionine der drei Deletionsmutanten sind Abbildung 13 zu entnehmen.

3.2.2.1. Expression der α_2 -Varianten im Baculovirus/Sf9-System

Die Expression der verschiedenen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase im Baculovirus/Sf9-System wurde mittels Immunoblots untersucht (Abbildung 14). Dazu wurden Antikörper gegen die α_2 -Untereinheit und gegen die β_1 -Untereinheit im Western-Blot eingesetzt. Der Antikörper gegen die α_2 -Untereinheit richtet sich gegen den Carboxyterminus und ist daher in der Lage, auch die deletierten α_2 -Varianten zu erkennen. Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass sowohl alle vier α_2 -Varianten als auch die β_1 -Untereinheit von den jeweiligen Antikörpern erkannt wurden.

rat	MSRRKISSESFSSLGSDYLETSPEEEEGECPLSKLCWNGSRSPPG	44
human	MSRRKISSESFSSLGSDYLETSPEEEEGECPLSRLCWNGSRSPPG	44
rat	P - - PGSRAAAMAATPVPAASVAAAAA VAAGSKRAQRRRRVNL	86
human	PLEPSPAAAAA AAPAPTPAASAAAAA ATAGARRVQRRRRVNL	88
	ΔN_{104}	
rat	SLGESISLLTAPSPQTIHMTLKR TLQYYEHQVIGYRDAEKNFHN	130
human	SLGESISRLTAPSPQTIQQTLKR TLQYYEHQVIGYRDAEKNFHN	132
rat	ISNRCSSADHSNKEEIEDVSGILRCTANVLGLKFQEIQERFGEE	174
human	ISNRC SYADHSNKEEIEDVSGILQCTANILGLKFEEIQKRFGEE	176
rat	FFKICFDENERVLRAVGSTLQDF FNGFDALLEHIRTSFGKQATL	218
human	FFNICFHENERVLRAVGSTLQDF FNGFDALLEHIRTSFGKQATL	220
	ΔN_{247}	
rat	ESPSFLCKELPEGTLKLHYFHPHHTVGFAM LGMIKAAGKRIYHL	262
human	ESPSFLCKELPEGTLMLHYFHPH HIVGFAM LGMIKAAGKKIYRL	264
rat	NVEVEQIENEKFCSDGSTPSNYSCLTFLIKECETTQITKNIPQG	306
human	DVEVEQVAN EKLCSDVSNPGNCSCLTFLIKECENTINIMKNLPQG	308
rat	TSQIPTDLRISINTFCRTFFPHLMFDPNMVVLQLGEGLRKQLRC	350
human	TSQVPADLRISINTFCRAFFPHLMFDP SMSVVLQLGEGLRKQLRC	352
rat	DNHKVLKFEDCFEIVSPKVNATFDRVLLRLSTPFVIRTKPEASG	394
human	DTHKVLKFEDCFEIVSPKVNATFERVLLRLSTPFVIRTKPEASG	396
	ΔN_{401}	
rat	TDNEDKVM EIKGQMIHVPE SNAILFLGSPCVDKLDLIGRGLHL	438
human	SENKDKVMEVKGQMIHVPE SNSILFLGSPCVDKLDLDELGRGLHL	440
rat	SDIPIHDATR DVILVGEQAKAQDGLKKRMDK LKATLEKTHQALE	482
human	SDIPIHDATR DVILVGEQAKAQDGLKKRMDK LKATLERTHQALE	484
rat	EKKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQRQVQARKFDDVTMLFSDIV	526
human	EKKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQ GQVQARKFDDVTMLFSDIV	528
rat	GFTAICAQCTPMQVISMLNELYTRFDHQCGFLDIYKVETIGDAY	570
human	GFTAICAQCTPMQVISMLNELYTRFDHQCGFLDIYKVETIGDAY	572
rat	CVASGLHRKSLCHAKPIALMALKMMELSEEVLPDGRPIQMRIG	614
human	CVAAGLHRKSLCHAKPIALMALKMMELSEEVLPDGRPIQMRIG	616
rat	IHSGSVLAGVVGVRMPRYCLFGNNVTLASKFESGSHPRRINISP	658
human	IHSGSVLAGVVGVRMPRYCLFGNNVTLASKFESGSHPRRINVSP	660
rat	TTYQLLKREDSFTFIPRSREELPDNFPKEIPGVCYFLELRTGPK	702
human	TTYQLLKREESFTFIPRSREELPDNFPKEIPGICYFLEVRTGPK	704
rat	PPKPS - LSSSRIKKVSYNIGTMFLRETSL	730
human	PPKPSFLSSSRIKKVSYNIGTMFLRETSL	733

Abbildung 13: Sequenzvergleich der neuen α_2 -Untereinheit mit dem entsprechenden menschlichen Ortholog. Mit der Sequenz der Ratte identische Aminosäuren sind hinterlegt. Die Aminosäureähnlichkeit betrug insgesamt 90 %. Die Startmethionine der Deletionsmutanten der α_2 -Untereinheit der Ratte sind unterstrichen und darüber ist die Bezeichnung der entsprechenden Deletionsmutante angegeben.

Das im Western-Blot ermittelte Molekulargewicht der α_2 -Untereinheit bzw. der α_2 -Deletionsmutanten stimmte mit denen, sich aus der Aminosäuresequenz ergebenden Molekulargewichten gut überein (Abb. 14). Die Expressionsspiegel der Deletionsmutanten von $\alpha_2\Delta N_{104}$ und $\alpha_2\Delta N_{247}$ waren deutlich geringer als die Expressionsspiegel der anderen beiden α_2 -Varianten, waren dabei untereinander aber nicht verschieden. Die β_1 -Untereinheit zeigte eine gleichmäßige Expression (Abb. 14).

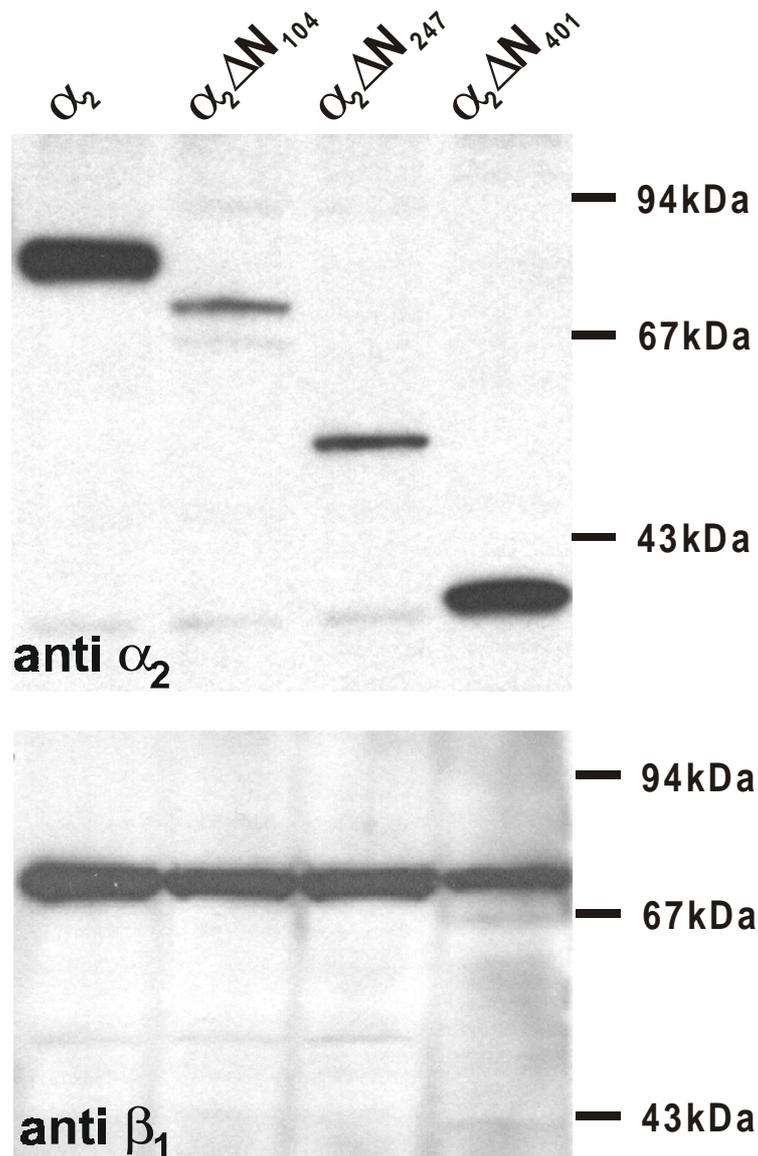


Abbildung 14: Charakterisierung der Expression der α_2 -Untereinheiten und der β_1 -Untereinheit mittels Western-Blot-Analyse in cytosolischen Fraktionen von entsprechend infizierten Sf9-Zellen. Für die Western-Blot-Analyse wurden Antikörper gegen die α_2 -Untereinheit (AK 6884) und gegen die β_1 -Untereinheit (AK 6889) in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Alle Spuren wurden mit 40 μ g Protein der entsprechenden cytosolischen Fraktionen beladen.

3.2.2.2. Messung der Enzymaktivität der α_2 -Varianten

Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität der jeweiligen cytosolischen Fraktionen von infizierten Sf9-Zellen wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht (Abb. 15). Unter basalen Bedingungen konnte für alle vier heterodimeren Varianten enzymatische Aktivität gemessen werden. Mit zunehmender Deletion des Aminoterminus der α_2 -Untereinheit zeigte sich eine leichte, aber nicht signifikante Verringerung in der basalen cGMP-Produktion. In Gegenwart von 100 μ M DEA/NO konnte die basale Enzymaktivität der unveränderten α_2/β_1 -Isoform von 166 ± 6 auf 7728 ± 647 pmol cGMP / min x mg gesteigert werden (n = 3). Durch die zusätzliche Anwesenheit von 100 μ M YC-1 erfolgte eine weitere Erhöhung auf 10045 ± 989 pmol cGMP / min x mg (n = 4). Eine Steigerung der enzymatischen Aktivität durch die Anwesenheit von DEA/NO konnte auch bei den Untereinheitenkombinationen $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ gemessen werden. Der Effekt war zwischen beiden Mutanten nicht signifikant verschieden, allerdings war die Stimulation durch 100 μ M DEA/NO nicht so ausgeprägt wie bei dem unveränderten Enzym (3334 ± 352 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und 2962 ± 329 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$; n = 4).

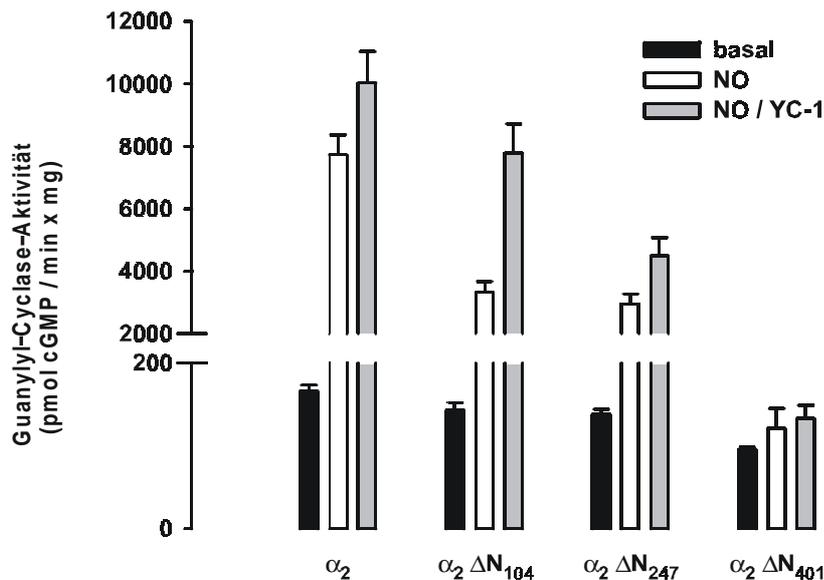


Abbildung 15: Guanylyl-Cyclase-Aktivität in cytosolischen Fraktionen aus infizierten Sf9-Zellen. Die cytosolischen Fraktionen wurden unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO (weiße Säulen) oder in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO und 100 μ M YC-1 (graue Säulen) untersucht. Die Messungen wurden in Gegenwart von 3 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Ebenso wie bei dem unveränderten Enzym führte die zusätzliche Anwesenheit von YC-1 zu einer weiteren Steigerung der enzymatischen Aktivität bei beiden Deletionsmutanten. Hierbei zeigte sich, dass die zusätzliche Stimulation durch YC-1 bei der Kombination von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ signifikant größer war als bei der Kombination von $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ (7793 ± 922 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und 4510 ± 588 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$; n = 4). Die Deletionsmutante

$\alpha_2\Delta N_{401}$ war dagegen nach Koexpression mit der β_1 -Untereinheit insensitiv gegenüber DEA/NO und YC-1 (Abb. 15).

3.2.3. Substratabhängigkeit der α_2 -Varianten

Zur weiteren Charakterisierung der α_2/β_1 -Varianten wurden die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der angebotenen Substratkonzentration untersucht. Abbildung 16 zeigt die Enzymaktivität in Abhängigkeit der GTP-Konzentration unter basalen Bedingungen in einem Lineweaver-Burk-Diagramm. Mit zunehmender Deletion des Aminoterminus kam es zu einer schrittweisen Verminderung der Substrataffinität im Vergleich mit der unveränderten α_2/β_1 -Variante. Die daraus resultierende, fortschreitende Erhöhung der K_m -Werte war aber nicht signifikant ($216 \pm 16 \mu\text{M}$ GTP für α_2/β_1 , $369 \pm 72 \mu\text{M}$ GTP für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$, $382 \pm 72 \mu\text{M}$ GTP für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ und $433 \pm 93 \mu\text{M}$ GTP für $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$; $n = 3$).

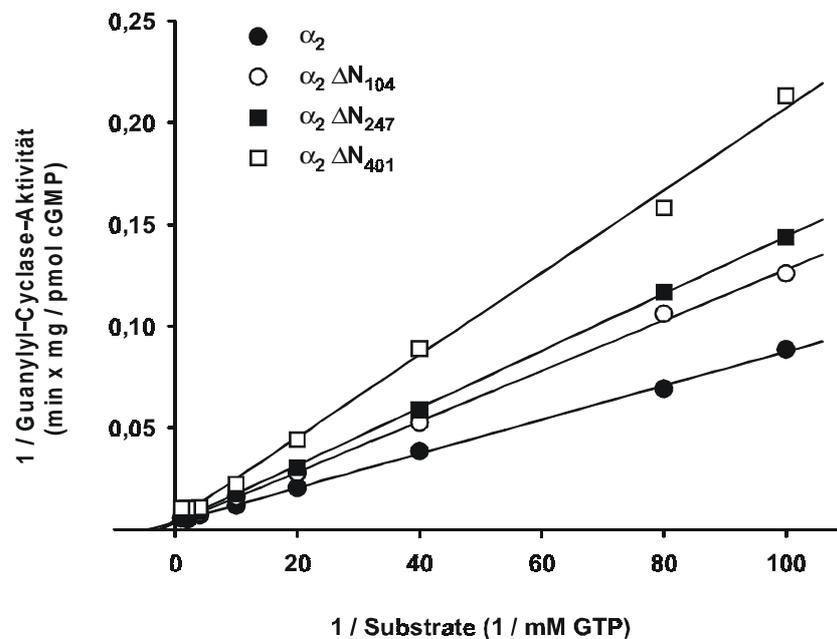


Abbildung 16: Basale Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Zur Ermittlung der K_m - und V_{max} -Werte wurde die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk gewählt. Die Abbildung zeigt die Substratabhängigkeit für α_2/β_1 (schwarze Kreise), $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ (weiße Kreise), $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ (schwarze Quadrate) und $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ (weiße Quadrate) in Anwesenheit einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM. Es wurden GTP-Konzentrationen zwischen 0,01 und 1 mM eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. S.E.M.-Werte sind in dieser doppelt-reziproken Auftragung nicht dargestellt.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die Kombinationen von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ ein nahezu identisches Verhalten in ihrer Substratabhängigkeit zeigten. Ein Vergleich der jeweiligen maximalen Enzymaktivitäten (V_{max} -Werte) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den α_2/β_1 -Varianten ($289 \pm 68 \text{ pmol cGMP} / \text{min x mg}$ für α_2/β_1 , $301 \pm 33 \text{ pmol cGMP} / \text{min x mg}$ für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$, $275 \pm 15 \text{ pmol cGMP} / \text{min x mg}$ für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ und $217 \pm 42 \text{ pmol cGMP} / \text{min x mg}$ für $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$; $n = 3$).

3.2.4. Konzentrationsabhängiger Einfluss von DEA/NO

Da die beiden Deletionsmutanten in der Kombination $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ eine verringerte Aktivität unter 100 μM DEA/NO im Vergleich zur unveränderten α_2/β_1 -Variante zeigten, führten wir eine Stimulation aller α_2/β_1 -Varianten mit steigenden DEA/NO-Konzentrationen durch (Abb. 17). Ein Vergleich der EC_{50} -Werte für DEA/NO zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den NO-sensitiven α_2/β_1 -Varianten (547 \pm 122 nM DEA/NO für α_2/β_1 , 733 \pm 138 nM DEA/NO für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und 622 \pm 144 nM DEA/NO für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$; n = 3). Wie schon in Abbildung 15 zu sehen, zeigte sich eine signifikante Verminderung in der maximalen Enzymaktivität der ersten beiden Deletionsmutanten gegenüber der unveränderten α_2/β_1 -Variante (8813 \pm 456 pmol cGMP / min x mg für α_2/β_1 , 3827 \pm 287 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und 3432 \pm 250 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$; n = 3). Anhand der Konzentrations-Wirkungskurven zeigte sich, wie bei der Untersuchung der Substratabhängigkeit, ein nahezu identisches Verhalten von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$. Für $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ konnte die Insensitivität gegenüber DEA/NO erneut belegt werden.

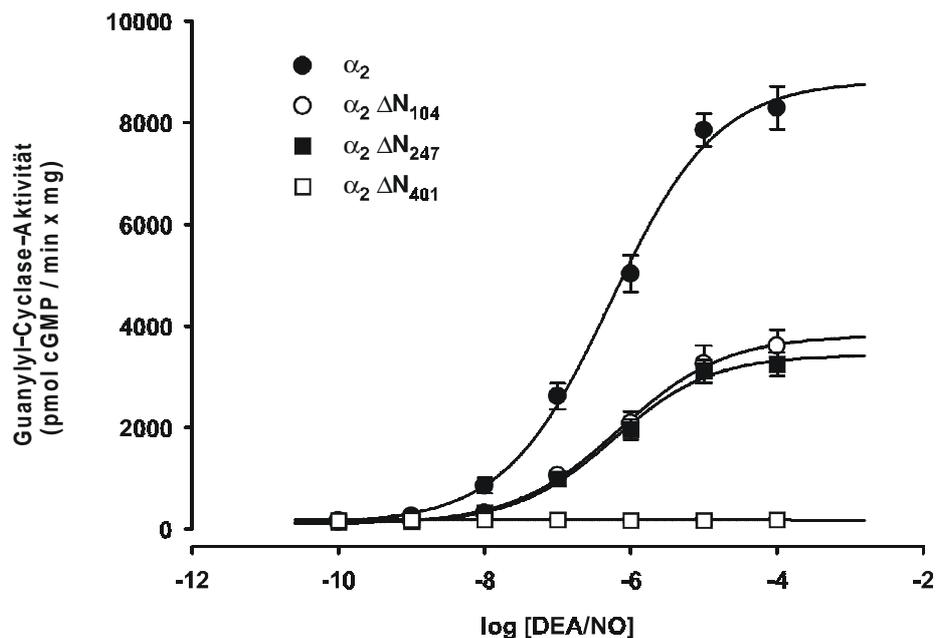


Abbildung 17: Einfluss steigender DEA/NO-Konzentrationen (von 0,1 nM bis 100 μM) auf die Enzymaktivität von α_2/β_1 und aminoterminalen Deletionsmutanten. Die Kurven zeigen die enzymatischen Aktivitäten von α_2/β_1 (schwarze Kreise), $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ (weiße Kreise), $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ (schwarze Quadrate) und $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ (weiße Quadrate) in Anwesenheit einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM. Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen dar.

3.2.5. Einfluss von YC-1 auf $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$

Im Gegensatz zu dem nahezu identischen Verhalten von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ in Bezug auf ihre Substrataffinität und ihre Affinität zu DEA/NO konnte in Abbildung 15 ein signifikanter Unterschied durch die zusätzliche Anwesenheit von YC-1 zwischen diesen beiden Deletionsmutanten ermittelt werden. Dieses Resultat konnte nicht auf differierende Expressionsspiegel zurückgeführt werden (Abb. 14). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden steigende YC-1-Konzentrationen eingesetzt, um den Effekt zu verifizieren (Abb. 18). Zur Kontrolle wurden die Expressionsspiegel in den cytosolischen Fraktionen von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ infizierten Sf9-Zellen bei jedem Versuch im Western-Blot untersucht. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen den Expressionsspiegeln dieser beiden Deletionsmutanten (wie schon in Abb. 15).

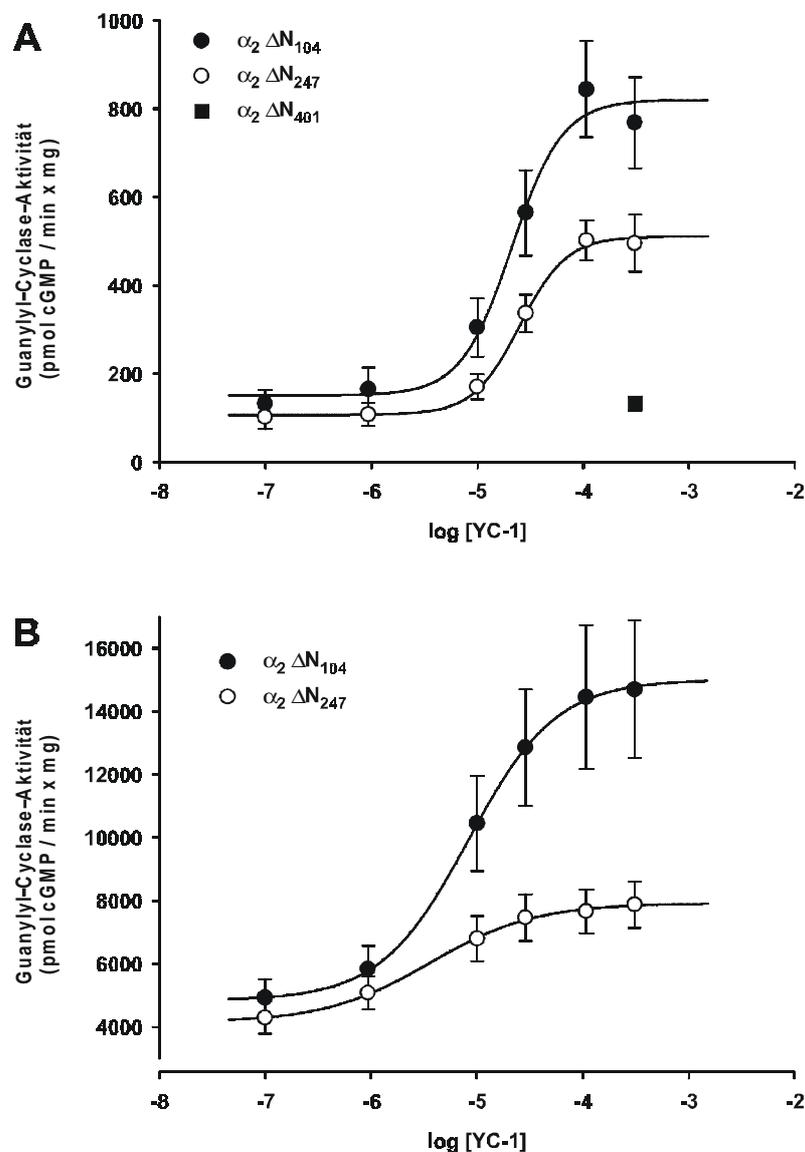


Abbildung 18: Einfluss steigender YC-1-Konzentrationen (von 0,1 μM bis 300 μM) auf die Enzymaktivität von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ (schwarze Kreise), $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ (weiße Kreise) und $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ (schwarzes Quadrat) in Gegenwart einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM (A) oder in zusätzlicher Anwesenheit von 100 μM DEA/NO (B). Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar.

Ein Vergleich der konzentrationsabhängigen Aktivierung durch YC-1 in Anwesenheit von 3 mM Mg²⁺ zeigte eine signifikant höhere maximale enzymatische Aktivität für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ im Vergleich zu $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ (Abb. 18A: 830 ± 100 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und 540 ± 60 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$; n = 6). Ein Vergleich der EC₅₀-Werte für YC-1 ergab hingegen keine signifikanten Unterschiede. Eine signifikant höhere maximale enzymatische Aktivität für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ konnte auch in Anwesenheit von 100 μ M DEA/NO ermittelt werden (Abb. 18B: 14988 ± 2309 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und 7939 ± 677 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$; n = 4). Die EC₅₀-Werte für YC-1 bei zusätzlicher Anwesenheit von DEA/NO waren signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Deletionsmutanten ($8,5 \pm 0,8$ μ M YC-1 für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $3,7 \pm 0,5$ μ M YC-1 für $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$; n = 4). Die Deletionsmutante $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ war hingegen insensitiv gegenüber YC-1 (Abb. 18A).

3.2.6. Einfluss von BAY 41-2272 auf die α_2 -Untereinheit und aminoterminalen

Deletionsmutanten der α_2 -Untereinheit

Neben YC-1 wurde kürzlich ein weiterer, potenter Modulator der löslichen Guanylyl-Cyclase, das BAY 41-2272, entwickelt (Stasch et al. 2001). Diese Verbindung besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu YC-1, obwohl deutliche Unterschiede in der Potenz und Spezifität für α_1/β_1 zwischen diesen beiden Substanzen bestehen (Stasch et al. 2001). Bislang wurde BAY 41-2272 nur an der α_1/β_1 -Isoform untersucht. Hier konnte mittels Photoaffinitätsmarkierung gezeigt werden, dass eine mögliche Bindungsstelle für BAY 41-2272 innerhalb des aminoterminalen Bereiches der α_1 -Untereinheit zu finden ist. Da dieser Bereich zwischen den α_1 - und α_2 -Untereinheiten keine hohe Sequenzhomologie aufweist, stellte sich die Frage, ob BAY 41-2272 auch die α_2/β_1 -Isoform der löslichen Guanylyl-Cyclase aktivieren konnte. Daher untersuchten wir den Einfluss von BAY 41-2272 auf den α_2/β_1 -Enzymkomplex sowie verschiedenen aminoterminalen Deletionsmutanten.

3.2.6.1. Einfluss von BAY 41-2272 auf α_2/β_1

In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass die Anwesenheit von unterschiedlichen BAY 41-2272-Konzentrationen zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung der unveränderten α_2/β_1 -Variante führte. Die maximal eingesetzte Konzentration von BAY 41-2272 (100 μ M) führte zu einer Steigerung in der cGMP-Produktion von $0,19 \pm 0,03$ auf $3,79 \pm 1,48$ nmol cGMP / min x mg in Anwesenheit von 3 mM MgCl₂ (n = 4). Unter diesen Bedingungen berechnete sich der EC₅₀-Wert für BAY 41-2272 mit $0,90 \pm 0,14$ μ M (n = 4). Die zusätzliche Anwesenheit von DEA/NO führte zu einer Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve nach oben (Abb. 19). In Anwesenheit von 1 nM BAY 41-2272 in Kombination mit 100 nM DEA/NO ergab sich eine enzymatische Aktivität von $6,06 \pm 1,30$ nmol cGMP / min x mg, die durch eine maximale BAY 41-2272-Konzentration von 100 μ M auf $17,34 \pm 3,76$ nmol cGMP / min x mg gesteigert werden konnte (n = 3). Der EC₅₀-Wert für

BAY 41-2272 berechnete sich für diese Kurve mit $0,28 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ($n = 3$). In Gegenwart von 1 nM BAY 41-2272 in Kombination mit 100 μM DEA/NO ergab sich eine enzymatische Aktivität von $25,28 \pm 6,75 \text{ nmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$, die durch eine maximale BAY 41-2272-Konzentration von 100 μM auf $39,29 \pm 10,93 \text{ nmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ gesteigert werden konnte ($n = 3$). Der EC_{50} -Wert für BAY 41-2272 berechnete sich für diese Kurve mit $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Die EC_{50} -Werte in Anwesenheit von DEA/NO waren im Vergleich zur Kontrollkurve signifikant verschieden, im Vergleich untereinander aber nicht. Die Anwesenheit von DEA/NO führte also zu einer erhöhten Sensitivität von α_2/β_1 für BAY 41-2272.

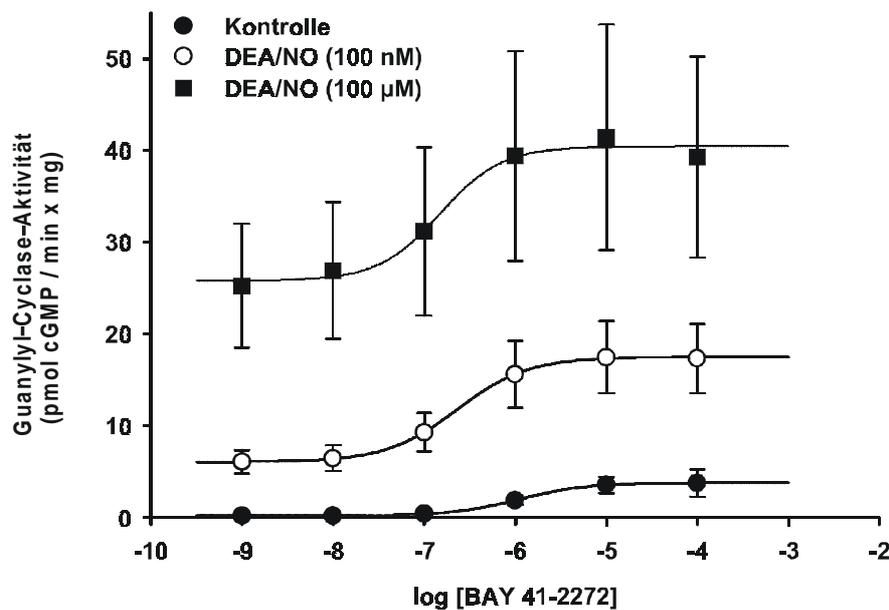


Abbildung 19: Einfluss steigender BAY 41-2272-Konzentrationen (von 1 nM bis 100 μM) auf die Enzymaktivität von α_2/β_1 in Gegenwart einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM (schwarze Kreise) oder in zusätzlicher Anwesenheit von 100 nM DEA/NO (weiße Kreise) oder 100 μM DEA/NO (schwarze Quadrate). Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar.

3.2.6.2. Einfluss von BAY 41-2272 auf $\alpha_2\Delta\text{N}_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta\text{N}_{247}/\beta_1$

Da sich die beiden Deletionsmutanten $\alpha_2\Delta\text{N}_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta\text{N}_{247}/\beta_1$ in ihrem Verhalten gegenüber YC-1 deutlich unterschieden, führten wir konzentrationsabhängige Untersuchungen an diesen beiden Mutanten auch mit dem strukturell ähnlichen BAY 41-2272 durch (Abb. 20). Hierbei ergab sich ein ähnliches Verhalten, wie es schon für YC-1 zu beobachten war. Sowohl in Gegenwart von 3 mM Mg^{2+} (Abb. 20A) als auch in zusätzlicher Anwesenheit von DEA/NO konnten signifikant höhere maximale enzymatische Aktivitäten für $\alpha_2\Delta\text{N}_{104}/\beta_1$ gegenüber $\alpha_2\Delta\text{N}_{247}/\beta_1$ ermittelt werden (Kontrolle: $397 \pm 84 \text{ pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_2\Delta\text{N}_{104}/\beta_1$ und $153 \pm 12 \text{ pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_2\Delta\text{N}_{247}/\beta_1$, Abb. 20A; 100 nM DEA/NO: $5,7 \pm 0,8 \text{ nmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_2\Delta\text{N}_{104}/\beta_1$ und $2,0 \pm 0,1 \text{ nmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_2\Delta\text{N}_{247}/\beta_1$, Abb. 20B; 100 μM DEA/NO: $6,4 \pm 0,6 \text{ nmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_2\Delta\text{N}_{104}/\beta_1$ und $3,1 \pm 0,7 \text{ nmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_2\Delta\text{N}_{247}/\beta_1$,

Abb. 20C; n = 3). Unter allen Versuchsbedingungen ergab sich kein signifikanter Unterschied in den EC₅₀-Werten für BAY 41-2272. Die Deletionsmutante $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ war insensitiv gegenüber BAY 41-2272 (Abb. 20A).

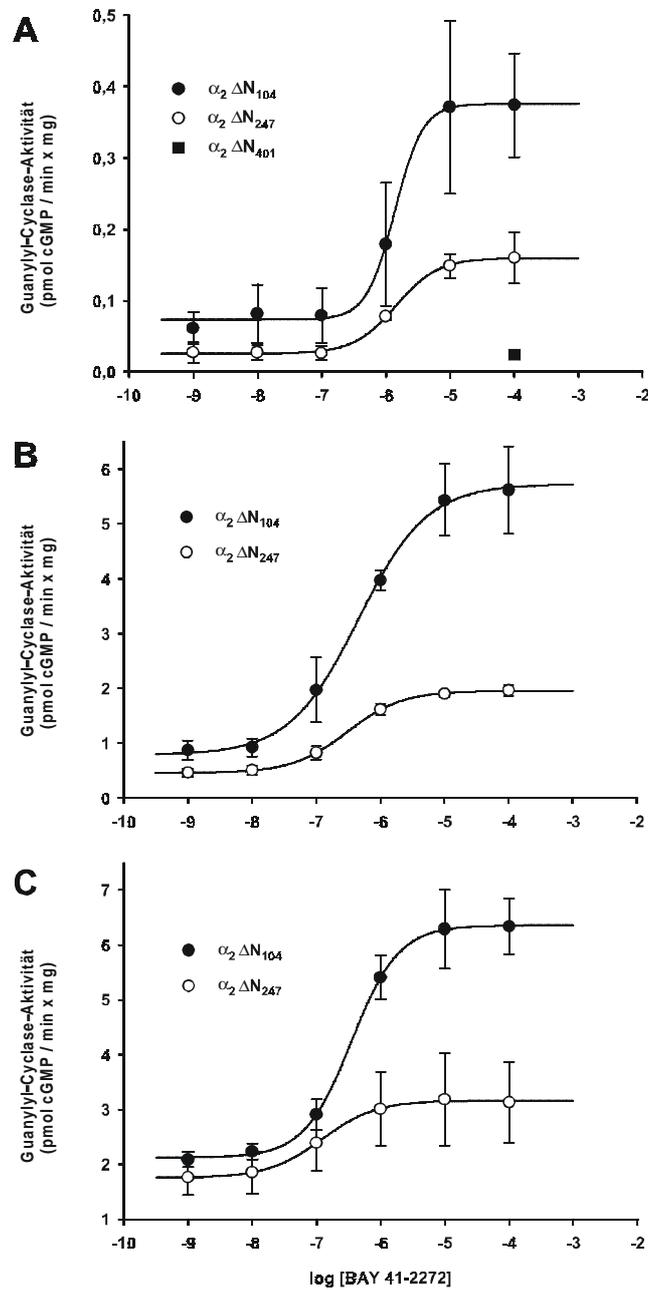


Abbildung 20: Einfluss steigender BAY 41-2272-Konzentrationen (von 1 nM bis 100 μ M) auf die Enzymaktivität von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ (schwarze Kreise), $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ (weiße Kreise) und $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ (schwarzes Quadrat) in Gegenwart einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM (A) oder in zusätzlicher Anwesenheit von 100 nM DEA/NO (B) oder 100 μ M DEA/NO (C). Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen dar.

3.3. Untersuchungen an der α_1 -Untereinheit und aminoterminaler Deletionsmutanten der α_1 -Untereinheit

Die Ergebnisse an den Deletionsmutanten der α_2 -Untereinheit waren überraschend im Hinblick auf publizierte Daten zu Deletionsmutanten der α_1 -Untereinheit (Wedel et al. 1995). Dies veranlasste uns zur Klonierung von aminoterminalen Deletionsmutanten der α_1 -Untereinheit. Zunächst klonierten wir zwei Mutanten der α_1 -Untereinheit mit fortschreitender aminoterminaler Deletion. Die unveränderte α_1 -Untereinheit und die Deletionsmutanten wurden mit der β_1 -Untereinheit in Sf9-Zellen koexprimiert. Abhängig von der Positionierung der neuen Startcodons wurden die Deletionsmutanten mit $\alpha_1\Delta N_{236}$ und $\alpha_1\Delta N_{364}$ bezeichnet. Während der Klonierungsarbeiten erschien eine Arbeit, in der eine mögliche Bindungsstelle des neuen Modulators BAY 41-2272 an der α_1 -Untereinheit beschrieben wurde (Stasch et al. 2001). Diese Arbeit veranlasste uns, eine weitere Deletionsmutante zu klonieren, welche diese mögliche Bindungsstelle nicht mehr enthielt. Die resultierende Deletionsmutante wurde mit $\alpha_1\Delta N_{259}$ bezeichnet.

3.3.1. Expression der α_1 -Varianten im Baculovirus/Sf9-System

Die Expression der verschiedenen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase im Baculovirus/Sf9-System wurde mittels Immunoblots untersucht (Abbildung 21). Dazu wurden Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit und gegen die β_1 -Untereinheit im Western-Blot eingesetzt. Der Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit richtet sich gegen die carboxyterminale Domäne und ist daher in der Lage, auch die deletierten α_1 -Varianten zu erkennen. Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass sowohl alle vier α_1 -Varianten als auch die β_1 -Untereinheit von den jeweiligen Antikörpern erkannt wurden. Das im Western-Blot ermittelte Molekulargewicht der α_1 -Untereinheit bzw. der α_1 -Deletionsmutanten stimmte mit denen, sich aus der Aminosäuresequenz ergebenden Molekulargewichten gut überein. Aufgrund der geringen Größenunterschiede zwischen $\alpha_1\Delta N_{236}$ und $\alpha_1\Delta N_{259}$ ließen sich die beiden Signale in dem von uns verwendeten Gelkammersystem nicht trennen. Eine Sequenzanalyse der beiden pFASTBAC-Klone zeigte die fortschreitende Deletion des Aminoterminus aber eindeutig. Die β_1 -Untereinheit zeigte eine gleichmäßige Expression mit dem erwarteten Molekulargewicht.

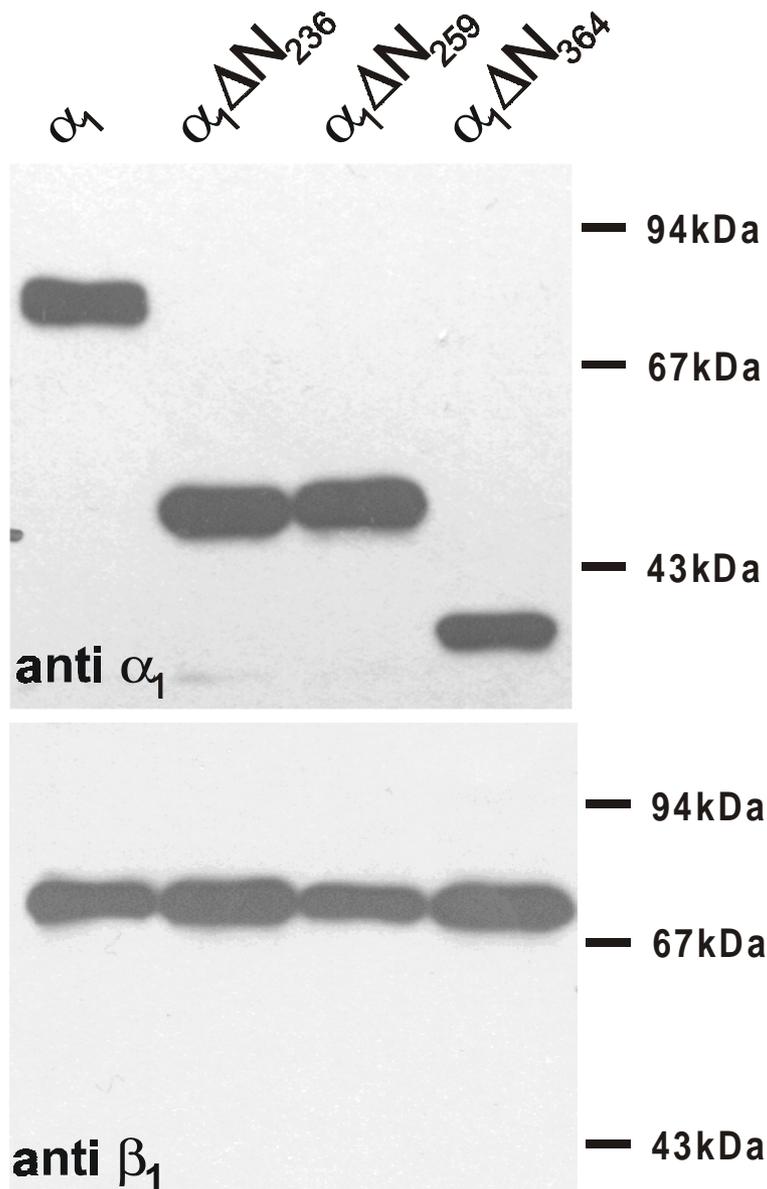


Abbildung 21: Charakterisierung der Expression der α_1 -Untereinheiten und der β_1 -Untereinheit mittels Western-Blot-Analyse in cytosolischen Fraktionen von entsprechend infizierten Sf9-Zellen. Für die Western-Blot-Analyse wurden Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit (AK 1200) und gegen die β_1 -Untereinheit (AK 6889) in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Alle Spuren wurden mit 40 μ g Protein der entsprechenden cytosolischen Fraktionen beladen.

3.3.2. Messung der Enzymaktivität der α_1 -Varianten

Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität der jeweiligen cytosolischen Fraktionen von infizierten Sf9-Zellen wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht (Abb. 22). Unter basalen Bedingungen konnte für alle vier heterodimeren Varianten enzymatische Aktivität gemessen werden. Die ersten beiden Deletionsmutanten wiesen in ihrer Basalaktivität gegenüber der unveränderten α_1 -Untereinheit keine Unterschiede auf. Die Untereinheitenkombination $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ zeigte eine nicht signifikant verminderte Basalaktivität. In Gegenwart von 100 μ M DEA/NO konnte die basale Enzymaktivität der unveränderten α_1/β_1 -Isoform von 426 ± 57 auf 26826 ± 4031 pmol cGMP / min x mg gesteigert werden (n = 5). Durch die zusätzliche Anwesenheit von 100 μ M YC-1 erfolgte eine weitere Erhöhung

auf 34872 ± 6426 pmol cGMP / min x mg ($n = 5$). Eine Steigerung der enzymatischen Aktivität durch die Anwesenheit von DEA/NO konnte auch bei den Untereinheitenkombinationen $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ gemessen werden. Der Effekt war zwischen beiden Mutanten und im Vergleich zum unveränderten Enzym nicht signifikant verschieden (23602 ± 2143 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und 27007 ± 2330 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$; $n = 5$). Ebenso wie bei dem unveränderten Enzym führte die zusätzliche Anwesenheit von YC-1 zu einer weiteren Steigerung der enzymatischen Aktivität bei beiden Deletionsmutanten. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass die zusätzliche Stimulation durch YC-1 unabhängig vom Ausmaß der Deletion war (34872 ± 6426 pmol cGMP / min x mg für α_1/β_1 , 33785 ± 4787 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und 38951 ± 4003 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$; $n = 5$). Die Deletionsmutante $\alpha_1\Delta N_{364}$ war hingegen, nach Koexpression mit der β_1 -Untereinheit, insensitive gegenüber DEA/NO oder der Kombination von DEA/NO und YC-1 (Abb. 22).

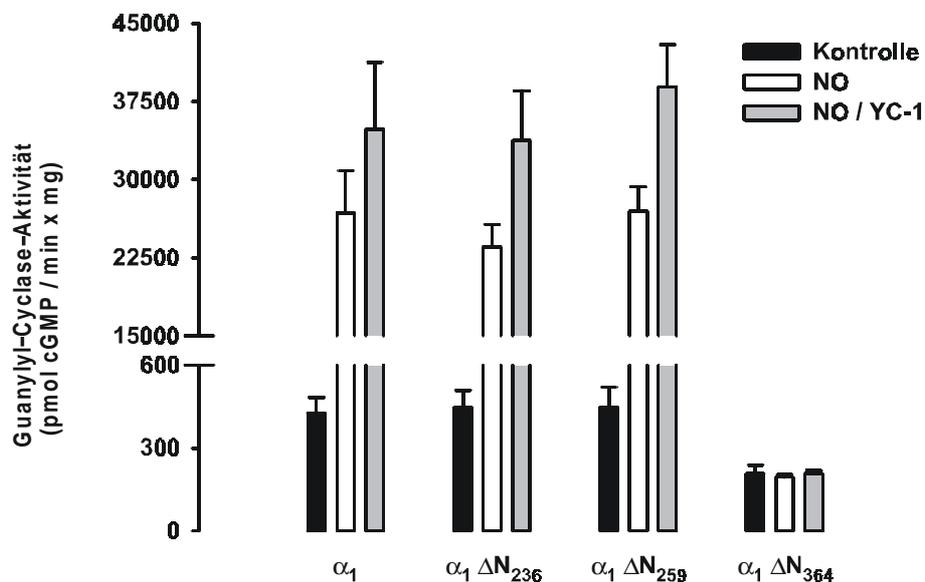


Abbildung 22: Guanylyl-Cyclase-Aktivität in cytosolischen Fraktionen aus infizierten Sf9-Zellen. Die cytosolischen Fraktionen wurden unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ DEA/NO (weiße Säulen) oder in der Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ DEA/NO und $100 \mu\text{M}$ YC-1 (graue Säulen) untersucht. Die Messungen wurden in Gegenwart von 3 mM MgCl_2 durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.3.3. Substratabhängigkeit der α_1 -Varianten

Zur weiteren Charakterisierung der α_1 -Varianten wurden die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der angebotenen Substratkonzentration untersucht. Abbildung 23 zeigt die Enzymaktivität in Abhängigkeit der GTP-Konzentration unter basalen Bedingungen in einem Lineweaver-Burk-Diagramm. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass die Kombinationen von α_1/β_1 und $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ ein nahezu identisches Verhalten in ihrer Substratabhängigkeit zeigten und die Kombination von $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ nur geringfügig davon abwich. Die Untereinheitenkombination $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ zeigte hingegen eine signifikante Verminderung in der Substrataffinität im Vergleich zu allen anderen α_1 -Varianten ($132 \pm 14 \mu\text{M GTP}$ für α_1/β_1 , $144 \pm 5 \mu\text{M GTP}$ für $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$, $244 \pm 28 \mu\text{M GTP}$ für $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ und $428 \pm 28 \mu\text{M GTP}$ für $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$; $n = 3$). Ein Vergleich der jeweiligen maximalen Enzymaktivitäten (V_{max} -Werte) ergab aufgrund der Streuung der Einzelwerte keine signifikanten Unterschiede zwischen den α_1 -Varianten, obwohl der V_{max} -Wert für $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ deutlich verringert war ($508 \pm 173 \text{ pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für α_1/β_1 , $586 \pm 182 \text{ pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$, $612 \pm 89 \text{ pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ und $233 \pm 54 \text{ pmol cGMP} / \text{min} \times \text{mg}$ für $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$; $n = 3$).

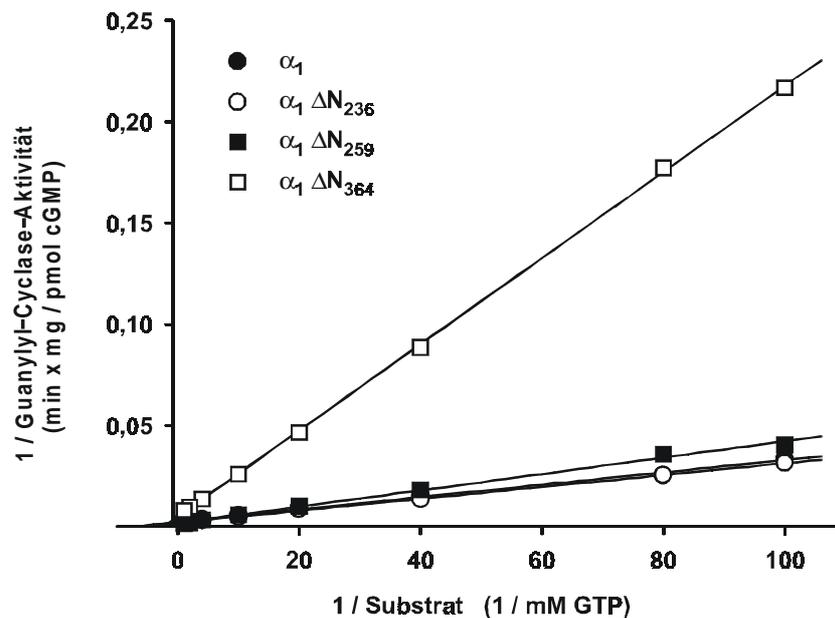


Abbildung 23: Basale Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Zur Ermittlung der K_m - und V_{max} -Werte wurde die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk gewählt. Die Abbildung zeigt die Substratabhängigkeit für α_1/β_1 (schwarze Kreise), $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ (weiße Kreise), $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ (schwarze Quadrate) und $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ (weiße Quadrate) in Anwesenheit einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM. Es wurden GTP-Konzentrationen zwischen 0,01 und 1 mM eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. S.E.M.-Werte sind in dieser doppelt-reziproken Auftragung nicht dargestellt.

3.3.4. Konzentrationsabhängiger Einfluss von DEA/NO

Um zu untersuchen welchen Einfluss eine aminoterminal Deletion der α_1 -Untereinheit auf die NO-Affinität hat, führten wir eine Stimulation aller α_1/β_1 -Varianten mit steigenden DEA/NO-Konzentrationen durch (Abb. 24). Ein Vergleich der EC_{50} -Werte für DEA/NO zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den NO-sensitiven α_1/β_1 -Varianten (421 ± 69 nM DEA/NO für α_1/β_1 , 408 ± 75 nM DEA/NO für $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und 585 ± 246 nM DEA/NO für $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$; $n = 3$). Wie in Abbildung 24 zu sehen, zeigten sich nur geringfügige Unterschiede in der maximalen Enzymaktivität zwischen den NO-sensitiven Deletionsmutanten und der unveränderten α_1/β_1 -Variante (22860 ± 2505 pmol cGMP / min x mg für α_1/β_1 , 23568 ± 2549 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und 25504 ± 3311 pmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{247}/\beta_1$; $n = 3-4$). Für die Untereinheitenkombination $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ konnte die Insensitivität gegenüber DEA/NO erneut belegt werden (Abb. 24).

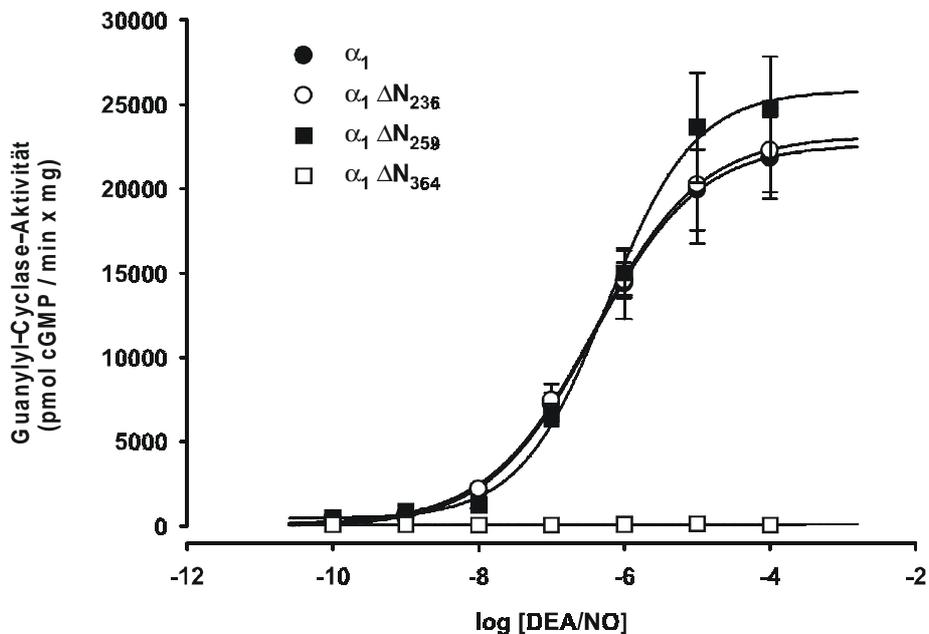


Abbildung 24: Einfluss steigender DEA/NO-Konzentrationen (von 0,1 nM bis 100 μ M) auf die Enzymaktivität von α_1/β_1 und aminoterminalen Deletionsmutanten. Die Kurven zeigen die enzymatischen Aktivitäten von α_1/β_1 (schwarze Kreise), $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ (weiße Kreise), $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ (schwarze Quadrate) und $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ (weiße Quadrate) in Anwesenheit einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM. Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar.

3.3.5. Einfluss von YC-1 auf die α_1/β_1 -Varianten

Das nahezu identischen Verhalten von α_1/β_1 , $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ in Bezug auf ihre Substrataffinität und ihre Affinität zu DEA/NO konnte auch in Anwesenheit steigender YC-1-Konzentrationen ermittelt werden (Abb. 25).

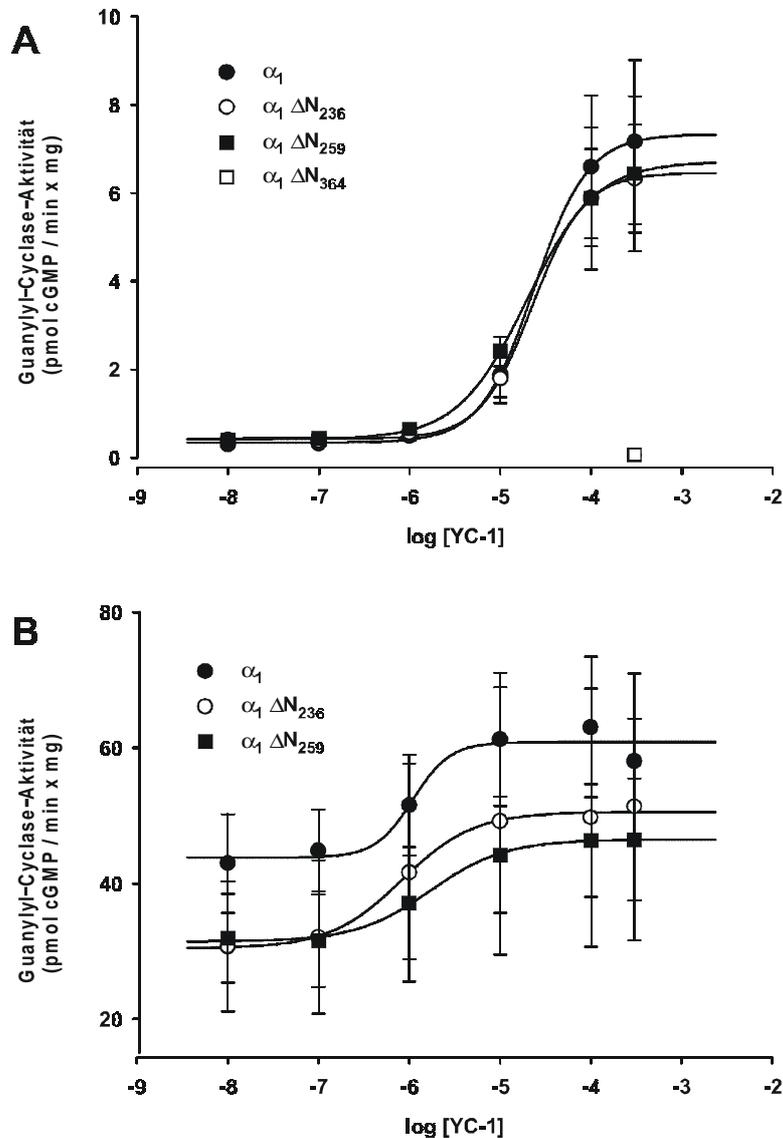


Abbildung 25: Einfluss steigender YC-1-Konzentrationen (von 0,01 μM bis 300 μM) auf die Enzymaktivität von α_1/β_1 (schwarze Kreise), $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ (weiße Kreise), $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ (schwarze Quadrate) und $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ (weiße Quadrate) in Gegenwart einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM (A) oder in zusätzlicher Anwesenheit von 100 μM DEA/NO (B). Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar.

Ein Vergleich der konzentrationsabhängigen Aktivierung durch YC-1 in Anwesenheit von 3 mM Mg^{2+} zeigte keine signifikanten Abweichungen in der maximalen enzymatischen Aktivität für α_1/β_1 , $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ (Abb. 25A: $7,7 \pm 2,0$ nmol cGMP / min x mg für α_1/β_1 , $6,5 \pm 1,3$ nmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und $6,7 \pm 1,9$ nmol cGMP / min x mg für $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$;

n = 3). Ein Vergleich der EC₅₀-Werte für YC-1 ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (25,2 ± 7,2 µM YC-1 für α₁/β₁, 22,6 ± 0,6 µM YC-1 für α₁ΔN₂₃₆/β₁ und 18,5 ± 6,0 µM YC-1 für α₁ΔN₂₅₉/β₁; n = 3). In Anwesenheit von 100 µM DEA/NO konnte ebenfalls keine veränderte maximale enzymatische Aktivität ermittelt werden. (Abb. 25B: 61,5 ± 6,1 nmol cGMP / min x mg für α₁/β₁, 70,2 ± 23,8 nmol cGMP / min x mg für α₁ΔN₂₃₆/β₁ und 68,8 ± 23,1 nmol cGMP / min x mg für α₁ΔN₂₅₉/β₁; n = 4). Alle EC₅₀-Werte für YC-1 bei zusätzlicher Anwesenheit von DEA/NO waren signifikant verringert gegenüber den Werten ohne DEA/NO-Zusatz, untereinander aber nicht verschieden (0,89 ± 0,05 µM YC-1 für α₁/β₁, 1,19 ± 0,19 µM YC-1 für α₁ΔN₂₃₆/β₁ und 1,94 ± 0,64 µM YC-1 für α₁ΔN₂₅₉/β₁; n = 4). Die Untereinheitenkombination α₁ΔN₃₆₄/β₁ war insensitiv gegenüber YC-1 (Abb. 25A).

3.3.6. Einfluss von BAY 41-2272 auf die α₁-Varianten

Um zu überprüfen, ob die von Stasch et al. 2001 beschriebenen Cysteinreste der α₁-Untereinheit entscheidend für die Bindung von BAY 41-2272 an die lösliche Guanylyl-Cyclase sind, führten wir konzentrationsabhängige Untersuchungen an allen α₁-Varianten mit BAY 41-2272 durch (Abb. 26). Hierbei ergab sich ein ähnliches Verhalten, wie es schon für YC-1 zu beobachten war. In Gegenwart von 3 mM Mg²⁺ als auch in zusätzlicher Anwesenheit von DEA/NO konnte mit steigender Deletion des Aminoterminus eine Verringerung in der maximalen Enzymaktivität ermittelt werden, die aber nicht signifikant war (3 mM Mg²⁺: 18,8 ± 5,9 nmol cGMP / min x mg für α₁/β₁, 14,3 ± 6,3 nmol cGMP / min x mg für α₁ΔN₂₃₆/β₁ und 14,2 ± 8,0 nmol cGMP / min x mg für α₁ΔN₂₅₉/β₁, Abb. 26A; 100 µM DEA/NO: 62,6 ± 11,3 nmol cGMP / min x mg für α₁/β₁, 56,4 ± 5,8 nmol cGMP / min x mg für α₁ΔN₂₃₆/β₁ und 50,8 ± 5,3 nmol cGMP / min x mg für α₁ΔN₂₅₉/β₁, Abb. 26B; n = 5). Unter den jeweiligen Versuchsbedingungen konnte kein Unterschied in den EC₅₀-Werten zwischen den einzelnen α₁-Varianten ermittelt werden (3 mM Mg²⁺: 0,50 ± 0,08 µM BAY 41-2272 für α₁/β₁, 1,19 ± 0,40 µM BAY 41-2272 für α₁ΔN₂₃₆/β₁ und 0,78 ± 0,08 µM BAY 41-2272 für α₁ΔN₂₅₉/β₁, Abb. 26A; 100 µM DEA/NO: 28 ± 7 nM BAY 41-2272 für α₁/β₁, 23 ± 9 nM BAY 41-2272 für α₁ΔN₂₃₆/β₁ und 77 ± 19 nM BAY 41-2272 für α₁ΔN₂₅₉/β₁, Abb. 26B; n = 5). Die zusätzliche Anwesenheit von 100 µM DEA/NO führte bei allen α₁-Varianten zu einer signifikanten Verringerung der EC₅₀-Werte für BAY 41-2272 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollwerten (Abb. 26 B).

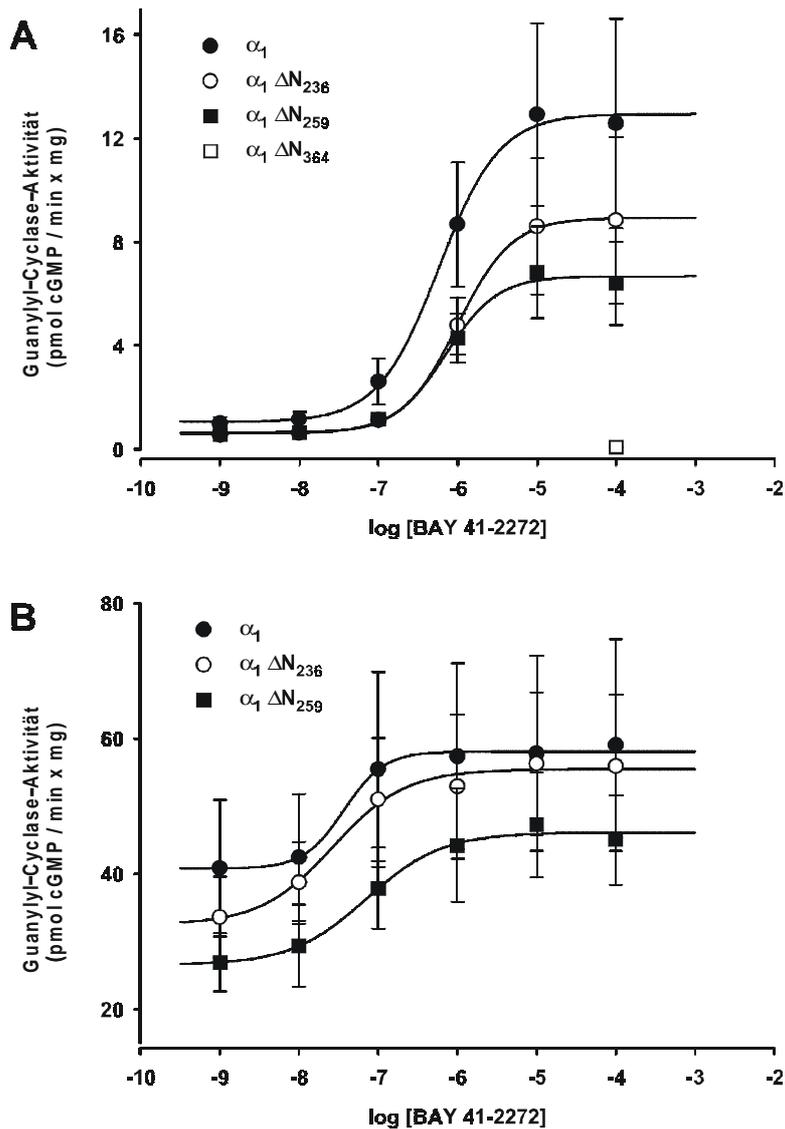


Abbildung 26: Einfluss steigender BAY 41-2272-Konzentrationen (von 1 nM bis 100 μ M) auf die Enzymaktivität von α_1/β_1 (schwarze Kreise), $\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ (weiße Kreise), $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ (schwarze Quadrate) und $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ (weiße Quadrate) in Gegenwart einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM (A) oder in zusätzlicher Anwesenheit von 100 μ M DEA/NO (B). Alle Werte stellen Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus fünf unabhängigen Versuchen dar.

3.3.7. Untersuchungen an angereinigten α_1/β_1 - und $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ -Enzymkomplexen

Aufgrund ihres nahezu identischen Verhaltens stellte sich die Frage, ob auch die Absorptionsspektren dieser beiden α_1/β_1 -Varianten übereinstimmten. Für die unveränderte, aufgereinigte α_1/β_1 -Variante zeigt sich im Bereich zwischen 350 und 550 nm ein typisches Absorptionsspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 431 nm, welches als Soret-Bande bezeichnet wird (Gerzer et al. 1981, Stone und Marletta 1994, Zhao et al. 1999). Dieses Absorptionsmaximum wird durch die prosthetische Hämgruppe mit dem darin eingelagerten Eisenatom hervorgerufen (Zhao et al. 1999). In Anwesenheit eines NO-Donors kommt es zu einer Verminderung des Absorptionsmaximums, einhergehend mit einer Linksverschiebung auf 398 nm (Zhao et al. 1999).

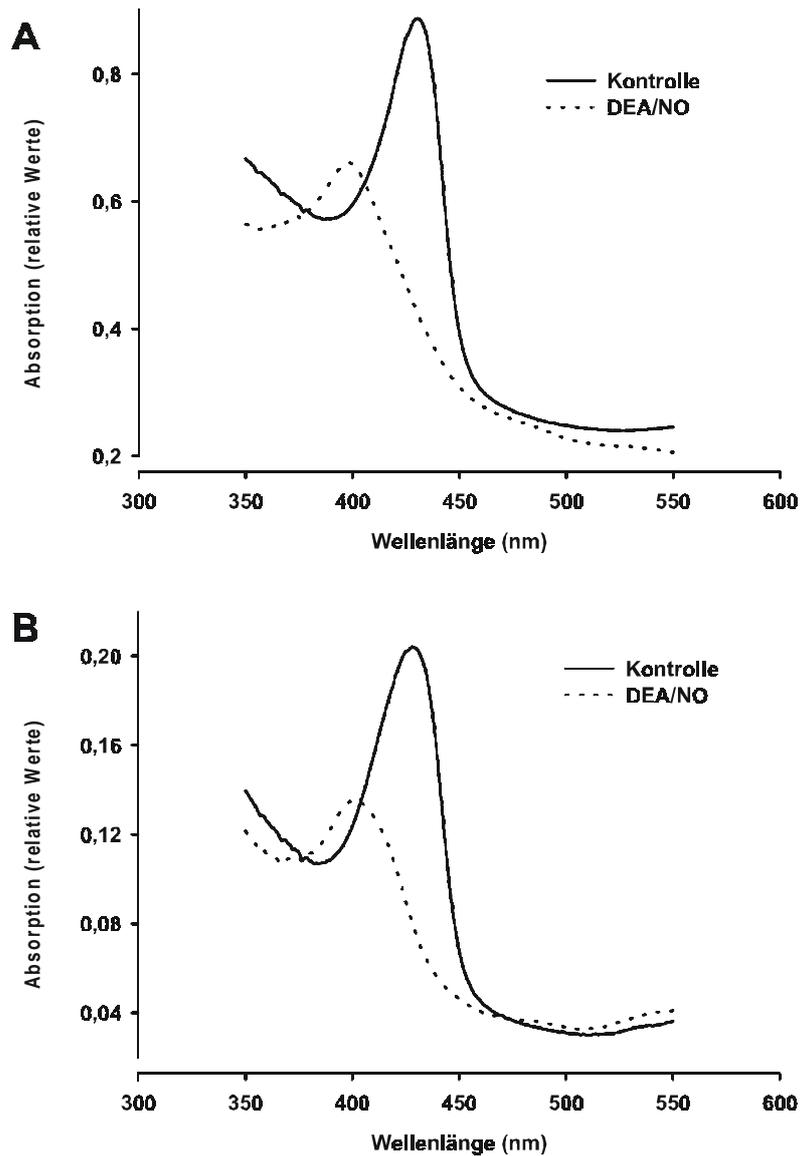


Abbildung 27: Absorptionsspektren von α_1/β_1 (A) und von $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ (B) in Abwesenheit (durchgezogene Linie) oder in Anwesenheit von 100 μM DEA/NO (gestrichelte Linie).

Das in Abbildung 27A gezeigte Absorptionsspektrum von α_1/β_1 zeigte die in der Literatur beschriebene Soret-Bande mit einem Absorptionsmaximum bei 431 nm. In Anwesenheit von 100 μM DEA/NO ergab sich die typische Linksverschiebung des Absorptionsmaximums auf 398 nm und eine Verminderung der maximalen Absorption. Nach der Anreinigung von $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ und der Ermittlung des Absorptionsspektrums zeigte sich ein Absorptionsmuster wie es auch für die unveränderte α_1/β_1 -Variante ermittelt werden konnte (Abb. 27B). Somit unterscheiden sich diese beiden Enzymkomplexe weder in ihren enzymatischen Eigenschaften noch in ihrem Absorptionsverhalten.

4. Diskussion

Während über die molekularen Mechanismen der NO-Aktivierung des klassischen heterodimeren Enzyms, das sich aus einer α_1 - und einer β_1 -Untereinheit zusammensetzt, schon relativ viel bekannt ist, ist die Rolle der später gefundenen Untereinheiten α_2 und β_2 noch vergleichsweise unklar. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, diese beiden neueren Untereinheiten näher zu charakterisieren. Folgende Hauptergebnisse, die anschließend im einzelnen diskutiert werden, wurden erzielt:

1. Die β_2 -Untereinheit der Ratte bildet in der Abwesenheit einer weiteren Untereinheit und in der Gegenwart von Mn^{2+} ein durch NO aktivierbares Enzym. Damit konnte erstmals das Vorkommen einer homomer angelegten, NO-sensitiven, löslichen Guanylyl-Cyclase bei Säugern gezeigt werden.
2. Die α_2 -Untereinheit ist zwischen Mensch und Ratte in Bezug auf die Aminosäuresequenz und die biochemischen Eigenschaften gut konserviert und bildet mit der β_1 -Untereinheit ein heterodimeres, NO- und YC-1-sensitives Enzym.
3. Der Enzymkomplex aus α_2 - und β_1 -Untereinheit ist sensitiv gegenüber dem neuen Modulator der löslichen Guanylyl-Cyclase, BAY 41-2272.
4. Die Bereiche von Aminosäure 260 – 364 der α_1 -Untereinheit bzw. 248 – 401 der α_2 -Untereinheit sind kritisch für die Sensitivität der heterodimeren Enzymkomplexe gegenüber NO, YC-1 und BAY 41-2272.

Nach der klassischen Auffassung haben alle NO-aktivierten löslichen Guanylyl-Cyclasen einen heterodimeren Aufbau aus einer α - und einer β -Untereinheit (Denninger und Marletta 1999). Am besten charakterisiert und am weitesten verbreitet ist das Enzym, das sich aus einer α_1 - und einer β_1 -Untereinheit zusammensetzt. Die universelle Bedeutung von den beiden später klonierten Untereinheiten α_2 und β_2 wurde in Frage gestellt, weil diese nur beim Menschen (α_2) bzw. bei der Ratte (β_2) und sonst bei keiner anderen Spezies in voller Länge kloniert werden konnten (Denninger und Marletta 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die Klonierung von der ersten vollständigen orthologen Sequenz der α_2 -Untereinheit aus der Ratteniere gelungen. Es zeigt sich, dass die α_2 -Untereinheit mit einer Aminosäureähnlichkeit von 90 % zwischen Ratte und Mensch sogar stärker zwischen den Spezies konserviert ist als die α_1 -Untereinheit (88 % Aminosäureähnlichkeit). Der ähnliche Grad der Konservierung von α_1 - und α_2 -Untereinheiten in der Evolution spricht dafür, dass diese Untereinheiten eine ähnlich wichtige generelle Rolle spielen. Die β_2 -Untereinheit ist weit

weniger zwischen den Spezies konserviert (78 %). Dies spricht im Einklang mit der Hypothese von Denninger und Marletta für eine weniger universelle Bedeutung dieser Untereinheit. Die in vorangegangenen Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe identifizierte orthologe Sequenz der β_2 -Untereinheit des Menschen unterstützt die Hypothese, dass die β_2 -Untereinheit nicht bei allen Spezies die gleiche Bedeutung besitzt (Behrends et al. 1999, Behrends und Vehse 2000). Im folgenden sollen zunächst die Befunde zu der β_2 -Untereinheit der Ratte diskutiert werden. Anschließend soll auf die α_2 -Untereinheit und die klassische α_1 -Untereinheit eingegangen werden.

4.1. Charakterisierung eines Enzymkomplexes aus der neu klonierten β_2 -Untereinheit der Ratte

Die Guanylyl-Cyclase bildet zusammen mit der Adenylyl-Cyclase die Familie der Nukleotid-Cyclasen (Hurley 1998, Liu et al. 1997). Innerhalb dieser Familie sind die katalytischen Domänen stark konserviert. Der katalytische Bereich aller bisher bekannten humanen Nukleotid-Cyclasen und der dazu homologen bakteriellen Adenylyl-Cyclasen wird von mindestens zwei katalytischen Domänen gebildet (Hurley 1998). Humane Adenylyl-Cyclasen besitzen zwei ähnliche, aber nicht identische katalytische Domänen auf einer Polypeptidkette, die mit C1 bzw. C2 bezeichnet werden. Sie bilden ein "Pseudo-Heterodimer" (Denninger und Marletta 1999). Die bisher beim Menschen isolierten löslichen Guanylyl-Cyclasen sind Heterodimere aus der β_1 -Untereinheit und einer α -Untereinheit (Kamisaki et al. 1986, Russwurm et al. 1998).

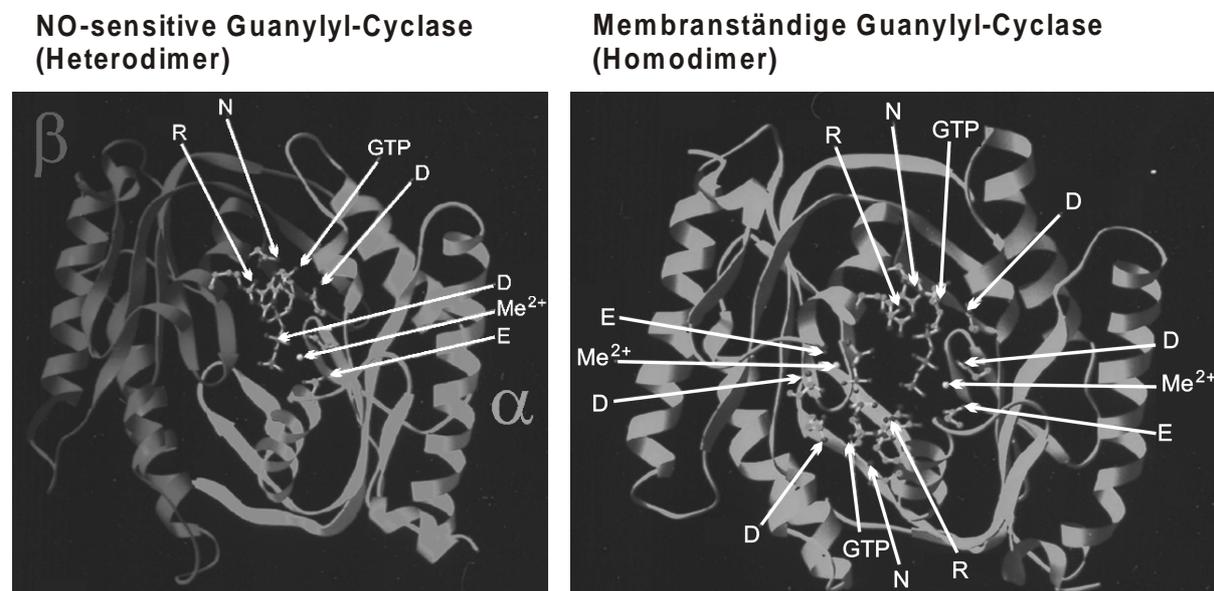


Abbildung 28: Bändermodelle der löslichen Guanylyl-Cyclase bestehend aus α_1 - und β_1 -Untereinheit (links) und der homodimeren, membranständigen Guanylyl-Cyclase (rechts). Für Bindung und Katalyse essentielle Aminosäuren sind gezeigt. Dargestellt sind die Polypeptidketten mit gebundenem Substrat GTP und Metallionen (aus Liu et al. 1997).

Einige bakterielle Adenylyl-Cyclasen und die membranständigen Guanylyl-Cyclasen bilden dagegen Homodimere oder Homooligomere (Chinkers und Wilson 1992, Pitt et al. 1992, Ochoa de Alda et al. 2000). Der katalytische Bereich der Adenylyl-Cyclase konnte von zwei Arbeitsgruppen als Kristallstruktur erhalten und untersucht werden (Zhang et al. 1997, Tesmer et al. 1997). Basierend auf diesen Strukturanalysen konnten Liu und Mitarbeiter Modelle der katalytischen Bereiche der humanen Adenylyl-Cyclase I, der homodimeren Adenylyl-Cyclase von *Dictyostelium discoideum*, der homodimeren retinalen Guanylyl-Cyclase und der heterodimeren löslichen Guanylyl-Cyclase bilden (Liu et al. 1997). Ein Teil der von Liu und Mitarbeitern aufgestellten Strukturmodelle der prototypischen Nukleotid-Cyclasen sind als Bändermodell in Abbildung 28 gezeigt.

Anhand der Kristallstrukturen konnten Aminosäuren identifiziert werden, die für die spezifische Nukleotidbindung der Adenylyl-Cyclasen und der Guanylyl-Cyclasen essentiell sind (Liu et al. 1997, Tesmer et al. 1997, Zhang et al. 1997). Tesmer und Mitarbeiter konnten ein Lysinrest und ein Aspartatrest in der C2 Domäne identifizieren (K923 bzw. D1000 der Adenylyl-Cyclase I), die Wasserstoffbrücken zu den Aminogruppen N-1 und N-6 des Adenin-Ringes bilden (Tesmer et al. 1997). Diese sind bei der Guanylyl-Cyclase durch einen Glutamatrest und einen Cysteinrest ersetzt (E473 bzw. C541 der β_1 -Untereinheit des Rindes), die mit den N-2 bzw. O-6 Atomen des Guanin-Ringes interagieren könnten (Sunahara et al. 1998, Liu et al. 1997). Ein Argininrest (R594 der α_1 -Untereinheit des Rindes) soll für die Erkennung des Guanin-Ringes wichtig sein (Zhang et al. 1997). Dieser ist bei den Adenylyl-Cyclasen durch einen Glutaminrest (Q416 der Adenylyl-Cyclase I) ersetzt. Durch Austausch dieser drei kritischen Aminosäuren kann bei Guanylyl-Cyclasen eine komplette Umkehr der Nukleotidspezifität erreicht werden, während eine Adenylyl-Cyclase durch den Austausch der kritischen Aminosäuren in eine unspezifische Nukleotid-Cyclase umgewandelt wird (Sunahara et al. 1998, Tucker et al. 1998). Anhand der Aminosäuren, welche die Substratspezifität der Nukleotid-Cyclasen definieren, konnten neu identifizierte Nukleotid-Cyclasen eines Bakteriums und verschiedener Protozoen der Familie der Guanylyl-Cyclasen zugeordnet werden (Linder et al. 1999, Ochoa de Alda et al. 2000). Die innerhalb der Arbeitsgruppe neu klonierte β_2 -Untereinheit des Menschen und die β_2 -Untereinheit der Ratte besitzen ebenfalls die für die Guanylyl-Cyclasen spezifischen Aminosäuren, welche eine eindeutige Zuordnung der β_2 -Untereinheiten zu der Klasse der Guanylyl-Cyclasen erlauben. Eine solche Zuordnung aufgrund der Aminosäuresequenz ist daher von Bedeutung, da für die β_2 -Untereinheit bisher noch keine katalytische Aktivität nachgewiesen worden war (Koesling und Friebe 1999, Denninger und Marletta 1999).

Es war unklar, ob die β_2 -Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase mit einer anderen Untereinheit ein Heterodimer bildet, also zu den heterodimeren Nukleotid-Cyclasen zählt oder ob diese Untereinheit zu den homodimeren Formen gehört. Für die α_2 -Untereinheit wurde bald nach ihrer Klonierung durch Koexpression der cDNAs gezeigt, dass sie mit der β_1 -Untereinheit ein funktionell aktives Heterodimer bildet (Harteneck et al. 1991). Eine alleinige Expression der β_2 -Untereinheit und Koexpression dieser Untereinheit mit den bereits bekannten Untereinheiten führte

dagegen nicht zum Nachweis von katalytischer Aktivität (Yuen et al. 1990, Koesling 1995, Denninger und Marletta 1999). Koesling konnte zeigen, dass es sich bei dem von Yuen et al. 1990 isolierten Klon der β_2 -Untereinheit um eine unvollständige Spleißvariante handelte und konnte eine cDNA mit einem zusätzlichen aminoterminalen Exon isolieren (Koesling 1995). Dieses Exon wies deutliche Homologien zu einem Bereich der β_1 -Untereinheit auf, für den durch Experimente mit Deletionsmutanten klar gezeigt werden konnte, dass er für die Bindung der prosthetischen Hämgruppe und die Aktivierung des Enzyms durch NO essentiell ist (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996). Allerdings führte auch die Koexpression dieser neuen β_2 -Untereinheit mit den bereits bekannten Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten nicht zur Bildung eines katalytisch aktiven Enzyms (Koesling 1995). Überraschend zeigten Gupta et al. 1997 NO-sensitive Guanylyl-Cyclase-Aktivität nach Koexpression der β_2 -Untereinheit mit der α_1 -Untereinheit. Dieser Befund ist schwer zu erklären, da dem von Gupta verwendeten Klon der aminoterminalen Abschnitt fehlt, der in Analogie zur β_1 -Untereinheit entscheidend für die Bindung der prosthetischen Hämgruppe und die NO-Sensitivität des Enzyms sein sollte (Koesling 1995). Die Ergebnisse konnten allerdings bisher auch von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden (Koesling und Friebe 1999, Denninger und Marletta 1999).

	IC1	IC2	IIC2	B-SA1	B-SB1	*CYAG	*RGC1	R-SB2	H-SB2	H-SA2	*MDB3	CEB3
IC1	100											
IC2	26	100										
IIC2	25	60	100									
B-SA1	35	21	20	100								
B-SB1	30	27	26	41	100							
*CYAG	25	25	27	27	23	100						
*RGC1	27	23	24	46	37	27	100					
R-SB2	29	25	25	50	43	29	49	100				
H-SB2	29	24	25	48	41	29	46	91	100			
H-SA2	34	23	20	78	42	28	46	50	47	100		
*MDB3	34	21	23	44	38	28	45	56	55	44	100	
CEB3	27	21	23	44	34	28	44	43	41	42	51	100

% Aminosäureähnlichkeit

Abbildung 29: Aminosäureähnlichkeiten der katalytischen Domänen von verschiedenen Adenylyl- (AC) und Guanylyl-Cyclasen (GC). Domänen, die homodimere katalytische Bereiche bilden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. IC1: C1 Domäne, AC I des Rindes; IC2: C2 Domäne, AC I des Rindes; IIC2: C2 Domäne, AC II der Ratte; B-SA1 und B-SB1: α_1 - bzw. β_1 -Untereinheit der löslichen GC vom Rind; CYAG: Dictyostelium discoideum AC; RGC1: retinale GC; R-SB2 und H-SB2: β_2 -Untereinheit der löslichen GC von Ratte bzw. Mensch; H-SA2: α_2 -Untereinheit der löslichen GC; MDB3: β_3 -Untereinheit der GC von Manduca sexta; CEB3: β_3 -Untereinheit der GC von C. elegans.

Nighorn und Mitarbeiter konnten bei dem Insekt Manduca sexta, neben einer α_1 - und einer β_1 -Untereinheit, die zusammen ein NO-sensitives Heterodimer bildeten (Nighorn et al. 1998), eine weitere, sogenannte β_3 -Untereinheit klonieren (Nighorn et al. 1999). Diese β_3 -Untereinheit von Manduca sexta war in Abwesenheit einer zweiten Untereinheit in Gegenwart von Mn^{2+} als Kofaktor aktiv, aber relativ insensitive gegenüber NO. Ein Vergleich der Aminosäureähnlichkeiten der katalytischen Domänen der von der Arbeitsgruppe klonierten humanen β_2 -Untereinheit und der β_2 -

Untereinheit der Ratte mit der β_3 -Untereinheit von *Manduca sexta* und Sequenzen anderer Nukleotid-Cyclasen ist in Abbildung 29 dargestellt. Für die β_2 -Untereinheiten von Mensch und Ratte zeigte sich die höchste Sequenzverwandtschaft zur β_3 -Untereinheit von *Manduca sexta* (55 % bzw. 56 %).

Wie alle bisher beschriebenen β -Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase weist die β_3 -Untereinheit von *Manduca sexta* das Startmotiv "MYG" auf, das in den β -Untereinheiten auch evolutionär weit entfernter Spezies wie der Fruchtfliege *Drosophila* (Genbank: AAA87941) oder des Medaka-Fisches *Oryzias latipes* (Genbank: AB000850) konserviert ist. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte ein Klon der β_2 -Untereinheit der Ratte mit dem Startmotiv "MYG" isoliert werden und es konnte gezeigt werden, dass der von Koesling isolierte Klon ebenso wie der ursprünglich von Yuen et al. 1990 isolierte Klon eine inkomplette Sequenz darstellt. Dieser neu isolierte Klon ist im Vergleich zu der von Yuen klonierten β_2 -Untereinheit aminoterminal um 64 Aminosäuren verlängert und ist im Vergleich zu dem von Koesling isolierten Klon um 10 Aminosäuren verkürzt und weist damit am aminoterminalen Ende exakt die gleiche Länge und das gleiche Startsequenzmotiv auf wie die β_1 -Untereinheit. Für die β_1 -Untereinheit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine aminoterminaler Verlängerung um 36 Aminosäuren (Lee et al. 2000) als auch eine Deletion um 64 Aminosäuren (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996) zu einer Aufhebung der NO-Sensitivität des Enzyms führt. Tatsächlich konnten wir mit dem neu isolierten Klon der β_2 -Untereinheit NO-sensitive Guanylyl-Cyclase-Aktivität nachweisen. Ähnlich wie bei der β_3 -Untereinheit aus *Manduca sexta*, war die Enzymaktivität in Abwesenheit einer weiteren Untereinheit nachweisbar, wobei in beiden Fällen Mn^{2+} als Kofaktor zum Nachweis von enzymatischer Aktivität erforderlich war. Die auffälligen Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen der katalytischen Domänen und die Ähnlichkeit in den biochemischen Eigenschaften zwischen der β_2 -Untereinheit und der β_3 -Untereinheit des Insekts *Manduca sexta* weisen darauf hin, dass es sich hierbei möglicherweise um orthologe Sequenzen bei verschiedenen Spezies handelt, wobei die evolutionäre Entfernung von Insekten und Säugern eine eindeutige Zuordnung allerdings nicht zulässt. Mit dem Nachweis von katalytischer Aktivität in Abwesenheit einer weiteren Untereinheit konnten wir zeigen, dass die β_2 -Untereinheit die erste NO-sensitive, lösliche Guanylyl-Cyclase bei Säugern mit einer homomer angelegten katalytischen Domäne ist. Die bereits diskutierte Homologie-Modellbildung von heterodimeren und homodimeren Nukleotid-Cyclasen anhand der Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Adenylyl-Cyclase (Liu et al. 1997) bietet deutliche Hinweise darauf, dass die β_2 -Untereinheit zu der Familie der homodimeren Nukleotid-Cyclasen zu zählen ist. Bei den pseudoheterodimeren Adenylyl-Cyclasen und den heterodimeren Guanylyl-Cyclasen liegen die für die Katalyse essentiellen Aminosäuren auf verschiedenen Abschnitten einer Polypeptidkette oder auf verschiedenen Polypeptidketten (α und β). Dagegen enthalten die homodimere Adenylyl-Cyclase, die membranständige Guanylyl-Cyclase, die β_2 -Untereinheit und die β_3 -Untereinheit von *Manduca sexta* alle für die Katalyse essentiellen Aminosäuren auf einer Polypeptidkette eines katalytischen Abschnittes. Dies unterstützt unsere

experimentellen Befunde, nach denen es sich bei der β_2 -Untereinheit um die erste homodimer aufgebaute NO-sensitive Guanylyl-Cyclase bei Säugern handelt.

Aufgrund der Symmetrie der katalytischen Domäne der homodimeren Nukleotid-Cyclase können diese zwei katalytische Zentren bilden (Hurley 1998). Dadurch, dass bei heterodimeren Nukleotid-Cyclasen die essentiellen Aminosäuren auf zwei katalytische Domänen verteilt sind, bilden diese nur noch ein katalytisches Zentrum und eine pseudosymmetrische zweite Bindungstasche, welche die Fähigkeit zur Katalyse nicht besitzt (Hurley 1998, Liu et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Forskolin, ein Aktivator der humanen Adenylyl-Cyclasen, an diese zweite Bindungstasche der Adenylyl-Cyclase bindet (Tesmer et al. 1997, Zhang et al. 1997). Drei Aminosäuren sind für die Forskolin-Bindung essentiell (Zhang et al. 1997, Tesmer et al. 1997). Dies sind ein Aspartat D418 aus der C1 Domäne und ein Lysin L897 und ein Serin S927 aus der C2 Domäne der Adenylyl-Cyclase I. Die Asymmetrie der Adenylyl-Cyclasen ist essentiell für diesen Regulationsmechanismus, der daher auch auf die heterodimer angelegten Adenylyl-Cyclasen beschränkt ist (Liu et al. 1997, Hurley 1998). Die α_1/β_1 -heterodimere, NO-sensitive Guanylyl-Cyclase weist ebenfalls eine pseudosymmetrische Bindungstasche mit unbekannter Funktion auf (Hurley 1998, Friebe et al. 1999). YC-1 konnte als NO-unabhängiger Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase identifiziert werden (Wu et al. 1995). Friebe et al. 1999 vermuten die Bindungsstelle von YC-1 analog zu Forskolin in der pseudosymmetrischen Bindungstasche des katalytischen Bereiches. Sie konnten durch Mutation des Cysteins 596 der α_1 -Untereinheit zu einem Serin ein Enzym erhalten, das sich unter nicht stimulierten Bedingungen ähnlich verhielt, wie das Wildtypenzym in der Anwesenheit von YC-1 (Friebe et al. 1999). Das Cystein 596 der α_1 -Untereinheit entspricht dem Aspartat 418 der Adenylyl-Cyclase I, das essentiell für die Forskolin-Bindung ist. Die Mutation des analogen Cysteins der β_1 -Untereinheit, das für die Bindung des Guanins essentiell ist, führte zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität (Friebe et al. 1999). Denninger und Mitarbeiter konnten in spektrometrischen Untersuchungen Hinweise auf eine Bindung von YC-1 in der Nähe der Häm-Bindungsdomäne der β_1 -Untereinheit gewinnen (Denninger et al. 2000). Untersuchungen mit YC-1 und dem neuen, strukturell verwandten BAY 41-2272 weisen hingegen darauf hin, dass sowohl BAY 41-2272 als auch YC-1 an die α -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase binden (Stasch et al. 2001, Becker et al. 2001). Unabhängig davon, ob YC-1 an die pseudosymmetrische Bindungstasche, in der Nähe der Häm-Bindungsdomäne oder an die α -Untereinheit bindet, stehen diese Theorien im Einklang mit unserem Befund, dass YC-1 und BAY 41-2272 nicht in der Lage sind, den homodimeren β_2 -Enzymkomplex zu stimulieren. Dieser bildet als homodimer aufgebaute Nukleotid-Cyclase keine pseudosymmetrische Bindungstasche und enthält keine α -Untereinheit.

Alle bislang untersuchten heterodimeren Formen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zeigen, dass die NO-vermittelte Steigerung der enzymatischen Aktivität durch die Bindung von NO an das Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe erfolgt (Wolin et al. 1982, Stone und Marletta 1996). Für die heterodimeren Isoformen konnte eine Aminosäure (Histidin 105) auf der β_1 -Untereinheit identifiziert werden, die essentiell für die Hämgruppen-Bindung ist (Wedel et al. 1994, Fan et al. 1998, Zhao und Marletta 1998). Dieses Histidin findet sich auch bei der β_2 -Untereinheit der Ratte innerhalb der konservierten Aminosäuresequenz. Die Sequenzhomologie im Bereich dieser kritischen Aminosäure lässt vermuten, dass auch der β_2 -Enzymkomplex eine Hämgruppe binden kann. Die prosthetische Hämgruppe der heterodimeren Guanylyl-Cyclase-Isoformen kann durch das Detergenz Tween 20 aus seiner Position innerhalb des Enzyms herausgelöst werden (Foerster et al. 1996). Dies führt dazu, dass eine Enzymaktivierung durch NO nicht mehr möglich ist. Diese NO-insensitive Guanylyl-Cyclase besitzt aber noch eine basale Enzymaktivität (Foerster et al. 1996). Die Anwesenheit von Tween 20 führte auch bei dem β_2 -Enzymkomplex zu einer vollständigen Aufhebung der NO-Sensitivität, ohne jedoch seine basale Enzymaktivität signifikant zu beeinflussen. Die mit Tween 20 vorbehandelten α/β -Heterodimere konnten mit der direkten Hämvorstufe Protoporphyrin IX stimuliert werden (Foerster et al. 1996, Friebe et al. 1997). Wolin et al. 1982 vermuteten, dass Protoporphyrin IX in die Hämbindungstasche gelangt und dort zu einer Stimulation der heterodimeren Guanylyl-Cyclasen führt. In Übereinstimmung mit diesen Daten zu den bisher bekannten Enzymkomplexen konnten wir zeigen, dass auch der mit Tween 20 vorbehandelte β_2 -Enzymkomplex in Anwesenheit von Protoporphyrin IX einen Anstieg in der enzymatischen Aktivität zeigt.

1995 wurde erstmals der inhibitorische Effekt von ODQ auf die NO-stimulierte heterodimere α_1/β_1 -Isoform der löslichen Guanylyl-Cyclase beschrieben (Garthwaite et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die durch ODQ vermittelte Inhibition der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch eine Oxidation des Eisenatoms der prosthetischen Hämgruppe erfolgt, so dass eine Aktivierung durch NO nicht mehr erfolgen kann (Schrammel et al. 1996, Zhao et al. 2000). Wie Tween 20, so hat auch ODQ keinen Einfluss auf die basale Enzymaktivität der heterodimeren Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclasen (Schrammel et al. 1996, Zhao et al. 2000). Für den β_2 -Enzymkomplex konnten wir zeigen, dass die Anwesenheit von ODQ zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der NO-stimulierten Enzymaktivität führte. In Bezug auf die inhibitorische Potenz von ODQ war kein Unterschied zwischen der α_1/β_1 - und der β_2 -Isoform nachweisbar. Die hier durchgeführten Experimente an der β_2 -Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, besonders im Vergleich zu den, in der Literatur beschriebenen, qualitativ identischen Ergebnissen mit den heterodimeren Isoformen, deuten darauf hin, dass die NO-Sensitivität der β_2 -Isoform der Ratte ebenfalls durch eine prosthetische Hämgruppe vermittelt wird.

Untersuchungen an heterodimeren α/β -Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Baculovirus/Sf9-System mit dem NO-Donor DEA/NO ergaben EC_{50} -Werte im Bereich zwischen 500 nM und 1270 nM DEA/NO (Russwurm et al. 1998, Hoenicka et al. 1999, Friebe et al. 1999). Diese Daten stimmen mit den von uns ermittelten Resultaten von etwa 420 nM DEA/NO für die α_1/β_1 -Isoform gut überein. Ein Vergleich der EC_{50} -Werte zwischen der heterodimeren Isoform und der homomeren β_2 -Isoform zeigte, dass die β_2 -Isoform einen EC_{50} -Wert von etwa 40 nM DEA/NO aufwies, also etwa eine Zehnerpotenz niedriger als dies in parallel durchgeführten Versuchen für die α_1/β_1 -Isoform ermittelt werden konnte. Die erhöhte NO-Affinität der β_2 -Isoform könnte mit dem unterschiedlichen Aufbau des katalytischen Zentrums erklärt werden, da Friebe et al. 1999 zeigen konnte, dass eine Veränderung innerhalb der katalytischen Domäne der α_1 -Untereinheit zu einem heterodimeren Enzymkomplex führte, der eine erhöhte NO-Affinität im Vergleich zur unveränderten heterodimeren Variante aufwies. Substrataffinitätsuntersuchungen für die β_2 -Isoform ergaben einen K_m -Wert von 375 μ M GTP, der in Anwesenheit von DEA/NO deutlich verringert war (136 μ M GTP). Die Substrataffinität der β_2 -Isoform ist im Vergleich zu heterodimeren α/β -Isoformen (etwa 100 μ M GTP unter basalen Bedingungen, Russwurm et al. 1998) verringert, deckt sich aber mit Ergebnissen, die für die homodimere, membrangebundene Guanylyl-Cyclase A erhalten wurden (Wedel et al. 1997).

Die Mutagenese eines Glutamats innerhalb der katalytischen Domäne der homodimeren membrangebundenen Guanylyl-Cyclase A zu einem Alanin (GC-A E974A) führte zu einem konstitutiv aktiven Enzym, das nicht mehr durch seinen Liganden ANP reguliert werden konnte (Wedel et al. 1997). Die Mutagenese des analogen Glutamats in der katalytischen Domäne der β_2 -Isoform (β_2 E596A) führte zu einer drastischen Erhöhung der maximalen Enzymaktivität, sowohl in Abwesenheit als auch Anwesenheit von DEA/NO. Messungen mit YC-1, Tween 20, Protoporphyrin IX oder ODQ zeigten keine qualitativen Unterschiede im Vergleich zur unveränderten β_2 -Isoform. Die Substratabhängigkeit von β_2 E596A wies, wie die unveränderte β_2 -Isoform, einen linearen Verlauf in der Lineweaver-Burk-Darstellung auf. Allerdings führte die Mutation zu einer deutlichen Verringerung der Substrataffinität unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen. Ein vergleichbares Ergebnis konnten Dealwis et al. 1995 mit einer Punktmutante der alkalischen Phosphatase aus *Escherichia coli* zeigen. Die erhöhte katalytische Aktivität dieser Mutante wurde mit einer schnelleren Freisetzung des enzymatischen Produktes als Resultat der geringeren Substrataffinität erklärt (Dealwis et al. 1995). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für den β_2 E596A-Enzymkomplex denkbar.

Die theoretische Analyse der Aminosäuresequenz der β_2 -Untereinheit im Vergleich zu homo- und heterodimeren Nukleotid-Cyclasen und die Messung von NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase-Aktivität der β_2 -Untereinheit in der Abwesenheit einer weiteren Untereinheit deuten übereinstimmend darauf hin, dass die β_2 -Untereinheit zu der Familie der homomer aufgebauten Nukleotid-Cyclasen zu

rechnen ist und ein Homodimer aus zwei identischen β_2 -Untereinheiten aufbaut. Die Bildung eines höher geordneten Enzymkomplexes, beispielsweise eines Homotetramers, ist allerdings ebenfalls möglich. Analog ist auch für die homomere membranständige Guanylyl-Cyclase nicht geklärt, wie viele identische Untereinheiten am Aufbau eines Enzymkomplexes beteiligt sind, obwohl in der Literatur meist vom einfachsten Fall der Bildung eines Homodimers ausgegangen wird. In der zusammenfassenden Abbildung 30 ist auch für den β_2 -Enzymkomplex die einfachste Möglichkeit der Homodimerbildung angenommen.

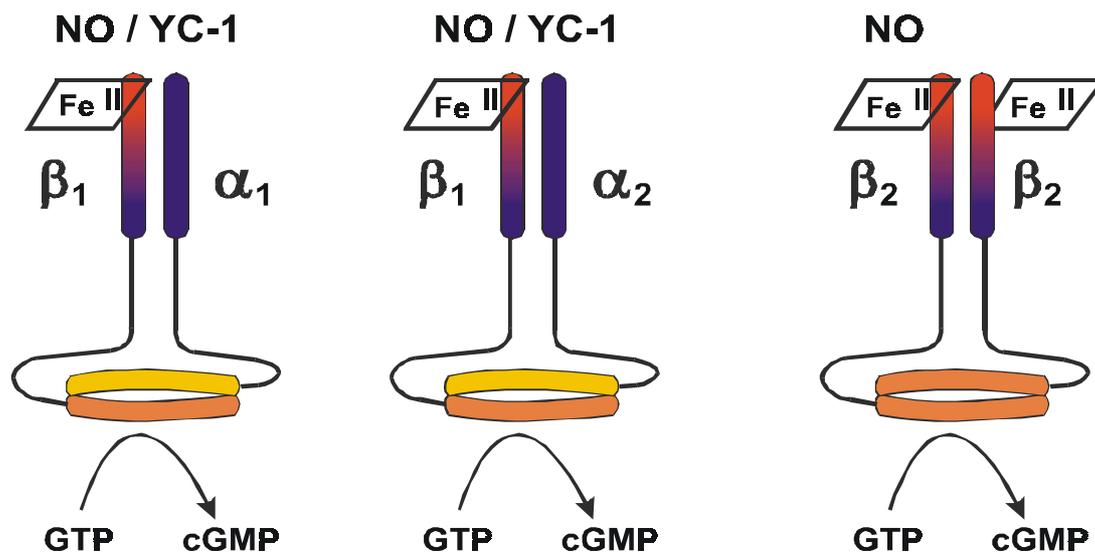


Abbildung 30: Schematische Darstellung von Guanylyl-Cyclase-Isoformen entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (vgl. Abb. 2).

4.2. Bedeutung des Carboxyterminus der β_2 -Untereinheit der Ratte

Die β_2 -Untereinheit der Ratte besitzt an ihrem carboxyterminalen Ende ein Isoprenylierungsmotiv (CVVL). Der Leucinrest an der letzten Position deutet auf die kovalente Bindung eines Geranylgeranylrestes an das Schwefelatom des Cysteins hin (Gelb et al. 1998). Dabei werden die letzten drei Aminosäuren abgespalten (Parish und Rando 1996, Gelb et al. 1998). Eine Methyl-Gruppe kann an die frei werdende Carboxylgruppe des Cysteins übertragen werden. Durch diese Isoprenylierung wird eine Lokalisation an der Membran ermöglicht. Bei der β_2 -Untereinheit der Ratte liegen bezüglich der Bedeutung der potentiellen Isoprenylierungsstelle und der intrazellulären Lokalisation widersprüchliche Angaben vor. Während Gupta und Danziger in einem Kongressbeitrag eine Lokalisation der β_2 -Untereinheit an der basolateralen Membran von Nierentubuluszellen berichteten (Gupta und Danziger 1998), fanden Mundel und Mitarbeiter die β_2 -Untereinheit bei immunhistochemischen Untersuchungen der Niere ausschließlich in den Hauptzellen der Sammelrohre im Cytosol gelöst (Mundel et al. 1995). Eine Computeranalyse der Aminosäuresequenz der β_2 -Untereinheit der Ratte ergab die folgenden Lokalisationswahrscheinlichkeiten: 26 %

Cytoplasma, 17 % sekretorische Vesikel, 13 % Kern, 13 % Mitochondrien, 9 % endoplasmatisches Retikulum, 9 % Plasmamembran, 4 % Cytoskelett, 4 % Golgi-Apparat, 4 % Vakuolen (Nakai und Kanehisa 1992). Unsere Ergebnisse im Baculovirus/Sf9-Expressionssystem ließen keine eindeutige Aussage über die Lokalisation des β_2 -Enzymkomplexes zu. Sowohl die unveränderte β_2 -Isoform als auch die mutierte Form β_2 E596A zeigten eine ausgeglichene Verteilung zwischen cytosolischer und membranärer Fraktion infizierter Sf9-Zellen. Von uns durchgeführte Untersuchungen mit Hilfe von Fusionsproteinen der β_2 -Untereinheit der Ratte mit dem Grün-Fluoreszierenden-Protein aus *Aequorea victoria* in HEK-293 Zellen sprechen für eine überwiegend cytosolische Lokalisation, schließen eine teilweise membranständige Lokalisation der β_2 -Untereinheit aber nicht aus. Um die Frage der subzellulären Lokalisation und einer möglichen Isoprenylierung der β_2 -Untereinheit eingehender zu untersuchen stellten wir zwei weitere Mutanten der β_2 -Untereinheit der Ratte her. Durch die Mutagenese eines Nukleotids in der cDNA im carboxyterminalen Bereich der β_2 -Untereinheit entsteht ein Stop-Codon und es kommt zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese. Dies resultiert in einem Protein, das um 45 Aminosäuren verkürzt ist ($\beta_2\Delta C_{45}$) und dem die fragliche Isoprenylierungssequenz fehlt. Die Mutagenese des Cysteins innerhalb des Isoprenylierungsmotivs CVVL in ein Serin führt ebenfalls zu einer Aufhebung einer möglichen Isoprenylierbarkeit, wobei hier innerhalb der β_2 -Untereinheit nur ein Schwefel- gegen ein Sauerstoffatom ausgetauscht wurde (β_2 C739S). Die Mutagenese des entsprechenden Cysteins in ein Serin führt bei vielen Enzymen, die eine Isoprenylierungssequenz besitzen, zu einer cytosolischen Lokalisation der exprimierten Proteine (Zhang und Casey 1996, De Angelis und Braun 1994). Untersuchungen der enzymatischen Aktivitäten dieser beiden β_2 -Mutanten in Gegenwart von Mn^{2+} zeigten keine veränderte Verteilung zwischen cytosolischer und membranärer Fraktion im Vergleich zur unveränderten β_2 -Isoform und β_2 E596A. Weitere Untersuchungen von $\beta_2\Delta C_{45}$ und β_2 C739S ergaben überraschend, dass beide β_2 -Varianten basale und NO-stimulierbare enzymatische Aktivität auch in Gegenwart von Mg^{2+} aufwiesen. Die enzymatische Aktivität konnte hier fast ausschließlich in der cytosolischen Fraktion von infizierten Sf9-Zellen gefunden werden. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die β_2 -Isoform ohne die Isoprenylierungssequenz tatsächlich eher eine cytosolische Lokalisation aufweist. Allerdings ist unklar, weshalb diese cytosolisch lokalisierte Enzymaktivität nur in Anwesenheit von Mg^{2+} zu finden ist, wohingegen in Anwesenheit von Mn^{2+} eine indifferente Verteilung der Enzymaktivität nachzuweisen ist. Der überraschende Befund, dass eine Punktmutation innerhalb der Isoprenylierungssequenz eine Veränderung in der Kationenakzeptanz hervorruft, deutet auf eine Veränderung innerhalb der katalytischen Domäne hin, wie das für die enzymatische Aktivität boviner Rhodopsin-Kinase gezeigt werden konnte, die von der Isoprenylierung abhängig ist (Inglese et al. 1992). Wir konnten mit unseren Experimenten mit Fusionsproteinen und Mutanten der β_2 -Untereinheit zeigen, dass das Isoprenylierungsmotiv innerhalb der β_2 -Untereinheit eine wichtige

Bedeutung für die Akzeptanz des Kofaktors Mg^{2+} hat. Inwieweit diesem Effekt tatsächlich eine Isoprenylierung zu Grunde liegt wird zur Zeit innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht.

4.3. Charakterisierung der α_2 -Untereinheit der Ratte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, ein Ortholog der α_2 -Untereinheit des Menschen bei einer anderen Spezies zu klonieren. Es zeigte sich, dass die α_2 -Untereinheit mit einer Aminosäureähnlichkeit von 90 % zwischen Ratte und Mensch sogar stärker zwischen den Spezies konserviert ist, als die α_1 -Untereinheit (88 % Aminosäureähnlichkeit). Der ähnliche Grad der Konservierung von α_1 - und α_2 -Untereinheiten in der Evolution spricht dafür, dass beide Untereinheiten eine wichtige Rolle spielen. Die biochemische Charakterisierung der neu klonierten α_2 -Untereinheit der Ratte nach Überexpression in Sf9-Zellen zeigte eine Aktivierbarkeit des Enzyms durch NO und YC-1. Die biochemischen Eigenschaften der heterodimeren α_2/β_1 -Enzymkomplexe von Ratte und Mensch unterscheiden sich dabei nicht. So ist der EC_{50} -Wert für DEA/NO von 547 nM für die α_2 -Untereinheit der Ratte in guter Übereinstimmung mit den Werten, die für die humane α_2 -Untereinheit ermittelt wurden (Russwurm et al. 1998). Die Untersuchungen der Substratabhängigkeit des α_2/β_1 -Enzymkomplexes der Ratte ergab einen K_m -Wert von 216 μ M GTP. Dieser Wert stimmt in etwa mit dem Wert überein, den Russwurm et al. 1998 an dem aufgereinigten humanen α_2/β_1 -Enzymkomplex ermitteln konnte (106 μ M GTP). Die gezeigte biochemische Übereinstimmung deckt sich mit der hohen Sequenzübereinstimmung der orthologen α_2 -Untereinheiten bei beiden Spezies.

In Übereinstimmung mit den Angaben für die humane α_2 -Untereinheit, zeigt die α_2 -Untereinheit der Ratte im aminoterminalen Drittel (Aminosäuren 1 - 240) gegenüber der α_1 -Untereinheit der Ratte (Aminosäuren 1 - 206) eine Aminosäureähnlichkeit von 27 % (Koesling und Friebe 1999). Trotz dieses deutlichen Sequenzunterschiedes zeigte der Vergleich von gereinigtem α_2/β_1 - mit gereinigtem α_1/β_1 -heterodimeren Enzym nach Überexpression in Sf9-Zellen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität gegenüber NO, die kinetischen Eigenschaften oder die Beeinflussbarkeit durch Modulatoren wie YC-1 (Russwurm et al. 1998). Dies spricht dafür, dass das aminoternale Drittel der α -Untereinheiten für diese Eigenschaften der Enzymisofornen nicht von Bedeutung ist. Der entsprechende Abschnitt zeigte zwischen den Orthologen der α_2 -Untereinheit eine Aminosäureähnlichkeit von 87 % (gegenüber 80 % des entsprechenden Abschnitts zwischen den α_1 -Orthologen). Der hohe Grad der Konservierung des aminoterminalen Bereichs der α_2 -Untereinheit weist auf eine wichtige Funktion dieses Sequenzabschnittes hin. Eine aminoternale Deletionen der α_2 -Untereinheit um dieses aminoternale Drittel (247 Aminosäuren) führte nach Koexpression mit der β_1 -Untereinheit zu einem Enzymkomplex mit erhaltener Sensitivität gegenüber NO und YC-1. Dies ist insofern ein überraschendes Ergebnis als die Deletion von nur 131 Aminosäuren des aminoterminalen Bereiches der α_1 -Untereinheit nach Koexpression mit der β_1 -Untereinheit in COS-Zellen zu einem Enzym mit aufgehobener NO-Sensitivität führte (Wedel et al.

1995). Allerdings war diese Deletionsmutante der α_1 -Untereinheit nach Koexpression mit der β_1 -Untereinheit in Sf9-Zellen und Reinigung des Enzymkomplexes schwach durch NO aktivierbar, während eine Deletion der β_1 -Untereinheit um 64 Aminosäuren zu einem kompletten Verlust der NO-Sensitivität führte (Foerster et al. 1996). Unser Ergebnis einer erhaltenen NO-Sensitivität trotz aminoterminaler Deletion von 104 bzw. 247 Aminosäuren der α_2 -Untereinheit deutet darauf hin, dass dieser Abschnitt zur Bindung einer prosthetischen Hämgruppe und für die Aktivierung durch NO nicht erforderlich ist. Untersuchungen anhand von Punktmutanten der α_1 - und β_1 -Untereinheit im aminoterminalen Bereich deuten ebenfalls darauf hin, dass der aminoterminal Bereich der β_1 -Untereinheit, nicht aber der α_1 -Untereinheit entscheidend für die Bindung einer prosthetischen Hämgruppe und die Aktivierung durch NO ist (Friebe et al. 1997). Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden von Zhao und Marletta, die durch Expression in E. coli zeigen konnten, dass der aminoterminal Abschnitt der β_1 -Untereinheit für die Bindung der prosthetischen Hämgruppe hinreichend ist (Zhao und Marletta 1997). Eine Deletion der aminoterminalen Hälfte (401 Aminosäuren) der α_2 -Untereinheit der Ratte führte hingegen zu einem vollständigen Verlust der NO- und YC-1-Sensitivität nach Koexpression mit der β_1 -Untereinheit im Baculovirus/Sf9-System. Eine basale Enzymaktivität war noch vorhanden, aber die Substrataffinität zeigte sich deutlich verringert im Vergleich zu dem unveränderten α_2/β_1 -Enzymkomplex. Dies steht in Übereinstimmung mit den von Wedel et al. 1995 ermittelten Resultaten, wonach eine Deletion der aminoterminalen Aminosäuren 1 - 366 der humanen α_1 -Untereinheit zu einem vollständigen Verlust der NO-Sensitivität führte, ohne aber die basale Enzymaktivität aufzuheben. Bei einem direkten Vergleich der NO-sensitiven α_2 -Deletionsmutanten fiel auf, dass $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ in Anwesenheit von NO eine ausgeprägtere zusätzliche Stimulation durch YC-1 zeigte als $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$. Anhand von Messungen der enzymatischen Aktivitäten in Abhängigkeit der YC-1-Konzentration zeigte sich sowohl unter basalen Bedingungen als auch in Anwesenheit von NO eine deutlich höhere maximale Enzymaktivität für $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ unter maximaler YC-1-Konzentration. Dabei blieb die Affinität gegenüber YC-1 unverändert. Dieser Effekt kann nicht auf eine unterschiedliche Stärke der Proteinexpression zurückgeführt werden, da hier in Kontrollversuchen eine gleichmäßige Expression von $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ gezeigt werden konnte. Die Befunde deuten darauf hin, dass der Bereich um Aminosäure 247 der α_2 -Untereinheit für die vollständige Aktivierung der α_2/β_1 -Isoform durch YC-1 wichtig ist. Der Bereich scheint hingegen für die NO-vermittelte Stimulation von α_2/β_1 keine Rolle zu spielen, da die Enzymaktivität bei maximaler NO-Konzentration zwischen $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ keine Unterschiede aufwies. Der Enzymkomplex $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ war gegenüber NO und YC-1 insensitiv, was darauf schließen lässt, dass der Bereich zwischen Aminosäure 247 und 401 der α_2 -Untereinheit der Ratte essentiell für eine Sensitivität gegenüber NO und YC-1 ist. Wir konnten zeigen, dass der $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ -Enzymkomplex noch eine basale katalytische Aktivität besitzt. Dies lässt darauf schließen, dass das katalytische Zentrum des $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ -Enzymkomplexes noch intakt ist. Da Zhao

und Marletta 1997 überzeugend dargelegt haben, dass der Aminoterminus der β_1 -Untereinheit hinreichend für die Bindung der prosthetischen Hämgruppe ist, führen wir die aufgehobene NO-Sensitivität von $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ darauf zurück, dass die Signalübertragung von der NO-bindenden Domäne zur katalytischen Domäne gestört ist. Zur Zeit führen wir innerhalb der Arbeitsgruppe Versuche an dem $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ -Enzymkomplex durch, die durch spektrometrische Untersuchungen theoretisch zeigen sollten, dass dieser Enzymkomplex noch eine prosthetische Hämgruppe binden kann.

Neben seiner aktivierenden Wirkung auf die lösliche Guanylyl-Cyclase ist YC-1 ein unspezifischer Hemmstoff der Phosphodiesterase und besitzt eine geringe Bioverfügbarkeit (Friebe et al. 1998, Galle et al. 1999). Es ist gelungen mit BAY 41-2272 ein Derivat von YC-1 zu entwickeln, das mit einer höheren Potenz die Guanylyl-Cyclase aktiviert, keine unspezifische Wirkung auf Phosphodiesterasen hat und eine höhere Bioverfügbarkeit besitzt (Stasch et al. 2001a, Straub et al. 2001). Stasch et al. 2001 konnten zwei Cysteinreste (Cystein 238 und 243) innerhalb der aminoterminalen Region der α_1 -Untereinheit als Bindungsstelle für BAY 41-2272 identifizieren. Diese Region ist zwischen der α_1 - und der α_2 -Untereinheit nur gering konserviert, und nur eines der beiden Cysteine findet sich auch auf der α_2 -Untereinheit (Harteneck et al. 1991). Dies spricht gegen eine Bindung von BAY 41-2272 an die α_2 -Untereinheit und damit gegen einen stimulatorischen Effekt von BAY 41-2272 an der α_2/β_1 -Isoform. Unsere Untersuchungen konnten aber überraschend eine konzentrationsabhängige Stimulation des α_2/β_1 -Enzymkomplexes durch BAY 41-2272 zeigen. Dies ist der erste Nachweis, dass BAY 41-2272 beide heterodimere Formen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase stimulieren kann. Im direkten Vergleich zeigte sich eine geringgradig höhere Affinität von BAY 41-2272 für die α_1/β_1 -Isoform im Vergleich zur α_2/β_1 -Isoform.

Die unterschiedlichen Eigenschaften der Enzymkomplexe $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ und $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ nach YC-1-Stimulation veranlassten uns, auch für BAY 41-2272 analoge Untersuchungen anzustellen. Es ergab sich hierbei, dass der $\alpha_2\Delta N_{104}/\beta_1$ -Enzymkomplex in Anwesenheit einer maximalen BAY 41-2272-Konzentration eine höhere maximale Enzymaktivität aufwies als der $\alpha_2\Delta N_{247}/\beta_1$ -Enzymkomplex. Die EC_{50} -Werte für BAY 41-2272 waren zwischen diesen beiden Enzymkomplexen aber nicht verschieden. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen nach Stimulation mit YC-1 und bestätigt die Ergebnisse von Stasch et al. 2001, dass das YC-1-Derivat BAY 41-2272 an die α -Untereinheit bindet. Eine, durch die α -Untereinheit vermittelte Aktivierung des heterodimeren Enzymkomplexes durch YC-1 oder BAY 41-2272 steht auch in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, da wir zeigen konnten, dass der homomere β_2 -Enzymkomplex nicht durch YC-1 oder BAY 41-2272 stimuliert wird. Die mutierte Form $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ war auch gegenüber BAY 41-2272 insensitiv. Somit scheint der Bereich zwischen Aminosäure 247 und 401 der α_2 -Untereinheit für die Bindung von YC-1 und BAY 41-2272 verantwortlich zu sein. Ist dieser Bereich deletiert, so kommt es zu einer vollständigen Aufhebung der Sensitivität gegenüber NO, YC-1 und BAY 41-2272.

4.4. Bedeutung des Aminoterminus der α_1 -Untereinheit

Wedel et al. 1995 und Foerster et al. 1996 haben gezeigt, dass die Deletion des Aminoterminus der α_1 -Untereinheit (Aminosäure 1 – 131) zu einem fast vollständig NO-insensitiven Enzymkomplex führt. Diese Ergebnisse stehen in möglichem Widerspruch zu unseren Daten für den α_2/β_1 -Enzymkomplex, bei dem eine Deletion von 104 bzw. 247 aminoterminalen Aminosäuren der α_2 -Untereinheit nicht zu einer Aufhebung der NO-Sensitivität führte. Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede in den Ergebnissen auf spezifische Eigenheiten der α_2 -Untereinheit bzw. der α_1 -Untereinheit zurückzuführen sind, deletierten wir den aminoterminalen Bereich der humanen α_1 -Untereinheit um 236 Aminosäuren ($\alpha_1\Delta N_{236}$) und um 364 Aminosäuren ($\alpha_1\Delta N_{364}$).

Die Expression von $\alpha_1\Delta N_{236}$ im Baculovirus/Sf9-System mit der β_1 -Untereinheit resultierte in einem NO-sensitiven Enzym, das sich von der unveränderten α_1/β_1 -Variante biochemisch nicht unterschied. So konnte weder ein Unterschied in der Substrataffinität noch in der Sensitivität gegenüber NO ermittelt werden. Unser Befund steht damit im Gegensatz zu früher publizierten Ergebnissen (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996). Eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse kann die unterschiedliche Erzeugung der Deletionsmutanten sein. Die von uns durchgeführten aminoterminalen Deletionen der α_1 -Untereinheit wurden so hergestellt, dass sequenzinterne Methionine der α_1 -Untereinheit als neue Startmethionine genutzt wurden. Dieser Versuchsansatz variierte gegenüber dem von Wedel et al. 1995 gewählten Ansatz, in dem mittels PCR neue Methionine in die Sequenz der α_1 -Untereinheit eingeführt wurden, die dann als neue Startmethionine fungierten. Es ist denkbar, dass unser experimenteller Ansatz einen geringeren Einfluss auf die native Enzymstruktur hatte. Der Enzymkomplex $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ war hingegen nicht durch NO aktivierbar und wies eine deutlich verminderte Substrataffinität auf.

Während der Klonierungsarbeiten der α_1 -Deletionsmutanten erschien eine Arbeit, in der eine mögliche Bindungsstelle des neuen Modulators BAY 41-2272 beschrieben wurde (Stasch et al. 2001). Zwei Cysteinreste wurden als mögliche Bindungsstelle des neuen NO-unabhängigen Modulators BAY 41-2272 identifiziert (Stasch et al. 2001, Becker et al. 2001). Diese Arbeiten veranlassten uns, eine weitere Deletionsmutante zu klonieren, die diese mögliche Bindungsstelle bzw. die Cysteinreste nicht mehr enthielt. Die resultierende Deletionsmutante wurde mit $\alpha_1\Delta N_{259}$ bezeichnet. Die Expression von $\alpha_1\Delta N_{259}$ im Baculovirus/Sf9-System mit der β_1 -Untereinheit resultierte in einem NO-sensitiven Enzym. Um zu überprüfen, ob die beiden Cysteinreste tatsächlich essentiell für die Sensitivität des heterodimeren α_1/β_1 -Enzymkomplexes gegenüber BAY 41-2272 sind, führten wir Analysen mit BAY 41-2272 und YC-1 an den Deletionsmutanten durch. Zu unserer Überraschung zeigte sich, dass beide aminoterminalen Deletionsmutanten ($\alpha_1\Delta N_{236}/\beta_1$ und $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$) sensitiv gegenüber BAY 41-2272 und YC-1 waren. Die Deletion der Cysteinreste führte also nicht zu einer Aufhebung der BAY 41-2272-Sensitivität. Dieses Ergebnis spricht eindeutig gegen eine Beteiligung der Cysteinreste bei der Interaktion zwischen BAY 41-2272 und dem Enzymkomplex, da beide

Deletionsmutanten keine Unterschiede in der BAY 41-2272-Sensitivität und in der maximalen Aktivierbarkeit durch BAY 41-2272 im Vergleich zu dem unveränderten α_1/β_1 -Enzymkomplex zeigten. Wie auch schon für den Enzymkomplex $\alpha_2\Delta N_{401}/\beta_1$ gezeigt, so war auch die Deletionsmutante $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ insensitiv gegenüber BAY 41-2272 und YC-1. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass sich die Bindungsstelle für BAY 41-2272 eher im Bereich zwischen Aminosäure 259 und 364 der α_1 -Untereinheit befindet. Dabei ist anzunehmen, dass die Bindungsstellen von YC-1 und dem YC-1-Derivat BAY 41-2272 identisch sind, da Becker et al. 2001 zeigen konnten, dass die Bindung eines markierten BAY 41-2272-Derivates durch die Anwesenheit von YC-1 oder BAY 41-2272 gleichermaßen inhibiert wird.

Die Aufreinigung von α_1/β_1 und von $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ und die anschließende Analyse der Absorptionsspektren zeigte, dass eine Deletion der ersten 259 Aminosäuren der α_1 -Untereinheit die Bindung der Hämgruppe nicht beeinflusst. Dies bestätigt die Ergebnisse von Zhao und Marletta 1997, die den aminoterminalen Bereich der β_1 -Untereinheit als Bindungsstelle der prosthetischen Hämgruppe beschreiben und steht im Gegensatz zu den Befunden von Foerster et al. 1996, nach denen die vollständigen aminoterminalen Bereiche von α_1 und β_1 für die Bindung einer prosthetischen Hämgruppe notwendig sein sollen. Die typische Veränderung des Absorptionsspektrums in Anwesenheit von DEA/NO zeigte darüber hinaus, dass die prosthetische Hämgruppe von $\alpha_1\Delta N_{259}/\beta_1$ noch mit NO interagieren kann und damit die typische Verschiebung des Absorptionsmaximums von 431 nm auf 398 nm verursacht. Die spektrometrisch nachgewiesene Interaktion zwischen NO und der prosthetischen Hämgruppe war nicht überraschend, da die NO-Sensitivität dieser Deletionsmutante anhand der enzymatischen Untersuchungen von uns zuvor belegt werden konnte. Aktuelle Untersuchungen zielen darauf ab, den $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ -Enzymkomplex aufzureinigen und zu ermitteln, ob der Enzymkomplex noch eine prosthetische Hämgruppe besitzt und ob diese noch mit NO interagieren kann. Ein positives Ergebnis würde darauf hindeuten, dass der Bereich zwischen Aminosäure 259 und 364 der α_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase essentiell für die Signaltransduktion zwischen der Häm-bindenden Domäne und der katalytischen Domäne innerhalb des heterodimeren Enzymkomplexes ist.

Durch unsere Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die aminoterminalen Bereiche der α -Untereinheiten nicht essentiell für die Bindung der Hämgruppe oder für die Sensitivität der jeweiligen heterodimeren Enzymkomplexe gegenüber NO, YC-1 oder BAY 41-2272 sind. Denkbar wäre hingegen, dass die aminoterminalen Abschnitte der α -Untereinheiten eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Enzymisoformenten in der Zelle oder die Interaktion mit unterschiedlichen zellulären Proteinen vermitteln.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu Isoformen der löslichen Guanylyl-Cyclase, dem Rezeptor für Stickstoffmonoxid (NO) und NO-freisetzende Pharmaka, durchgeführt. Nach der klassischen Auffassung haben alle Isoformen der NO-aktivierten löslichen Guanylyl-Cyclase einen heterodimeren Aufbau aus einer α - und einer β -Untereinheit. Neben den beiden Untereinheiten, die die am weitesten verbreitete, heterodimere α_1/β_1 -Isoform aufbauen, konnten zwei weitere Untereinheiten identifiziert werden (α_2 und β_2). Die Bedeutung dieser beiden später klonierten Untereinheiten wurde in Frage gestellt, da die α_2 -Untereinheit nur bei einer Spezies kloniert werden konnte und für die β_2 -Untereinheit eine Beteiligung an einem funktionell aktiven Enzymkomplex nicht überzeugend dargelegt werden konnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals Enzymaktivität eines β_2 -Enzymkomplexes zeigen. Dieser Enzymkomplex aus identischen Untereinheiten ist das erste Beispiel einer homomer angelegten NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase bei Säugern. Darüber hinaus ist die Klonierung der ersten vollständigen orthologen Sequenz von α_2 gelungen. Es zeigte sich, dass die α_2 -Untereinheit mit einer Aminosäureähnlichkeit von 90 % zwischen Ratte und Mensch stärker zwischen den Spezies konserviert ist als die α_1 -Untereinheit (88 % Aminosäureähnlichkeit) oder der β_2 -Untereinheit (78 % Aminosäureähnlichkeit). Der hohe Grad der Konservierung der α_2 -Untereinheiten in der Evolution spricht dafür, dass diese Untereinheit eine ähnlich wichtige generelle Rolle spielt wie die α_1 -Untereinheit. Mit Hilfe von Deletionsmutanten der α -Untereinheiten konnte der Angriffspunkt von neuen Aktivatoren des heterodimeren Enzyms eingegrenzt werden. Die Hauptbefunde der vorliegenden Arbeit sind im folgenden aufgeführt:

1. Die β_2 -Untereinheit der Ratte bildet in der Abwesenheit einer weiteren Untereinheit und in der Gegenwart von Manganionen (Mn^{2+}) ein durch NO aktivierbares Enzym. Damit konnte erstmals das Vorkommen einer homomer angelegten, NO-sensitiven löslichen Guanylyl-Cyclase bei Säugern gezeigt werden.
2. Die α_2 -Untereinheit ist zwischen Mensch und Ratte in Bezug auf die Aminosäuresequenz und die biochemischen Eigenschaften gut konserviert und bildet mit der β_1 -Untereinheit ein heterodimeres NO-sensitives Enzym.
3. Der α_2/β_1 -Enzymkomplex kann durch den NO-unabhängigen Modulator BAY 41-2272 aktiviert werden.
4. Der Bereich von Aminosäure 247-401 (α_2) bzw. 259-364 (α_1) ist essentiell für die Sensitivität des heterodimeren Enzymkomplexes gegenüber NO, YC-1 und BAY 41-2272.

6. Literaturverzeichnis

- Aaji C, Borst P (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochem Biophys Acta* 269: 192-200
- Andrew PJ, Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-531
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3203-3207
- Ashman 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
- Azam M, Gupta G, Chen W, Wellington S, Warburton D, Danziger RS (1998) Genetic mapping of soluble guanylyl cyclase genes: implications for linkage to blood pressure in the Dahl rat. *Hypertension* 32: 149-154
- Baylor D (1996) How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 560-565
- Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiß U, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP (2001) NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacology* 1: 13
- Behrends S, Budaeus L, Kempfert J, Scholz H, Starbatty J, Vehse K (2001) The β_2 subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is developmentally regulated in rat kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364: 573-576
- Behrends S, Harteneck C, Schultz G, Koesling D (1995) A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J Biol Chem* 270: 21109-21113
- Behrends S, Vehse K (1999) The β_2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains a human-specific frameshift and is expressed in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 64-69
- Behrends S, Vehse K, Scholz H, Bullerdiek J, Kazmierczak B (2000) Assignment of GUCY1A3, a candidate gene for hypertension, to human chromosome bands 4q31.1-q31.2 by in situ hybridization. *Cytogen Cell Genet* 88: 204-205

- Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V, Hofmann F (1994) Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3505-3509
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7: 1513-1522
- 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: 131-43
- Böhme E, Jung R, Mechler I (1974) Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol* 38: 199-202
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brüne B, Mohr S, Messmer UK (1996) Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127: 1-30
- Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K (1999) Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 696-701
- Buechler WA, Ivanova K, Wolfram G, Drummer C, Heim JM, Gerzer R (1994) Soluble guanylyl cyclase and platelet function. *Ann NY Acad Sci* 714: 151-157
- Buechler WA, Nakane M, Murad F (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 351-357
- Canty JM Jr. (2000) Nitric oxide and short-term hibernation: friend or foe? *Circ Res* 87: 85-87
- Cary SP, Marletta MA (2001) The case of CO signaling: why the jury is still out. *J Clin Invest* 107: 1071-1073
- Chan PS, Lin MC (1974) Isolation of cyclic AMP by inorganic salt coprecipitation. *Meth Enzymol* 38: 38-41
- Chinkers M, Wilson EM (1992) Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J Biol Chem* 267: 18589-18597
- Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176: 599-604

- Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG (1975) Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem* 250: 374-381
- Dealwis CG, Chen L, Brennan C, Mendecki W, Abad-Zapatero C (1995) 3-D structure of the D153G mutant of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: an enzyme with weaker magnesium binding and increased catalytic activity. *Protein Eng* 8: 865-871
- De Angelis DA, Braun PE (1994) Isoprenylation of brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase modulates cell morphology. *J Neurosci Res* 39: 386-397
- Denninger JW, Marletta MA (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411: 334-50
- Denninger JW, Schelvis JP, Brandish PE, Zhao Y, Babcock GT, Marletta MA (2000) Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry* 39: 4191-4198
- Diodati J, Theroux P, Latour JG, Lacoste L, Lam JY, Waters D (1990) Effects of nitroglycerin at therapeutic doses on platelet aggregation in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 66: 683-688
- Dougherty RM (1964) Animal virus titration techniques. In: Harris R (Hrsg.), *Techniques in Experimental Virology*, New York: Academic Press, pp. 169-223
- Drewett JG, Garbers DL (1994) The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr Rev* 15: 135-162
- Fan B, Gupta G, Danziger RS, Friedman JM, Rousseau DL (1998) Resonance Raman characterization of soluble guanylate cyclase expressed from baculovirus. *Biochemistry* 37: 1178-1184
- 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
- Friebe A, Koesling D (1998) Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 53: 123-127
- Friebe A, Russwurm M, Mergia E, Koesling D (1999) A point-mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 38: 15253-15257
- Friebe A, Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Schultz G, Koesling D (1997) Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase. *Biochemistry* 36: 1194-1198

- Friebe A, Schultz G, Koesling D (1996) Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 15: 6863-6868
- Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, Omori K (1999) Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem* 274: 18438-18445
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- Galle J, Zabel U, Hubner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C, Schmidt HH (1999) Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* 127: 195-203
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48: 184- 188
- Gelb MH, Scholten JD, Sebolt-Leopold JS (1998) Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Curr Opin Chem Biol* 2: 40-48
- Gerzer R, Böhme E, Hofmann F, Schultz G (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* 132: 71-74
- Giuli G, Roedel N, Scholl U, Mattei MG, Guellaën 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
- Giuli G, Scholl U, Bulle F, Guellaën G (1992) Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett* 304: 83-88
- Goldberg ND, O'Dea RF, Haddox MK (1973) Cyclic GMP. *Adv Cycl Nucl Res* 3: 155-223
- Gupta G und Danziger RS (1998) Basolateral targeting of the α_1/β_1 form of nitric oxide-activated guanylyl-cyclase is achieved by elements in the β_2 carboxyl terminus. *Circulation* 98 (Suppl): 2583
- Gupta G, Azam M, 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* 100: 1488-1492
- Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57: 1167-1177

- Hardman JG, Sutherland EW (1969) Guanylate cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 244: 6363-6370
- Harteneck C, Koesling D, Söling A, Schultz G, Böhme E (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272: 221-223
- Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G (1991). Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 292: 217- 222
- Hecker M, Cattaruzza M, Wagner AH (1999) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 32: 9-16
- Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266: 22789- 22791
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94
- Hobbs AJ (2000) Soluble guanylate cyclase. *Emerg Ther Targets* 4: 735-749
- Hoenicke M, Becker EM, Apeler H, Sirichoke T, Schröder H, Gerzer R, Stasch JP (1999) Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med* 77: 14-23
- Hughes PR, Wood HA (1986) In vivo and in vitro bioassay methods for baculoviruses. In: Grandados RR und Federici BA (Hrsg.) *The Biology of Baculoviruses*. Vol. 2, Boca Raton, Fla: CRC Press pp.1-30
- Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Böhme E (1990) Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* 190: 273-278
- Hurley JH (1998) The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Curr Opin Struct Biol* 8: 770-777
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269
- Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS (1982) Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 2870-2873

- Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS (1984) Regulation of purified guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Adv Cycl Nucl Res* 17: 267-274
- Inglese J, Glickman JF, Lorenz W, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Isoprenylation of a protein kinase. Requirement of farnesylation/alpha-carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 267: 1422-1425
- Johnstone MT, Lam JY, Lacoste L, Baribeau J, Theroux P, Waters D (1993) Methylene blue inhibits the antithrombotic effect of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 21: 255-259
- Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA, Murad F (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* 261: 7236-7241
- Karlberg KE, Torfgard K, Ahlner J, Sylven C (1992) Dose-dependent effect of intravenous nitroglycerin on platelet aggregation, and correlation with plasma glyceryl dinitrate concentration in healthy men. *Am J Cardiol* 69: 802-805
- Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 3: 23-35
- Kerwin J, Lancaster J, Feldman P (1995) Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38: 4343-4362
- Kimura H, Murad F (1975) Subcellular localization of guanylate cyclase. *Life Sci* 17: 837-843
- Koesling D (1995) Struktur und Regulation der löslichen Guanylyl-Cyclasen. Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin, Fachbereich Humanmedizin: pp 45-51
- Koesling D, Friebe A (1999) Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 41-65
- Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G, Böhme E (1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 266: 128-132
- Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch 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
- Kone BC (2000) Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand* 168: 27-31

- Kurtz A, Wagner C (1998) Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275: F849-862
- Lacoste LL, Theroux P, Lidon RM, Colucci R, Lam JY (1994) Antithrombotic properties of transdermal nitroglycerin in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 73: 1058-1062
- Lam JY, Chesebro JH, Fuster V (1988) Platelets, vasoconstriction, and nitroglycerin during arterial wall injury. A new antithrombotic role for an old drug. *Circulation* 78: 712-716
- Lee SJ, Kim SZ, Cui X, Kim SH, Lee KS, Chung YJ, Cho KW (2000) C-type natriuretic peptide inhibits ANP secretion and atrial dynamics in perfused atria: NPR-B-cGMP signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H208-221
- Lee YC, Martin E, Murad F (2000) Human recombinant soluble guanylyl cyclase: expression, purification, and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10763-10768
- Lees C, Campbell S, Jauniaux E, Brown R, Ramsay B, Gibb D, Moncada S, Martin JF (1994) Arrest of preterm labour and prolongation of gestation with glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor. *Lancet* 343: 1325-1326
- Liaudet L, Soriano FG, Szabo C (2000) Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 28 (Suppl): N37-52
- Linder JU, Engel P, Reimer A, Krüger T, Plattner H, Schultz A, Schultz JE (1999) Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *EMBO J* 18: 4222-4232
- Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13414-13419
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22: 307-312
- Maniatis, T, Fritsch, EF, Sambrook J (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Marletta MA (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1: 249-257
- Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F (1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 189: 1255-1264

- McCoy DE, Guggino SE, Stanton BA (1995) The renal cGMP-gated cation channel: its molecular structure and physiological role. *Kidney Int* 48: 1125-1133
- Mikami T, Kusakabe T, Suzuki N (1998) Molecular cloning of cDNAs and expression of mRNAs encoding α and β subunits of soluble guanylyl cyclase from medaka fish *Oryzias latipes*. *Eur J Biochem* 253: 42-48
- Mikami T, Kusakabe T, Suzuki N (1999) Tandem organization of medaka fish soluble guanylyl cyclase α_1 and β_1 subunit genes. Implications for coordinated transcription of two subunit genes. *J Biol Chem* 274: 18567-18573
- Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 75: 851-856
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12: 365-372
- Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch JP, Kast R, Busse R (1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 120: 681-689
- Mundel P, Gambaryan S, Bachmann S, Koesling D, Kriz W (1995) Immunolocalization of soluble guanylyl cyclase subunits in rat kidney. *Histochem Cell Biol* 103: 75-79
- Murrell W (1879) Nitroglycerin as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1879, 1: 80-81
- Nakai K, Kanehisa M (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14: 897-911
- Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 265: 16841-16845
- Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F (1988) Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1139-1147
- Nighorn A, Byrnes KA, Morton DB (1999) Identification and characterization of a novel beta subunit of soluble guanylyl cyclase that is active in the absence of a second subunit and is relatively insensitive to nitric oxide. *J Biol Chem* 274: 2525-2531

- Nighorn A, Gibson NJ, Rivers DM, Hildebrand JG, Morton DB (1998) The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. *J Neurosci* 18: 7244-7255
- Ochoa De Alda JA, Ajlani G, Houmard J (2000) *Synechocystis* strain PCC 6803 *cya2*, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. *J Bacteriol* 182: 3839-3842
- Owen JA, Saunders F, Harris C (1989) Topical nitroglycerin: a potential treatment for impotence. *J Urol* 141: 546-548
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
- Parish CA, Rando RR (1996) Isoprenylation/methylation of proteins enhances membrane association by a hydrophobic mechanism. *Biochemistry* 35: 8473-8477
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszódi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R, Hofmann F (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 17: 3045-3051
- Pilz RB, Berjis M, Idriss SD, Scheele JS, Suhasini M, Gao L, Scheffler IE, Boss GR (1994) Isolation and characterization of HL-60 cells resistant to nitroprusside-induced differentiation. *J Biol Chem* 269: 32155-32161
- Pitt GS, Milona N, Borleis J, Lin KC, Reed RR, Devreotes PN (1992) Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell* 69: 305-315
- Porst H (1993) Prostaglandin E1 and the nitric oxide donor linsidomine for erectile failure: a diagnostic comparative study of 40 patients. *J Urol* 149: 1280-1283
- Reed L, Muench H (1938) A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497
- Rothermund L, Friebe A, Paul M, Koesling D, Kreutz R (2000) Acute blood pressure effects of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase in normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 130: 205-208
- Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D (1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* 335: 125-130
- Ruth P (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther* 82: 355-372

- Sanger F, Nicklen S, Coulsen AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B (1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50: 1-5
- Schultz G, Böhme E (1984) Guanylate cyclase. GTP pyrophosphate-lyase (cyclizing), E.C.4.6.1.2. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M (Hrsg.) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3. Auflage, Band 4, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, pp. 379–389
- Schultz K, Schultz G (1977) Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265: 750-751
- 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
- Simchon S, Manger W, Blumberg G, Brensilver J, Cortell S (1996) Impaired renal vasodilation and urinary cGMP excretion in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 27: 653-657
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiß U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M (2001) NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 410: 212-215
- Stief CG, Holmquist F, Djamilian M, Krah H, Andersson KE, Jonas U (1992) Preliminary results with the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate in the treatment of human erectile dysfunction. *J Urol* 148: 1437-1440
- Stone JR, Marletta MA (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33: 5636-5640
- Stone JR, Marletta MA (1995) Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 34: 14668-14674
- Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Ducke B, Feurer A, Furstner C (2001) NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 781-784
- Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JJ, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem* 273: 16332-16338

- Sutherland EW, Rall TW (1957) The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg²⁺, and epinephrine or glucagon. *J Am Chem Soc* 79: 3608-3611
- Teng CM, Wu CC, Ko FN, Lee FY, Kuo SC (1997) YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur J Pharmacol* 320: 161-166
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SG (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α GTP γ S. *Science* 278: 1907-1916
- Thomsen LL, Olesen J (1998) Nitric oxide theory of migraine. *Clin Neurosci* 5: 28-33
- Torfgard KE, Ahlner J (1994) Mechanisms of action of nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther* 8: 701-717
- Truss MC, Becker AJ, Djamilian MH, Stief CG, Jonas U (1994) The role of the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate (SIN1) in the diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Urology* 44: 553-556
- Tucker CL, Hurley JH, Miller TR, Hurley JB (1998) Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5993-5997
- 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
- Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ (1999) Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84: 1020-1031.
- Wedel B, Garbers D (2001) The guanylyl cyclase family at Y2K. *Annu Rev Physiol* 63: 215-233
- Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G, Koesling D (1995) Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 270: 24871-24875
- Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G, Koesling D (1994) Mutation of His-105 in the β_1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2592-2596
- Wilson EM, Chinkers M (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34: 4696-4701
- Wolin MS, Wood KS, Ignarro LJ (1982) Guanylate cyclase from bovine lung. *J Biol Chem* 257: 13312-13320
- Wu CC, Ko FN, Kuo SC, Lee FY, Teng CM (1995) YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol* 116: 1973-1978

Yao X, Segal AS, Welling P, Zhang X, McNicholas CM, Engel D, Boulpaep EL, Desir GV (1995) Primary structure and functional expression of a cGMP-gated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11711-11715

Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, Chusho H, Shiota K, Tanaka K, Nakao K (1998) Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *J Biol Chem* 273: 11695-11700

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 FL, Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65: 241-269

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

Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14753-14758

Zhao Y, Brandish PE, Di Valentin M, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* 39: 10848-10854

Zhao Y, Marletta MA (1997) Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 36: 15959-15964

Zhao Y, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA (1998) Identification of histidine 105 in the β_1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 37: 4502-4509

Zingarelli B, Hasko G, Salzman AL, Szabo C (1999) Effects of a novel guanylyl cyclase inhibitor on the vascular actions of nitric oxide and peroxynitrite in immunostimulated smooth muscle cells and in endotoxic shock. *Crit Care Med* 27: 1701-1707

7. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

Koglin M, Behrends S (2000) Cloning and functional expression of the rat α_2 subunit of soluble guanylyl cyclase. *Biochim Biophys Acta* 1494: 286-289

Bamberger AM, Koglin M, Kempfert J, Löning T, Scholz H, Behrends S (2001) Expression and tissue localization of soluble guanylyl cyclase in the human placenta using novel antibodies directed against the α_2 subunit. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 909-912

Behrends S, Kempfert J, Mietens A, Koglin M, Scholz H, Middendorff R (2001) Developmental changes of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase expression in pulmonary arteries. *Biochem Biophys Res Com* 283: 883-887

Koglin M, Vehse K, Budaeus L, Scholz H, Behrends S (2001) Nitric oxide activates the β_2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J Biol Chem* 276: 30737-30743

Koglin M, Stasch JP, Behrends S (2002) BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Com* (im Druck)

Abstracts:

Vehse K, Hinzpeter M, Koglin M, Borrmann L, Bullerdiek J, Kazmierczak B, Behrends S (2000) Coordinated regulation of NO-sensitive guanylyl cyclase genes in lung development and identification of the α_1 and β_1 subunit gene promoters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361 (Suppl): R 44

Behrends S, Koglin M, Scholz H (2001) The β_2 subunit is the first example of a mammalian homodimeric nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363 (Suppl): R 45

Koglin M, Behrends S, Scholz H (2001) Cloning and expression of the rat α_2 subunit of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase and analysis of deletion mutants. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363 (Suppl): R 50

Behrends S, Kempfert J, Koglin M, Scholz H (2002) Changed properties of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in human platelets after aggregation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365 (Suppl): R 42

Koglin M, Behrends S, Scholz H, Stasch JP (2002) Different sensitivities of soluble guanylyl cyclase isoforms towards the novel drug BAY 41-2272. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365 (Suppl): R 41

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Scholz für die Begleitung der wissenschaftlichen Arbeit danken und für die Gelegenheit, am Pharmakologischen Institut diese Dissertation anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus bin ich dankbar für die Unterweisung im Fach Pharmakologie und die Möglichkeit, Lehrveranstaltungen in der Allgemeinen Pharmakologie durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Becker möchte ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und seine konstruktiven wissenschaftlichen Anregungen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med Sönke Behrends für sein Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit, seine ständige Gesprächsbereitschaft und motivierende, immer gut gelaunte Art. Vor allem sein Selbstverständnis einer gemeinschaftlichen Labortätigkeit war entscheidend für das Gelingen der Arbeit.

Weiter gilt mein besonderer Dank Frau Jutta Starbatty für die gewissenhafte, zuverlässige und tatkräftige Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen.

Außerdem möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Ihre finanzielle Unterstützung bedanken.

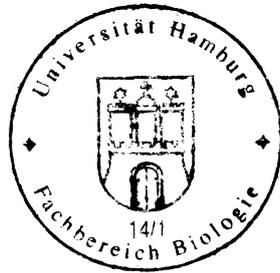
Herrn Dr. Stasch von der Bayer AG danke ich für die Überlassung der Substanz BAY 41-2272.

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. SCHOLZ

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. Becker

Tag der Disputation: 14. Juni 2002

Hamburg, den 01. Juni 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Udo Wienand', written in a cursive style.

Professor Dr. U. Wienand
Dekan