Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung für Pharmakologie der Universität Hamburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. H. Scholz

Klonierung und Untersuchung einer neuen Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase des Menschen

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

> vorgelegt von Kai Vehse aus Hamburg

Hamburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 27. Mai 2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. H. Scholz

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ANP	atriales natriuretisches Peptid					
ARDS	Atemnotsyndrom des Erwachsenen (adult respiratory distress syndrome)					
ATP	Adenosin-5'-triphosphat					
BH_4	Tetrahydrobiopterin					
BNP	natriuretisches Peptid Typ B					
bp	DNA-Basenpaar					
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat					
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure					
C. elegans	Caenorhabditis elegans					
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat					
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase					
CNP	natriuretisches Peptid Typ C					
СО	Kohlenmonoxid					
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol					
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat					
DNA	Desoxyribonukleinsäure					
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat					
E. coli	Escherichia coli					
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor (endothelium derived relaxing factor)					
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure					
eNOS	endotheliale NO-Synthase					
EST	exprimierter Sequenzabschnitt (expressed sequence tag)					
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid					
FMN	Flavinmononukleotid					
g	Erdbeschleunigung					
GTG	Giemsa durch Trypsin, Giemsa					
GTP	Guanosin-5'-triphosphat					
iNOS	induzierbare NO-Synthase					
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalaktopyranosid					
LB	Luria Bertoni					
MOPS	3-Morpholino-propan-sulfonsäure					
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure					
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)					
nNOS	neuronale NO-Synthase					
NO	Stickstoffmonoxid					

NOS	NO-Synthase
³² P	Phosphor 32
PAC	P1 abgeleitetes artifizielles Chromosomen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
RACE	schnelle Amplifikation von cDNA-Enden (rapid amplification of cDNA-ends)
RBC	rote Blutkörperchen (red blood cells)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
TBST	Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung (Tris-buffered-saline-tween)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Enzymeinheit)
WKY	Wistar-Kyoto
YC-1	3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl]-1-benzylindazol

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITU	NG	9			
1.1	. Hintergrund	l	9			
1.2	1.2. Der NO-cGMP Signalweg					
1.3	1.3. NO-Synthasen					
1.4	. Lösliche Gu	anylyl-Cyclasen	12			
	1.4.1.	Aufbau der Untereinheiten	13			
	1.4.2.	Regulatoren der löslichen Guanylyl-Cyclase	15			
1.5	. Membranstä	indige Guanylyl-Cyclasen	16			
1.6	1.6. Effektorsysteme von cGMP					
1.7	. Fragestellur	ng	18			
2.	MATERIA	L UND METHODEN	19			
21	Material		10			
2.1	2 1 1	Substanzen und Hilfsmittel	19			
	2.1.1.	Enzyme	19			
	2.1.2.	DNA und Vektoren	20			
	2.1.5.	Reaktionssysteme	20			
	2.1.5	Zusammensetzung der verwendeten Gele und Lösungen	20			
	2.1.6.	Hilfsmittel und Geräte	21			
22	Methoden		22			
	2.2.1.	Identifikation von genomischen PAC Klonen	22			
	2.2.2.	Präparation von PAC-DNA	22			
	2.2.3.	Chromosomale Lokalisierung der Gene der Untereinheiten der löslichen				
		Guanylyl-Cyclase	23			
	2.2.4.	Subklonierung von DNA-Fragmenten aus genomischen PAC Klonen	23			
	2.2.5.	Untersuchung isolierter Promotorregionen	24			
	2.2.6.	Herstellung eines cDNA Klons der humanen β_2 Untereinheit voller Länge	24			
	2.2.7.	Präparation von genomischer DNA	25			
	2.2.8.	PCR-Analyse von genomischer DNA	25			
	2.2.9.	Southern blot-Analyse von genomischer DNA	26			
	2.2.10	Untersuchung des 5' Bereiches der β_2 Untereinheit des Rhesusaffen	26			
	2.2.11	Untersuchung des 3' Bereiches der β_2 Untereinheit	27			
	2.2.12	Klonierung einer β_2 Untereinheit der Ratte mit neu identifiziertem Startcodon	27			
	2.2.13	. Untersuchung zur tumorspezifischen Expression der humanen β_2 Untereinheit	28			
	2.2.14	Herstellung von cDNA	29			
	2.2.15	RT-PCR-Analyse einer altersabhängigen mRNA-Expression	29			
	2.2.16	Western blot-Analyse einer altersabhängigen Proteinexpression	30			

Seite

3. ERGEBNISSE

7

$ 3.1. \ Chromosomale Lokalisation der Gene der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase des Menschen 31 3.1.1. Lokalisation des Gens GUCY1B2 der neu klonierten humanen \beta_2 Untereinheit 31 3.1.2. Lokalisation des Gene GUCY1A3 der \alpha_1 Untereinheit 32 3.1.3. Kolokalisation der Gene GUCY1A2 der \alpha_2 Untereinheit 33 3.1.4. Lokalisation des Gens GUCY1A2 der \alpha_2 Untereinheit 33 3.2. Untersuchungen zu den orthologen \beta_2 Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase 34 3.2.1. Klonierung der humanen \beta_2 Untereinheit 34 3.2.2. Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der \beta_2 Untereinheit 36 3.2.3. Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen \beta_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies 39 3.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der \beta_2 Untereinheit der Ratte 40 3.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen \beta_2 Untereinheit 42 3.3.2. Altersabhängige Expression der \beta_2 Untereinheit der Ratte 44 3.3.3. Expression der \alpha_1 und \beta_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte 45 3.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der \alpha_1 und \beta_1 Untereinheit 46 41. DISKUSSION 47 4.1. Die \beta_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies 47$						
des Menschen313.1.1.Lokalisation des Gens GUCY1B2 der neu klonierten humanen β_2 Untereinheit313.1.2.Lokalisation des Gens GUCY1A3 der α_1 Untereinheit323.1.3.Kolokalisation der Gene GUCY1A3 und GUCY1B3 der α_1 bzw. β_1 Untereinheit323.1.4.Lokalisation des Gens GUCY1A2 der α_2 Untereinheit333.2.Untersuchungen zu den orthologen β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase343.2.1.Klonierung der humanen β_2 Untereinheit343.2.2.Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3.Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4.Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3.Untersuchungen zur Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.1.Tumorspezifische Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3.Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4.Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.1.1.Lokalisation des Gens GUCY1B2 der neu klonierten humanen β_2 Untereinheit313.1.2.Lokalisation des Gens GUCY1A3 der α_1 Untereinheit323.1.3.Kolokalisation der Gene GUCY1A3 und GUCY1B3 der α_1 bzw. β_1 Untereinheit323.1.4.Lokalisation des Gens GUCY1A2 der α_2 Untereinheit333.2.Untersuchungen zu den orthologen β_2 Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase343.2.1.Klonierung der humanen β_2 Untereinheit343.2.2.Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3.Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4.Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3.Intersuchungen zur Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.1.Tumorspezifische Expression der β_2 Untereinheit der Ratte423.3.2.Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3.Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4.Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.1.2.Lokalisation des Gens GUCY1A3 der α_1 Untereinheit323.1.3.Kolokalisation der Gene GUCY1A3 und GUCY1B3 der α_1 bzw. β_1 Untereinheit323.1.4.Lokalisation des Gens GUCY1A2 der α_2 Untereinheit333.2.Untersuchungen zu den orthologen β_2 Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase343.2.1.Klonierung der humanen β_2 Untereinheit343.2.2.Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3.Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4.Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3.Untersuchungen zur Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.1.Tumorspezifische Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3.Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4.Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.1.3. Kolokalisation der Gene GUCY1A3 und GUCY1B3 der α_1 bzw. β_1 Untereinheit323.1.4. Lokalisation des Gens GUCY1A2 der α_2 Untereinheit333.2. Untersuchungen zu den orthologen β_2 Untereinheit nder löslichen Guanylyl-Cyclase343.2.1. Klonierung der humanen β_2 Untereinheit343.2.2. Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3. Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1. Tumorspezifische Expression der β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.1.4.Lokalisation des Gens GUCY1A2 der α_2 Untereinheit333.2. Untersuchungen zu den orthologen β_2 Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase343.2.1.Klonierung der humanen β_2 Untereinheit343.2.2.Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3.Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4.Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3.Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1.Tumorspezifische Expression der β_2 Untereinheit423.3.2.Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3.Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4.Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464.DISKUSSION47						
3.2. Untersuchungen zu den orthologen β_2 Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase343.2.1. Klonierung der humanen β_2 Untereinheit343.2.2. Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3. Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.2.1.Klonierung der humanen β_2 Untereinheit343.2.2.Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3.Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4.Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3.Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1.Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2.Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3.Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4.Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464.DISKUSSION474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.2.2.Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit363.2.3.Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4.Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3.Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1.Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2.Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3.Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4.Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
β_2 Untereinheit363.2.3. Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.2.3. Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies393.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464. DISKUSSION47						
Vergleich zu anderen Spezies393.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464. DISKUSSION47						
3.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte403.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464. DISKUSSION47						
3.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase423.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464. DISKUSSION474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit423.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464. DISKUSSION474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
3.3.2. Altersabhängige Expression der β_2 Untereinheit der Ratte443.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte453.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit464. DISKUSSION474.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
 3.3.3. Expression der α₁ und β₁ Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte 45 3.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α₁ und β₁ Untereinheit 46 4. DISKUSSION 47 4.1. Die β₂ Untereinheit bei verschiedenen Spezies 47 						
3.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit 46 4. DISKUSSION 47 4.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies 47						
4. DISKUSSION47 $4.1.$ Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
4. DISKUSSION47 $4.1.$ Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies47						
4.1. Die β_2 Untereinheit bei verschiedenen Spezies 47						
4.1. Die p ₂ Onterennier bei verseinedenen Spezies						
4.2. Dimerisierungspartner der β_2 Untereinheit und Stellung innerhalb der Familie der						
Nukleotid-Cyclasen 5						
4.3 Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanvlyl-Cyclase						
1.5. Expressionsregulation der onterenmenten der fösnenen Guanyryr Cycluse						
5. ZUSAMMENFASSUNG 62						
6. ANHANG 63						
(1 Vanalaiah dan Drimänstralatun dan navidantifiziantan 8. Hatanainhaitan mit dan 8. Hatanainhait						
o.1. Vergelen der Primärstruktur der neu identifizierten p_2 Ontereinmerten mit der p_1 Ontereinmert						
$62 Varalaish dar isoliartan Saguanzan aug dam 5' Daraish dar \beta Untersinhaitan van Mangah$						
o.2. vergreich der isoherten Sequenzen aus dem 5 Bereich der p_2 Untereinheiten von Mensch						
6.3 Genomische Sequenz des 3' Bereiches der humanen & Untersinheit 6						
6.4. Sequenzy ergleich des 3' Pereiches der β Untereinheiten von Monsch und Phasysoffer 64						
6.5. Neu identifizierte Startsequenz der β_2 Untereinheit der Ratte 67						
6.6. Nicht vollständig gespleißte Sequenz aus dem 5' Bereich der β_2 Untereinheit der Ratte 68						

7.	LITERATURVERZEICHNIS	69
8.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	82
9.	LEBENSLAUF	83
10.	DANKSAGUNG	84

1. EINLEITUNG

1.1. Hintergrund

Seit mehr als hundert Jahren werden NO-freisetzende Pharmaka zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit eingesetzt (Murrell 1879). Bei diesem Krankheitsbild kommt es, meist unter Belastung, zu einer mangelnden Durchblutung der Herzmuskulatur (Parker und Parker 1998). Das resultierende Missverhältnis von Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf führt zum klinischen Bild der Angina pectoris mit einem Engegefühl in der Brust und überwiegend retrosternal lokalisierten Schmerzen. Die Behandlung der Angina pectoris gliedert sich in Behandlung des Anfalles und die Anfallsprophylaxe (Scholz und Schwabe 2000). Isosorbiddinitrat und vor allem Glyceroltrinitrat werden aufgrund ihrer schnellen Resorption über die Schleimhaut zur Behandlung des Angina pectoris-Anfalles eingesetzt. Dagegen finden zur Anfallsprophylaxe eher lang wirksame Substanzen wie Isosorbiddinitrat, Isosorbidmononitrat oder Pentaerythryltetranitrat Verwendung. NO-freisetzende Pharmaka senken dabei in erster Linie die Vorlast über eine Erweiterung der venösen Kapazitätsgefäße (Parker und Parker 1998). Eine Senkung der Nachlast über eine Erweiterung der arteriellen Widerstandsgefäße trägt zu einer Verringerung des Sauerstoffbedarfs der Herzmuskulatur bei. Zusätzlich verbessern NOfreisetzende Pharmaka die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur über eine Erweiterung der Koronargefäße (Torfgard und Ahlner 1994). Auch in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz werden NO-freisetzende Pharmaka eingesetzt. Für die Kombination von Isosorbiddinitrat und dem Vasodilatator Hydralazin konnte bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz eine Senkung der Mortalität gezeigt werden (Cohn 1988). Spätere, darauf aufbauende Studien ergaben dabei Differenzen der Wirksamkeit zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen (Carson 1999).

Neben der Behandlung von Herzerkrankungen finden NO-freisetzende Pharmaka auch in der Therapie anderer Krankheitsbilder Verwendung. Bei Gallenkoliken und Koliken des Harnleiters kann eine Behandlung mit NO-freisetzenden Pharmaka erfolgreich sein (Staritz et al. 1985, Iversen et al. 1995). Ihr Einsatz bei der topischen Behandlung der erektilen Dysfunktion wird erprobt (Champion et al. 1999). Ein relativ neues Behandlungsprinzip stellt die Inhalation von gasförmigem NO dar. Es wurde erstmals bei Patienten mit pulmonalem Hypertonus eingesetzt (Pepke-Zaba et al. 1991). Der pulmonale Hypertonus wird dabei effektiv gesenkt, ohne dass es zu einer Änderung des systemischen Blutdruckes kommt (Pepke-Zaba et al. 1991). Bei Patienten mit Atemnotsyndrom (ARDS) führt inhalatives NO zu einer Umverteilung der Lungenperfusion mit verbesserter arterieller Oxygenierung (Roissaint et al. 1993). Auch bei Neugeborenen mit pulmonalem Hypertonus wird inhalatives NO erfolgreich eingesetzt (Kinsella et al. 1992, Roberts et al. 1992). Die Inhalation von NO senkt hierbei die Notwendigkeit von invasiveren Behandlungsmethoden wie der extrakorporalen Membranoxygenierung (Roberts et al. 1997). NO-freisetzende Pharmaka und inhalatives NO wirken über eine Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclasen (Böhme et al. 1978, Murad et al. 1978). Diese Enzymfamilie setzt sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen, von denen drei beim Menschen und vier bei Säugetieren kloniert werden konnten (Yuen et al. 1990, Harteneck et al. 1991, Giuili et al. 1992). Alle Untereinheiten weisen innerhalb des Organismus ein unterschiedliches Verteilungsmuster auf (Budworth et al. 1999). Dies eröffnet die theoretische Möglichkeit zur Entwicklung selektiver Pharmaka. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die einzelnen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase des Menschen näher zu charakterisieren.

1.2. Der NO-cGMP Signalweg

NO-freisetzende Pharmaka und inhalatives NO greifen in die Regulation des physiologischen NOcGMP Signalweges ein. Die Entdeckung dieses 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 unterscheiden, konnten identifiziert werden (Chrisman et al. 1975, Kimura und Murad 1975). 1977 wurde das Radikal NO als potentieller Aktivator der löslichen Enzymform identifiziert (Arnold et al. 1977). Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass NO über die Produktion von cGMP zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt (Böhme et al. 1978). Dies erklärte erstmals die Wirksamkeit der schon seit langem eingesetzten NO-freisetzenden Pharmaka. Die endogene Produktion von NO wurde dagegen erst neun Jahre später nachgewiesen: Furchgott und Zawadski entdeckten 1980, dass die Anwesenheit von Endothelzellen für die vasodilatierende Wirkung von Acetylcholin notwendig war (Furchgott und Zawadski 1980). Sie postulierten daher einen endothelialen Botenstoff, der zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führte. Dieser hypothetische Botenstoff wurde "endothelium derived relaxing factor", EDRF, genannt. Zwei Gruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass EDRF die lösliche Guanylyl-Cyclase in der glatten Gefäßmuskulatur aktiviert (Förstermann et al. 1986, Ignarro et al. 1986). Sie vermuteten daher, dass EDRF und NO identisch seien. Diese Hypothese konnte schließlich ein Jahr später bestätigt werden (Palmer et al. 1987). Seitdem konnte in verschiedenen Geweben die Bedeutung des NO-cGMP Signalweges gezeigt werden. So spielt der Signalweg unter anderem eine Rolle bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation, bei der Signalübertragung im Gehirn und bei der Regulation der Salzexkretion und Reninsekretion in der Niere (Drewett und Garbers 1994). Abbildung 1 fasst schematisch zusammen, was derzeit über den Aufbau und die Funktionsweise der Enzyme des NO-cGMP Signalwegs bekannt ist.



Abbildung 1: Der NO-cGMP Signalweg. L-Arginin und molekularer Sauerstoff (O_2) werden durch die NO-Synthase zu L-Citrullin und NO umgesetzt. Dabei besitzt die NO-Synthase eine Häm-Gruppe und benötigt NADPH, FAD, FMN und BH₄ als Kofaktoren. NO diffundiert aus der Zelle in die Zielzelle und bindet an die prosthetische Häm-Gruppe der löslichen Guanylyl-Cyclase. Diese wird dadurch aktiviert und bildet vermehrt den intrazellulären Botenstoff cGMP. cGMP wirkt in der Zielzelle über verschiedene Effektorsysteme. Die Offen-Wahrscheinlichkeit cGMP-abhängiger Ionenkanäle wird positiv oder negativ beeinflusst. Dies führt zu einer Änderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen oder des Membranpotentials. cGMP-abhängige Proteinkinasen phosphorylieren verschiedene Zielproteine. Dies erlaubt eine spezifische Regulation ihrer Funktionen. Als drittes Effektorsystem wirken cGMP-spezifische Phosphodiesterasen, die je nach Enzymfamilie die Hydrolyse der intrazellulären Botenstoffe cGMP und/oder cAMP zum entsprechenden 5'-Monophosphat katalysieren. Die Phosphodiesterasen können dabei von cGMP gehemmt oder aktiviert werden. Zellmembranen sind als graue Balken dargestellt.

1.3. 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 (eNOS, nNOS, iNOS) sind bekannt (Andrew und Mayer 1999). Von diesen werden zwei konstitutiv im Endothel (eNOS) und in Nerven (nNOS) exprimiert. Sie werden vornehmlich durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit einer daraus resultierenden Bindung eines Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes aktiviert (Cho et al. 1992, Kone 2000). Die produzierten NO-Mengen wirken über die lösliche Guanylyl-Cyclase (Hecker et al. 1999). 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 Ca²⁺-Spiegel große Mengen an NO (Cho et al. 1992). Diese wirken im Rahmen einer Immunantwort cGMP-unabhängig über eine Nitrosylierung von Proteinen und oxidativen Stress cytotoxisch (Brüne et al. 1996, Liaudet et al. 2000).

1.4. Lösliche Guanylyl-Cyclasen

Die löslichen Guanylyl-Cyclasen stellen die wichtigsten Rezeptoren für NO dar (Denninger und Marletta 1999). Die bisher aus Gewebe von Säugern isolierten Isoformen werden aus einer α und einer β Untereinheit gebildet (Kamisaki et al. 1986, Russwurm et al. 1998). Jeweils zwei α und β Untereinheiten sind bei Säugetieren bekannt (α_1 , α_2 , β_1 , β_2). Alle Untereinheiten besitzen einander homologe Aminosäuresequenzen (Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). Bisher konnte in Zellkulturexperimenten nur bei Koexpression einer α und einer β Untereinheit ein funktionelles Enzym erhalten werden, was für eine essentielle Heterodimerbildung spricht (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991). Die α_1 und die β_1 Untereinheit wurden als erste Untereinheiten identifiziert (Kamisaki et al. 1986). Sie bilden das im menschlichen Körper am weitesten verbreitete Enzym (Budworth et al. 1999). Auch die α_2 Untereinheit konnte beim Menschen auf mRNA-Ebene in vielen Geweben nachgewiesen werden (Behrends et al. 1995). Dagegen wurde die β_2 Untereinheit bisher nur bei der Ratte in wenigen Geweben identifiziert (Yuen et al. 1990). Die α_2 Untereinheit bildet in Zellkulturexperimenten ebenso wie die α_1 Untereinheit ein funktionelles Heterodimer mit der β_1 Untereinheit (Harteneck et al. 1991). Russwurm und Mitarbeiter konnten ein Heterodimer aus α_2 und β_1 Untereinheit aus humaner Placenta isolieren und damit zeigen, dass dieses in vitro charakterisierte Isoenzym auch physiologisch gebildet wird (Russwurm et al. 1998). Beide Heterodimere, α_1/β_1 und α_2/β_1 , sind durch NO aktivierbar und weisen auch bei weiteren Untersuchungen sehr ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften auf (Harteneck et al. 1991, Russwurm et al. 1998). Es wird angenommen, dass die vorhandenen Sequenzunterschiede der beiden α Untereinheiten unterschiedliche posttranslationale Modifikationen oder unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zelle ermöglichen

(Russwurm et al. 1998).

Für die β_2 Untereinheit konnte bislang nur eine Arbeitsgruppe in Zellkulturexperimenten die Bildung eines funktionellen Heterodimers mit der α_1 Untereinheit zeigen (Gupta et al. 1997). Diese Befunde konnten allerdings bisher von keiner Arbeitsgruppe bestätigt werden (Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). Auch aus Gewebe von Säugetieren konnte bisher keine Isoform der löslichen Guanylyl-Cyclase mit Beteiligung der β_2 Untereinheit isoliert werden. Daher bleibt der endgültige Nachweis des physiologischen Dimerisierungspartners der β_2 Untereinheit weiterhin zu erbringen (Denninger und Marletta 1999). Die β_2 Untereinheit weist eine Besonderheit an ihrem Cterminalen Ende auf. Dort besitzt sie eine potentielle Isoprenylierungsstelle, die die kovalente Bindung eines Fettsäurerestes an die SH-Gruppe des in der viertletzten Position stehenden Cysteins ermöglichen könnte (Gelb et al. 1998). Dies könnte zu einer Lokalisation der β_2 Untereinheit an der Zellmembran führen. Hierfür liegen allerdings widersprüchliche Befunde vor (Mundel et al. 1994, Gupta und Danziger 1998). Die α_1 und die β_1 Untereinheit konnten bei vielen verschiedenen Spezies kloniert werden (Denninger und Marletta 1999). Dagegen konnte sowohl die α_2 Untereinheit als auch die β_2 Untereinheit bisher nur bei einer Spezies kloniert werden. Dabei wurde die α_2 Untereinheit aus fetalem menschlichen Hirn (Harteneck et al. 1991) und die β_2 Untereinheit aus der Rattenniere kloniert (Yuen et al. 1990). Einige Autoren haben daher die Frage aufgeworfen, ob diese beiden Untereinheiten eine über die jeweiligen Spezies hinausgehende Bedeutung besitzen (Denninger und Marletta 1999).

1.4.1. Aufbau der Untereinheiten

Ein schematischer Aufbau der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase ist in Abbildung 2 dargestellt. Die vier bei Säugetieren bekannten Untereinheiten sind nach demselben Grundprinzip aufgebaut. Drei Domänen werden innerhalb der Polypeptidkette unterschieden: eine C-terminale, katalytische Domäne, eine Dimerisierungsdomäne und eine N-terminale Häm-Bindungsdomäne (Wedel et al. 1995). Wedel und Mitarbeiter konnten erstmals zeigen, dass die alleinige Expression der Cterminalen Bereiche der α_1 und der β_1 Untereinheit für basale Enzymaktivität ausreichen (Wedel et al. 1995). Dadurch konnten die katalytischen Domänen erstmals im C-terminalen 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 evolutionärem 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). Zwei identische katalytische Domänen bilden kein funktionelles katalytisches Zentrum und führen zu einem kompletten Verlust der Guanylyl-Cyclase Aktivität (Zabel et al. 1999). 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 N-terminal 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 zu einer Dimerisierung führen.



Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Isoformen der Guanylyl-Cyclase. Die bisher aus Organgewebe isolierten Enzyme sind Heterodimere bestehend aus α_1 und β_1 oder α_2 und β_1 Untereinheit. Eine Heterodimerisierung der β_2 Untereinheit mit der α_1 Untereinheit wurde von einer Arbeitsgruppe gezeigt (Gupta et al. 1997), konnte bisher aber von keiner weiteren Arbeitsgruppe bestätigt werden (Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). Der Dimerisierungspartner der β_2 Untereinheit bleibt so weiterhin unklar. Die Untereinheiten besitzen jeweils eine N-terminale Häm-Bindungsdomäne (blau, hellblau, rot, rosa), eine Dimerisierungsdomäne (nicht gezeigt) und eine C-terminale katalytischen Domäne (orange), an der GTP zu cGMP umgesetzt wird. Die bekannten Heterodimere werden durch die Bindung von NO an das zentrale Eisenatom (Fe²⁺) der prosthetischen Häm-Gruppe der β_1 Untereinheit aktiviert. Eine Häm-Gruppe der β_2 Untereinheit konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die β_2 Untereinheit besitzt C-terminal eine Isoprenylierungsstelle mit einem Cystein, an dessen SH-Gruppe eine Fettsäure (hier: aktiviertes Geranylgeranyl) kovalent gebunden werden kann.

Gerzer und Mitarbeiter konnten 1981 erstmals zeigen, dass die lösliche Guanylyl-Cyclase als Häm-Protein vorliegt (Gerzer et al. 1981). NO bindet an die prosthetische Häm-Gruppe und aktiviert das Enzym durch nachfolgende Konformationsänderungen. Deletionsmutanten, denen der N-terminale Abschnitt mit der Häm-Bindungsdomäne fehlt, besitzen nur noch basale Enzymaktivität und können nicht mehr durch NO aktiviert werden (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996). Da sowohl α als auch β Untereinheiten eine N-terminale Häm-Bindungsdomäne besitzen, war das stöchiometrische Verhältnis von Häm zum Gesamtenzym lange Zeit umstritten (Gerzer et al. 1981, Stone und Marletta 1995). Mittlerweile gilt aber die ursprüngliche Annahme als erwiesen, dass die lösliche Guanylyl-Cyclase nur eine prosthetische Häm-Gruppe pro Gesamtenzym besitzt (Gerzer et al. 1981, Brandish et al. 1998, Denninger und Marletta 1999). Zhao und Marletta konnten durch spektrometrische Untersuchungen zeigen, dass die Häm-Gruppe an den N-terminalen Bereich der β_1 Untereinheit bindet (Zhao und Marletta 1997). Spektrometrische Untersuchungen halfen auch, die Eigenschaften der Häm-Gruppe genauer zu charakterisieren. Eine als Soret-Bande bezeichnete maximale Absorption bei 431 nm des Häm-Proteins zeigte, dass die Häm-Gruppe der löslichen Guanylyl-Cyclase analog zu Deoxyhämoglobin und Deoxymyoglobin als fünffach koordinierter Komplex an einem Histidin gebunden vorliegt (Stone und Marletta 1994). Das Histidin in der Position 105 der β_1 Untereinheit konnte als axialer Ligand der prosthetischen Häm-Gruppe identifiziert werden, da der Austausch dieses Histidins gegen Phenylalanin, Alanin oder Glycin zu einem Verlust der Häm-Gruppe führt (Wedel et al. 1994, Zhao et al. 1998). Obwohl nur die β_1 Untereinheit für die Bindung der Häm-Gruppe verantwortlich zu sein scheint, spielt dennoch auch die Häm-Bindungsdomäne der α_1 Untereinheit eine Rolle bei der Übertragung des NO-Signales auf die katalytische Domäne. Eine N-terminale Deletionsmutante der α_1 Untereinheit mit fehlender Häm-Bindungsdomäne wurde auf ihre Aktivität untersucht (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996). Diese zeigte eine normale basale Aktivität. Die Aktivitätssteigerung bei Gabe von NO war dagegen sehr gering im Vergleich zum nativen Enzym.

1.4.2. Regulatoren der löslichen Guanylyl-Cyclase

NO ist der wichtigste Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase. Es führt bei gereinigtem Enzym zu einer bis zu 400fachen Aktivitätssteigerung (Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). Dabei bindet NO an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Häm-Gruppe. Nach einem kurzen, sechsfach koordinierten Übergangszustand wird die Bindung der Häm-Gruppe an das Histidin 105 der β_1 Untereinheit gelöst (Stone und Marletta 1994, Sharma und Magde 1999). Die Häm-Gruppe liegt daher auch im aktivierten Zustand als fünffach koordinierter Komplex mit NO als axialem Liganden vor. Es wird angenommen, dass die Lösung der Bindung des zentralen Eisenatoms zum Histidin 105 zu einer aktivierenden Konformationsänderung führt (Koesling und Friebe 1999, Sharma und Magde 1999). Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass Protoporphyrin IX, ein zur Häm-Gruppe analoges Molekül ohne zentrales Eisenatom, die lösliche Guanylyl-Cyclase ähnlich stark wie NO aktivieren kann (Ignarro et al. 1982). Bei hohen Protoporphyrin IX-Konzentrationen wird dabei die Häm-Gruppe des Enzyms gegen Protoporphyrin IX ausgetauscht, zu dem das Histidin 105 keine Bindung aufbauen kann (Koesling und Friebe 1999).

Neben NO ist CO ein schwacher Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase. Es führt zu einer vier- bis sechsfachen Steigerung der Enzymaktivität (Brüne und Ullrich 1987, Stone und Marletta 1994). Trotz der im Vergleich zu NO geringen Aktivierung konnten für CO physiologische, cGMP-vermittelte Effekte bei der Langzeit-Potenzierung von Nerven (Hawkins et al. 1994, Zhuo et. al. 1998), bei der Transduktion olfaktorischer Signale (Leinders-Zufall et al. 1996, Ingi et al. 1996) und bei der Relaxation glatten Muskelzellen (Zakhary et al. 1997, Caudill et al. 1998) beschrieben werden. CO wird physiologisch durch Häm-Oxygenasen gebildet, bei denen ähnlich wie bei den NOS eine konstitutive und eine induzierbare Isoform bekannt sind (Zakhari et al. 1997). Sie bauen Häm zu Biliverdin, Eisen und CO ab. CO führt im Gegensatz zu NO nicht zu einer Auflösung der Bindung der Häm-Gruppe an das Histidin 105, sondern bildet einen sechsfach koordinierten Komplex (Stone und

Marletta 1994). Die Bildung eines sechsfach koordinierten Komplexes könnte erklären, warum CO im Vergleich zu NO die lösliche Guanylyl-Cyclase nur wenig zu aktivieren vermag (Koesling und Friebe 1999). Allerdings hat CO als Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase in den letzten Jahren neue Bedeutung erlangt: YC-1, ein synthetischer Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase, potenziert den Effekt von CO und führt zu einer vergleichbaren Aktivität wie bei Stimulation durch NO (Wu et al. 1995, Friebe et al. 1996, Mülsch et al. 1997). Stone und Marletta konnten zeigen, dass dabei der sechsfach koordinierte Komplex aus CO, prosthetischer Häm-Gruppe und Histidin 105 nicht aufgelöst wird (Stone und Marletta 1998). Dadurch wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Lösung der Histidin-Häm-Bindung für eine maximale Aktivierung nicht zwingend notwendig ist (Stone und Marletta 1998). Der genaue Bindungsort von YC-1 bleibt weiterhin umstritten. Friebe und Mitarbeiter vermuten aufgrund von Untersuchungen von Mutanten den Angriffspunkt von YC-1 an der katalytischen Domäne der α_1 Untereinheit (Friebe et al. 1999). Denninger und Mitarbeiter konnten dagegen in einer sogenannten Raman-Spektroskopie zeigen, dass YC-1 bei der isoliert exprimierten Häm-Bindungsdomäne der β_1 Untereinheit dieselben Veränderungen bewirkt wie beim gesamten Enzym (Denninger et al. 2000). Sie vermuten die YC-1 Bindungsstelle daher an der Häm-Bindungsdomäne der β_1 Untereinheit.

1.5. Membranständige Guanylyl-Cyclasen

Die membranständigen Guanylyl-Cyclasen gehören zur Gruppe der rezeptorgekoppelten Enzyme. Bisher konnten beim Menschen sieben Isoformen, A-G, kloniert werden (Schulz et al. 1998). Sie liegen im Gegensatz zu den löslichen Guanylyl-Cyclasen physiologisch als Homodimer oder Homooligomer vor (Wilson und Chinkers 1995). Alle Untereinheiten besitzen dabei eine ähnliche Grundstruktur. Eine einzelne, membrandurchspannende α-Helix trennt die N-terminale, extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne von dem im Intrazellularraum gelegenen C-terminalen Abschnitt (Drewett und Garbers 1994). Dieser wird in eine Proteinkinase-ähnliche Domäne und eine weiter C-terminal gelegene katalytische Domäne unterteilt. Die Aktivierung der membranständigen Guanylyl-Cyclasen erfolgt über die Bindung von Peptidhormonen an die extrazelluläre Rezeptor-Bindungsdomäne (Drewett und Garbers 1994). Die Proteinkinase-ähnlichen Domänen haben vermutlich einen inhibitorischen Einfluß auf die Enzymaktivität, da ihre Deletion zu einem konstitutiv aktiven Enzym führt (Chinkers und Garbers 1989, Koller et al. 1992). Bisher konnten vier Peptidhormone der membranständigen Guanylyl-Cyclasen identifiziert werden (Drewett und Garbers 1994, Schulz et al. 1998). Das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das ähnliche 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 verwandte 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, spielt aber auch eine Rolle bei Zellproliferation und Differenzierung in verschiedenen Geweben (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. Dort spielt sie eine Rolle bei der Wasser- und Chloridexkretion in das Darmlumen (Drewett und Garbers 1994). Neben Guanylin wird sie auch von einem bakteriellen Enterotoxin aktiviert, das durch eine ungebremste cGMP-Produktion zu starken wässrigen Durchfällen führen kann (Forte et al. 1992). Für die übrigen Isoformen der membranständigen Guanylyl-Cyclasen konnten bisher keine aktivierenden Peptidhormone identifiziert werden (Schulz et al. 1998). Die membranständigen Guanylyl-Cyclasen unterscheiden sich in Aufbau und Aktivierungsmechanismus von den löslichen Guanylyl-Cyclasen. Im homologen katalytischen Bereichen können aber einzelne Kenntnisse über den katalytischen Mechanismus auf die lösliche Guanylyl-Cyclase übertragen werden (Denninger und Marletta 1999).

1.6. Effektorsysteme von cGMP

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). cGMPabhängige 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, McCov et al. 1995, Baylor 1996). Die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (cGK) führt zu einer Phosphorylierung bestimmter Zielproteine (Ruth 1999). Zwei Enzymformen, 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). Andere Gruppen werden durch cAMP reguliert (PDE4, PDE7, PDE8, PDE10). Die PDE weisen ein spezifisches Expressionsmuster auf und können dadurch in den verschiedenen Organen zu einer spezifischen Regulation der cGMP- und cAMP-Konzentrationen beitragen (MacFarland et al. 1991, Juilfs et al. 1997). Wie dies pharmakologisch genutzt werden kann wird deutlich an der Entwicklung des PDE5-spezifischen Hemmstoffs Sildenafil, der zur Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt wird.

1.7. Fragestellung

Die β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase konnte bisher nur bei der Ratte kloniert werden (Yuen et al. 1990). Dagegen konnten die bereits besser charakterisierten α_1 und β_1 Untereinheiten bei vielen evolutionär auch weit entfernten Spezies identifiziert werden (Denninger und Marletta 1999). Daher warfen einige Autoren die Frage auf, ob die β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase neben der Ratte auch bei anderen Spezies von Bedeutung ist (Denninger und Marletta 1999). In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase beim Menschen nachzuweisen. Im Falle der Identifizierung einer humanen β_2 Untereinheit sollte das Gen dieser Untereinheit im menschlichen Genom lokalisiert werden. Zusätzlich sollte die chromosomale Lokalisation der Gene der schon bekannten Untereinheiten untersucht werden. Insbesondere für die Lokalisation des Gens der α_1 Untereinheit lagen dabei widersprüchliche Ergebnisse zweier Arbeitsgruppen vor (Giuili et al. 1993, Schuler et al. 1996). Über die spezifische Funktion der einzelnen Untereinheiten ist bisher wenig bekannt. Eine altersabhängige Expression der α_1 und β_1 Untereinheit konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden (Bloch et al. 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diesem Befund nachgegangen werden. Zusätzlich sollte eine Altersabhängigkeit der Expression auch für die anderen Untereinheiten untersucht werden.

Die Fragestellung war im Einzelnen:

- Kommt das Gen und die cDNA der β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase beim Menschen vor?

- Wie verhält sich die chromosomale Lokalisation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase beim Menschen?

- Lassen sich durch Untersuchungen der Expression Hinweise auf die physiologische Funktion der Untereinheiten gewinnen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Substanzen und Hilfsmittel

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

Agarose Antikörper (β_1 Untereinheit) Aqua ad injectabila γ -³²P-ATP Bacto-Agar Bradfordreagenz α -³²P-dCTP dNTP Entwickler G 150 Ethanol (100 %) ExpressHyb Solution Fixierer G 350 Kanamycin Long Ranger Gel Solution (Acrylamid) Natriumdodecylsulfat One shot kompetente E. coli TEMED tRNA Trypton Wistar-Ratten (WKY) Hefe-Extrakt

Biorad (München) Eurogentech (Seraing, Belgien) Pharmacia Biotech (Freiburg) NEN (Zaventem, Belgien) Becton Dickinson (Heidelberg) Biorad (München) Amersham (Freiburg) Boehringer (Mannheim) Agfa-Gevaert (Leverkusen) UKE-Apotheke (Hamburg) Clontech (Heidelberg) Agfa-Gevaert (Leverkusen) Gibco (Karlsruhe) AT Biochem (Malvern, USA) Biorad (München) Invitrogen (Leek, Niederlande) Biorad (München) Boehringer (Mannheim) Becton Dickinson (Heidelberg) Wiga (Sulzfeld) Becton Dickinson (Heidelberg)

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

2.1.2. Enzyme

Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Alkalische Phosphatase Lysozym Advantage cDNA Polymerase Mix T4 DNA Ligase T4 Polynukleotid Kinase Pfu DNA Polymerase Platinum Taq DNA Polymerase Proteinase K Restriktionsenzyme und Puffer

RNase A RNase Inhibitor (20 U/µl) RNazol Taq DNA Polymerase Taq DNA Polymerase High Fidelity Perkin Elmer (Palo Alto, USA) Boehringer (Mannheim) Roche (Mannheim) Clontech (Heidelberg) Boehringer (Mannheim) New England Biolabs (Bad Schwalbach) Stratagene (Amsterdam, Niederlande) Gibco (Karlsruhe) Boehringer (Mannheim) Boehringer (Mannheim) New England Biolabs (Bad Schwalbach) Pharmacia Biotech (Freiburg) Roche (Mannheim) Promega (Mannheim) WAK Chemie (Bad Homburg) Gibco (Karlsruhe) Gibco (Karlsruhe)

2.1.3. DNA und Vektoren

Coriell Cell Repositories panel #2 DNA Standard 100 bp DNA Standard 1 kb Human Chromosome 11 Regional Mapping Panel Human Kidney Marathon-Ready cDNA Human Stomach 3 Matched cDNA Pair Human Tumor Multiple Tissue cDNA Panel pBluescript pcDNA3.1/V5/His-TOPO pcDNA3.1Zeo+ pCRII pCR2.1 pGEM5ZF+ Rat Kidney Marathon-Ready cDNA

2.1.4. Reaktionssysteme

Eucaryotic TOPO TA Cloning kit Megaprime DNA labelling System Plasmid Maxi Kit Plasmid Mini Kit ProSTAR First Strand RT-PCR Kit QIAquick Gel Extraction Kit TA Cloning kit Coriell Cell Repositories (Camden, USA) New England Biolabs (Bad Schwalbach) MBI (St. Leon-Rot) Coriell Cell Repositories (Camden, USA) Clontech (Heidelberg) Clontech (Heidelberg) Stratagene (Amsterdam, Niederlande) Invitrogen (Leek, Niederlande) Invitrogen (Leek, Niederlande) Invitrogen (Leek, Niederlande) Invitrogen (Leek, Niederlande) Promega (Heidelberg) Clontech (Heidelberg)

Invitrogen (Leek, Niederlande) Amersham (Freiburg) Qiagen (Hilden) Qiagen (Hilden) Stratagene (Amsterdam, Niederlande) Qiagen (Hilden) Invitrogen (Leek, Niederlande)

2.1.5. Zusammensetzung der verwendeten Gele und Lösungen

Agarosegel (DNA):	0,8 % bis 1 % (w/v) Agarose; 1 x TBE-Puffer;					
	0,07 μg/ml Ethidiumbromid					
Agarosegel (RNA):	1 % (w/v) Agarose; 1 x MOPS-Puffer; 2 % Formaldehyd;					
	0,07 µg/ml Ethidiumbromid					
Denaturierungslösung:	1,5M NaCl; 0,5 M NaOH					
DNA-Probenpuffer:	1 % Bromphenolblau; 1 % Xylencyanid; 50 % Glycerin; 1 x TBE					
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					
LB-Medium:	10,0 g Trypton; 5,0 g Hefe-Extrakt; 5,0 g NaCl; H ₂ O ad 1 l; pH 7,5					
Lysis-Puffer:	10mM EDTA; 10 mM Tris/HCl; 150mM NaCl; 0,2 % SDS; pH 7,4					
MOPS-Puffer (10 x):	0,2 M MOPS; 0,05 M Natriumacetat; 0,01 M EDTA, pH 7,0					
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5 M Tris/HCl pH 7,2					
PBS:	0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na2HPO4; 1,5 mM KH2PO4					
RBC-Lyse-Puffer:	10 mM KHCO ₃ ; 155 mM NH ₄ Cl; 0,1 mM EDTA; pH 7,4					
Sammelgel:	0,1 % SDS; 6 % Acrylamid; 125 mM Tris/HCl pH 8,8;					
	1,2 % Ammoniumpersulfat; 0,6 % TEMED					
SSC (20 x):	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0					
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					
TELT-Lysis-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl;					
	0,4 % Triton X 100					
Transferpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,02 % SDS; 20 % Methanol					
Trenngel:	0,1 % SDS; 10 % Acrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8;					
	0,1 % Ammoniumpersulfat; 0,1 % TEMED					

2.1.6. Hilfsmittel und Geräte

Analysenwaage Beckmann Zentrifuge (J2-21) Beckmann Zentrifuge (J6-B) Blotkammer Digitalwaage Einwegpipetten (10 ml; 25 ml) steril Elektrophoresekammern Falcon Röhrchen (50 ml) Filmmaterial (X-OMAT) Filterpapier 3MM Digitalkamera Heizblock Hybridisierungsofen Kühltruhe (-80 °C; -20 °C) Magnetrührer Nick-Säulen Nitrocellulose (Protran, 0,45 µm) Nylonmembran (Immobylon Ny⁺) **PCR-Heizblock Express** pH-Meter Phosphoimager Phosphoimagerplatten Photometer Pipetten Pipettenspitzen Polytron Power Supply Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml) Sarstedt Röhrchen Schüttelinkubator Schüttelinkubator für Bakterienkulturen Szintillationszähler Tischzentrifuge Ultrazentrifuge (Centricon T-2170) UV-Stratalinker 2400 UV-Transilluminator Vortexer Wasserbad Wasserdeionisierungsanlage

Mettler (Greifensee, Schweiz) Beckmann (Palo Alto, USA) Beckmann (Palo Alto, USA) Biorad (München) Mettler (Greifensee, Schweiz) Becton Dickinson (Heidelberg) Biorad (München) Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg) Kodak (Stuttgart) Whatman (Maidstone, UK) Kaiser (Buchen) Eppendorf (Hamburg) Appligene (Hamburg) Kryotec (Hamburg) Heidolph (Kelheim) Amersham (Freiburg) Schleicher und Schuell (Dassel) Millipore (Eschborn) Hybaid (Heidelberg) Knick (Berlin) Fujifilm (Tokyo, Japan) Fujifilm (Tokyo, Japan) Perkin Elmer (Palo Alto, USA) Eppendorf (Hamburg) Treff Lab (Degersheim, Schweiz) Kinematika (Luzern, Schweiz) Biorad (München) Eppendorf (Hamburg) Sarstedt (Heidelberg) GFL (Burgwedel) Teq, CFL Laborgeräte (Emersacker) Beckmann (Palo Alto, USA) Eppendorf (Hamburg) Kontron Instruments (Mailand, Italien) Stratagen (Amsterdam, Niederlande) Bachhofer (Reutlingen) Heidolph (Kelheim) GFL (Burgwedel) Millipore (Eschborn)

2.2. Methoden

2.2.1. Identifikation von genomischen PAC Klonen

Genomische PAC Klone, die Gene von Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cylcase enthalten, wurden durch das Durchsuchen einer genomischen PAC Bibliothek identifiziert (RCPI1, 3-5; Ioannou et al. 1994). Als Sonden wurden cDNA-Fragmente der humanen α_1 , β_1 und β_2 cDNA verwendet, die unter Verwendung des Megaprime DNA labelling Systems radioaktiv markiert wurden. Die cDNAs der humanen α_1 und β_1 Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase wurden dabei freundlicherweise von Georges Guellaën, Créteil, in dem Vektor pGEM7ZF+ zur Verfügung gestellt (Giuili et al. 1992). Die Sonde der β_1 Untereinheit wurde durch Verdau der entsprechenden cDNA mit dem Restriktionsenzym Avall gewonnen. Das resultierende cDNA-Fragment von 743 bp wurde nach Gelelektrophorese ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit eluiert. Entsprechend wurde die cDNA der α_1 Untereinheit mit dem Restriktionsenzym AvaI geschnitten. Zwei cDNA-Fragmente von 1474 bp und 1203 bp wurden gemeinsam eluiert und gemeinsam radioaktiv markiert. Mit den beschriebenen Aval α_1 cDNA-Fragmenten als Sonden konnten vier Klone isoliert werden (RPCIP704E0497Q25, RPCIP704C23392Q2, RPCIP704P06831Q2 und RPCIP704P221187Q2). Durch PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden P48 (5'-TGC CTC CCT GCT TCC ATA AT-3') und P49 (5'-GTA GAG CCC TCG TCC TGT AAA ATC-3') wurden die Klone RPCIP704E0497Q25, RPCIP704P06831Q2 und RPCIP704P221187Q2 als genomische Klone der α_1 Untereinheit bestätigt. Mit dem beschriebenen AvaII \beta_1 cDNA-Fragment als Sonde konnten 11 Klone isoliert werden, von denen drei Klone durch Hybridisierung mit dem Oligonukleotid P8 (5'-TAA GAG CCC TGG AAG ATG AAA AGA-3') als genomische Klone der β_1 Untereinheit bestätigt werden konnten: RPCIP704I18992Q2, RPCIP704D141084Q2 und RPCIP704H13639Q2. Die cDNA der von uns neu klonierten humanen β_2 Untereinheit (siehe 2.2.6.) wurde aus dem Vektor pCRII mit EcoRI ausgeschnitten und das entsprechende Fragment von 460 bp (Genbank: AF0384499) aus einem Agarosegel eluiert und radioaktiv markiert. Mit dieser Sonde wurden sechs verschiedene genomische Klone identifiziert, wobei der Klon LLNLP704E17877Q3 durch Southern Hybridisierung, PCR-Analyse und direkte Sequenzierung als genomischer Klon der humanen B2 Untereinheit bestätigt werden konnte. Das Durchsuchen von PAC-Bibliotheken erfolgte in Zusammenarbeit mit Susann Schweiger vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, und Annemarie Poustka und Petra Kioschis vom Ressourcenzentrum im deutschen humanen Genomprojekt, Heidelberg.

2.2.2. Präparation von PAC-DNA

Für die Isolation von genomischen Sequenzen aus den entsprechenden PAC Klonen wurden größere DNA Mengen mit dem Plasmid Maxi Kit präpariert. Hierzu wurde LB-Medium mit Kanamycin (50 mg/l) mit dem entsprechenden Klon angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,15 bei der Wellenlänge 578 nm wachsen gelassen. IPTG wurde in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Die Bakterien wurden weiter bis zu einer optischen Dichte von 0,9 (bei 578 nm) wachsen gelassen und durch Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurde das Standardprotokoll des Herstellers befolgt mit der Modifikation, dass der Puffer QF vor der Säulenelution auf 65 °C gebracht wurde. Etwa 100 µg DNA wurden aus 500 ml Kulturmedium gewonnen.

2.2.3. Chromosomale Lokalisierung der Gene der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase

Die chromosomale Lokalisierung der Gene der α_1 , β_1 und β_2 Untereinheit entstand in Zusammenarbeit mit Bernd Kazmierczak, Zentrum für Humangenetik und genetische Beratung der Universität Bremen. Fluoreszenz- und Zweifarbfluoreszenz in situ Hybridisierung wurden an Metaphase- (β_2) bzw. Prometaphasechromosomen (α_1 , α_1 und β_1) nach der Methode von Kievits durchgeführt (Kievits et al. 1990). Für die Lokalisierung des Gens der α_2 Untereinheit wurden das Coriell Cell Repositories panel #2 und das Human Chromosome 11 Regional Mapping Panel verwendet. In der PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden HSa2STSsense (5'-TGC TAC AGA TCA AAG ACT CCT CC-3') und HSa2STSanti (5'-AGG GAA AGA TAC TTG TAT GTG TGA T-3') wurde ein 365 bp Produkt mit Platinum Taq DNA Polymerase amplifiziert. Das PCR Profil war 94 °C 1 min, 35 Zyklen 94 °C 15 s, 56 °C 15 s und 72 °C 15 s mit finalem Extensionsschritt von 4 min bei 72 °C.

2.2.4. Subklonierung von DNA-Fragmenten aus genomischen PAC Klonen

Die PAC-DNA, die die genomische Sequenz der humanen β_2 Untereinheit enthielt (LLNLP704E17877Q3) wurde mit einer Reihe von Restriktionsenzymen geschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt, fotografiert und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Oligonukleotide P90 (5'-GAA GCC ATC CTG AAA CTC TTT GGA GAA TAC-3') und P91 (5'-CTC CCA GTG TCC GTA GCA TCC TGT CAT AGC-3') wurden mit 50 μ Ci γ^{-32} P-ATP und T4 Polynukleotid Kinase radioaktiv markiert. Die Nitrocellulosemembranen mit der durch verschiedene Restriktionsenzyme verdauten PAC-DNA wurde mit Hilfe von ExpressHyb Solution hybridisiert, gewaschen und auf Phosphoimagerplatten exponiert. Eine Bande von 269 bp, die sich aus der kombinierten Restriktion mit NcoI und PstI ergab, wurde mit T4 DNA Ligase in den Vektor pGEM5ZF+ kloniert und mit dem Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing sequenziert. Durch eine analoge Strategie wurde ein 1025 bp XmnI/PstI geschnittenes Fragment aus der PAC-DNA der β_2 Untereinheit subkloniert, welches nur mit dem Oligonukleotid P90 hybridisierte, um die Intron/Exon Grenze 5' von dem zuvor isolierten Exon zu identifizieren. Dieses Fragment wurde EcoRV/PstI in den pBluescript Vektor kloniert und sequenziert. Zur Isolierung der Promotorregionen der α_1 und β_1 Untereinheiten wurden mit Hilfe der Sonde P99 (5'-CCT TAT GGC GAT TGG GCG GC-3') ein

PstI/EcoRV verdautes, 5058 bp Fragment des PAC Klons RPCIP704E0497Q25 (α_1) identifiziert. Mit Hilfe der Sonde P98 (5'-GCT GCC GCC TCT GCC TGG GT-3') wurde ein EagI geschnittenes, ca. 4000 bp Fragment des PAC Klons RPCIP704I18992Q2 (β_1) identifiziert. Diese beiden Fragmente wurden in den mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten pBluescript Vektor kloniert. Das α_1 Fragment wurde vollständig sequenziert. Beim β_1 Fragment wurden an beiden Enden Teilabschnitte von ca. 700 bp sequenziert.

2.2.5. Untersuchung isolierter Promotorregionen

Die Sequenzen der isolierten Fragmente wurden mit Hilfe des Computerprogramms MatInspector V2.2 auf Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren untersucht (http://transfac.gbfbraunschweig.de/cgi-bin/matSearch/matsearch.pl). Die Messung der Promotorregionen der isolierten Fragmente erfolgte in Zusammenarbeit mit Bernd Kazmierczak, Zentrum für Humangenetik und genetische Beratung der Universität Bremen. Dabei wurden die isolierten Fragmente in den pGL3-Enhancer Vektor (Promega) kloniert. Für Kontrollexperimente wurden der pGL-Control Vektor (Promega) und der pGL3-Enhancer Vektor ohne Promotor als Positiv- bzw. Negativkontrolle eingesetzt. Die entstandenen Konstrukte wurden zusammen mit dem Vektor pRL-TK (Promega), der die Renilla Luciferase exprimiert, in HeLa Zellen transfiziert. Die gemessene Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte wurde auf die Renilla Luciferaseaktivität normalisiert. Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt und alle Versuche mehrfach wiederholt.

2.2.6. Herstellung eines cDNA Klons der humanen β₂ Untereinheit voller Länge

Für die 5' und 3' RACE PCR wurde Human Kidney Marathon-Ready cDNA mit dem Advantage cDNA Polymerase Mix verwendet. Zwei verschachtelte genspezifische Oligonukleotide wurden in der 5' RACE (P41, 5'-TCT GCG GAT GCT GAA AAT GTT GA-3'; P44, 5'-AAC ACA ACC ATG CTC CTT CTT CCC T-3') und der 3' RACE (P40, 5'-AGG GAA GAA GGA GCA TGT TGT GTT-3'; P45 5'-TCA ACA TTT TCA GCA TCC GCA GA-3') mit den entsprechenden Adapteroligonukleotiden eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit dem folgenden Temperaturprofil in einem 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt: 94 °C 1 min, 5 Zyklen 94 °C 1 min und 72 °C 3 min, 5 Zyklen 94 °C 1 min und 70 °C 3 min und 25 Zyklen 94 °C 1 min und 68 °C 3 min. 5' und 3' RACE Produkte wurden in den Vektor pCRII mit Hilfe des TA Cloning kits kloniert und sequenziert. Zwei genspezifische Oligonukleotide aus der 5' bzw. 3' nichttranslatierten Region wurden verwendet, um eine Sequenz der humanen β_2 Untereinheit in voller Länge zu erhalten (P78, 5'-GCG GCC GCT TGG TGC TGC ATC TCA ATC-3' und P75, 5'-GGG AAA ATT AAG CCC AGG GGT TCA T-3'). Mit diesen Oligonukleotiden wurde das folgende PCR Protokoll in einem 25 µl Reaktionsansatz durchgeführt: 94 °C 1 min, 35 Zyklen 94 °C 20 s, 60 °C 15 s und 68 °C 3 min. Ein PCR-Produkt von 2755 bp wurde

mit Hilfe des TA Cloning kits in den Vektor pCR2.1 kloniert und sequenziert. Dieser Klon der humanen β_2 Untereinheit in voller Länge wurde als Klon H bezeichnet.

2.2.7. Präparation von genomischer DNA

Genomische DNA wurde ausgehend von etwa 300 mg Gewebe präpariert. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend zusätzlich mit Hilfe eines Polytron in 1,5 ml Lysis-Puffer homogenisiert. Proteinase K wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt und das Homogenat für 48 h bei 37 °C inkubiert. Aus diesem Homogenat wurde genomische DNA durch Phenol/Chloroform Extraktion und anschließende Natriumazetatpräzipitation gewonnen. Die Ausbeute betrug etwa 500 µg pro 300 mg Gewebe. Genomische DNA wurde außerdem aus 2 ml Citrat-Blut von gesunden Probanden gewonnen. Die Blutentnahme in anonymisierter Form zum Zweck einer Untersuchung der fraglichen Leserasterverschiebung (siehe 2.2.8.) wurde bei der Ethik-Kommision der Ärztekammer Hamburg beantragt und genehmigt. Dem Citrat-Blut wurden 4 ml RBC-Lyse-Puffer hinzugefügt. Nach Lysis für 15 min auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 400 x g und 10 °C für 10 min wurde das Lymphozytensediment zweimal mit PBS gewaschen. Die Lymphozyten wurden in 1 ml Lysis-Puffer resuspendiert und nach Proteinase K Verdau wurde die Phenol/Chloroform Extraktion der genomischen DNA wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.8. PCR-Analyse von genomischer DNA

Die PCR-Analyse von menschlicher und nichtmenschlicher genomischer DNA wurde mit den Oligonukleotiden P92 (5'-AGC CAT CCT GAA ACT CTT TGG AGA-3') und P93 (5'-GGC CCA GGA CTG CCA CAG C-3') in einem 25 µl Reaktionsansatz mit Taq DNA Polymerase High Fidelity unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt: 95 °C 1 min, 36 Zyklen 95 °C 20 s, 60 °C 20 s und 72 °C 20 s und ein letzter Extensionsschritt von 4 min bei 72 °C. 10 µl dieser Reaktion wurden mit den Restriktionsenymen Eco57I oder XmnI in einem 20 µl Volumen bei 37 °C verdaut und auf einem Agarosegel im Vergleich mit 10 µl nichtverdautem PCR-Produkt analysiert. Die Länge der PCR-Produkte betrug 213 bp für nichtmenschliche Primaten und 209 bp für Menschen. Die verdauten Fragmente der menschlichen PCR-Produkte waren 58 bp und 151 bp (Eco57I) bzw. 27 bp und 182 bp (XmnI). Die Fragmente der nichtmenschlichen Primaten und mehrerer menschlichen Individuen wurden mit Hilfe des Eucaryotic TOPO TA Cloning Kits in den Vektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO kloniert und sequenziert.

2.2.9. Southern blot-Analyse von genomischer DNA

Um die Restriktionsfragmentlängen von genomischer DNA mit und ohne der beim Menschen vorhandenen Leserasterverschiebung abzuschätzen, wurde PAC-DNA (Klon LLNLP704E17877Q3, β_2) mit XmnI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die erhaltenen Southern blots wurden mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden P90 oder P91 (siehe 2.2.4.) mit ExpressHyb Lösung hybridisiert und auf einer Phosphoimagerplatte exponiert. Diese wurde nach 12 h mit einem Phosphoimager ausgewertet. Ein etwa 2400 bp langes Fragment hybridisierte mit der Sonde P90. Ein Fragment von etwa 4700 bp hybridisierte mit der Sonde P91.

Für die Southern blot-Analyse von genomischer DNA menschlischer Individuen und nichtmenschlicher Primaten wurden 40 ng des aus PAC-DNA isolierten, 1025 bp XmnI/PstI geschnittenen, genomischen Fragmentes (siehe 2.2.4.) mit 50 μ Ci α -³²P-dCTP und dem Megaprime DNA labelling System markiert. 40 μ g genomische menschliche oder nichtmenschliche Primaten-DNA wurde mit 120 U XmnI in einem Volumen von 300 μ l für 48 h verdaut. Diese Proben wurden über Nacht auf einem 0,8 % Agarosegel bei 30 V getrennt und fotografiert. Das Gel wurde anschließend erst für 15 min in einer 0,25 M HCl Lösung und dann für 40 min in Denaturierungslösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel zweimal für 20 min in Neutralisationslösung gewaschen und auf eine Nylonmembran geblottet. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Stratalinkers auf der Membran fixiert. Der Blot wurde anschließend für 1 min in 2 x SSC für 30 min in ExpressHyb Solution bei 60 °C gewaschen. Nach Erhitzen der radioaktiv markierten Sonde für 5 min bei 95 °C wurde diese der ExpressHyb Solution hinzugefügt. Die Blots wurden bei 60 °C für eine Stunde unter andauernder Rotation in einem Hybridisierungsofen hybridisiert. Die Blots wurden viermal für 15 min mit 2 x SSC mit 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal für 30 min bei 50 °C in 0,2 x SSC mit 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurden die Blots auf einer Phosphoimagerplatte für 48 h exponiert und mit einem Phosphoimager analysiert.

2.2.10. Untersuchung des 5' Bereiches der β_2 Untereinheit des Rhesusaffen

Ein Fragment aus dem Bereich der humanen Leserasterverschiebung der β_2 Untereinheit wurde aus cDNA des Rhesusaffen (siehe 2.2.14.) mit Hilfe des Advantage cDNA Polymerase Mixes amplifiziert. Die Oligonukleotide P92 (5'-AGC CAT CCT GAA ACT CTT TGG AGA-3') und P41 (5'-TCT GCG GAT GCT GAA AAT GTT GA-3') wurden mit folgendem PCR-Profil verwendet: 95 °C 1 min, 40 Zyklen 95 °C 20 s, 58 °C 20 s und 68 °C 2 min mit finalem Extensionsschritt von 4 min bei 68 °C. Als Negativkontrolle dienten Ansätze, denen bei der vorherigen reversen Transkription keine Reverse Transkriptase hinzugefügt worden war. 10 µl jedes Ansatzes wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, fotografiert und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der Southern blot wurde mit der radioaktiv

markierten Oligonukleotidsonde P91 (siehe 2.2.4.) in ExpressHyb Solution hybridisiert. Ein 779 bp langes, hybridisierendes Fragment wurde aus dem Restansatz durch Elution aus einem Agarosegel isoliert, in den Vektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO kloniert und sequenziert.

2.2.11. Untersuchung des 3' Bereiches der β_2 Untereinheit

Ein ca. 3500 bp langen Fragmentes aus genomischer DNA wurde mit Taq DNA Polymerase High Fidelity in einer PCR amplifiziert. Die spezifischen Oligonukleotide P106 (5'-GGG AGA TCT AAA ACC CCA GTT GAT-3') und P107 (5'-GCT CAT GAC GGC AGC AGT TC-3') wurden bei einem PCR-Profil von 95 °C 1 min, 35 Zyklen 95 °C 20 s, 60 °C 20 s und 72 °C 90 s mit abschließender Extensionszeit von 4 min bei 72 °C eingesetzt. Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO kloniert. An beiden Enden wurden Teilstücke von ca. 600 bp sequenziert. Eine Spleißstellen-Analyse wurde mit dem Programm Splice View (http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgenec/wwwwspliceview.html) nach der Methode von Shapiro und Senapathy durchgeführt (Shapiro und Senapathy 1987).

Zwei Fragmente (453 bp und 345 bp) aus dem 3' Bereich der β_2 Untereinheit wurden aus cDNA des Rhesusaffen (siehe 2.2.14.) mit Hilfe des Advantage cDNA Polymerase Mixes und der Oligonukleotide P88 (5'-TTG ATC CAG AAC TTG AAT GCC ACA GAG-3') und P75 (5'-GGG AAA ATT AAG CCC AGG GGT TCA T-3') amplifiziert. Das PCR Profil war hierbei 94 °C 1 min, 40 Zyklen 94 °C 20 s, 60 °C 30 s und 68 °C 1 min mit abschließender Extensionszeit von 4 min bei 68 °C. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend wurden die Fragmente in den Vektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO kloniert und sequenziert.

Zur Untersuchung von humanen cDNA-Proben auf das Vorliegen einer potentiellen Spleißvariante wurden PCR Untersuchungen mit Taq DNA Polymerase High Fidelity, Platinum Taq DNA Polymerase und dem Advantage cDNA Polymerase Mix durchgeführt. Die Oligonukleotide P103 und P104 (5'-GTT GAT CAC AAG GAA GCA AGT G-3' bzw. 5'-AAT TAA GCC CAG GGG TTC AT-3') und P102 und P105 (5'-AGA TCT AAA ACC CCA GTT GAT CAC AAG GAA G-3' bzw. 5'-AAC CCC AGT TGA TCA CAA GGA AGC-3') wurden hierbei unter verschiedenen Temperaturprofilen eingesetzt.

2.2.12. Klonierung einer β_2 Untereinheit der Ratte mit neu identifiziertem Startcodon

Für die 5' RACE PCR der β_2 Untereinheit der Ratte wurde Rat Kidney Marathon-Ready cDNA mit dem Advantage cDNA Polymerase Mix verwendet. Zwei verschachtelte Oligonukleotide wurden

anhand der veröffentlichten Sequenz der β_2 Untereinheit der Ratte ausgesucht (Yuen et al. 1990, Genbank: M57507). Die Sequenzen der Oligonukleotide entsprechen dabei den Positionen 184-159 und 135-111 der veröffentlichten Sequenz (5'-TCC TCC AAG TGT CCG CAG CAT CCT-3' bzw. 5'-AAG AAG TAT TCG CCA AAG AGC TTC AG-3'). Die Oligonukleotide wurden zusammen mit den entsprechenden Adapteroligonukleotiden AP1 und AP2 in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen eingesetzt. Die PCR Bedingungen in einem 25µl Ansatz waren für beide Reaktionen 94 °C 1 min, 35 Zyklen 94 °C 15 s, 65 °C 15 s und 68 °C 30 s mit einem abschließenden Extensionsschritt von 4 min bei 68 °C. Zwei 1119 bp und 338 bp lange PCR-Produkte wurden in den Vektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO subkloniert und sequenziert. Um einen Klon der β_2 Untereinheit der Ratte voller Länge zu erhalten, wurde in einer PCR die noch fehlende Sequenz aus dem 3' Bereich amplifiziert. Die Oligonukleotide entsprachen hierbei den Positionen 111-135 und 2224-2200 der veröffentlichten Sequenz (5'-CTC ATC CAA GAA GCC TGC AAG GTT C-3' bzw. 5'-GGA TCC CAT AGG ATC ACT TTT TCT C-3'). Die PCR wurde mit Pfu DNA Polymerase bei folgendem PCR-Profil durchgeführt: 94 °C 1 min, 35 Zyklen 94 °C 20 s, 60 °C 15 s und 72 °C 2 min mit einem abschließenden Extensionsschritt von 10 min bei 72 °C. Zur Bildung von TA-Überhängen wurde das resultierende PCR-Produkt von 2114 bp 10 min mit Tag DNA Polymerase bei 72 °C inkubiert. Anschließend wurde das Produkt in den Vektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO subkloniert und sequenziert. Ein Ncol/BamHI Fragment dieses Klons wurde zusammen mit einem HindIII/Ncol Fragment des 338 bp 5' RACE Produktes in den HindIII/BamHI geschnittenen Vektor pcDNA3.1Zeo+ ligiert. Dieser Klon wurde durch Sequenzierung und Restriktionsverdau überprüft.

2.2.13. Untersuchung zur tumorspezifischen Expression der humanen β₂ Untereinheit

Eine PCR-Analyse des Human Stomach 3 Matched cDNA Pair und des Human Tumor Multiple Tissue cDNA Panel wurden mit dem Advantage cDNA Polymerase Mix durchgeführt. Für die Analyse der menschlichen β_2 Untereinheit wurden die Oligonukleotide P78 (5'-GCG GCC GCT TGG TGC TGC ATC TCA ATC-3') und P79 (5'-GTA CAT GGA ATT CAG CAC GTT CAC TAT TTG-3') unter den folgenden Bedingungen verwendet: 95 °C 1 min, 38 Zyklen 95 °C 20 s, 58 °C 20 s und 68 °C 90 s und ein letzter Extensionsschritt bei 68 °C für 4 min (1546 bp PCR-Produkt). Für die Analyse der menschlichen β_1 Untereinheit wurden die Oligonukleotide P7 (5'-TGG GGT AAT GGA CAA GGA CAA A-3') und P8 (5'-TAA GAG CCC TGG AAG ATG AAA AGA-3') verwendet. Die Reaktion wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, mit Ausnahme einer erhöhten Anschmelztemperatur von 60 °C. Das erwartete PCR-Produkt war 846 bp.

29

Männliche Wistar-Ratten (WKY) wurden nach CO₂-Narkose durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurden die Lungen am Lungenhilus abgetrennt und entnommen. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurden beide Nieren im Retroperitonealraum bis auf ihre Kapsel freipräpariert, an ihrem Hilus abgetrennt und entnommen. Zusätzlich wurden Herz, Aorta und Hirngewebe entnommen. Die Gewebe wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Nierengewebe des Rhesusaffen wurde freundlicherweise vom Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen zur Verfügung gestellt. Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Nierengewebe des Rhesusaffen und Lungen- und Nierengewebe der Ratte wurde das Reagenziensystem RNazol verwendet. 150-200 mg Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff zunächst mit Metallstößel und Mörser zerkleinert und anschließend zusammen mit 4 ml eisgekühlter RNazol-Lösung in ein 10 ml Polypropylen Reaktionsgefäß aufgenommen. In drei Intervallen wurde der Ansatz mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators je 15 s bei Stufe 5 homogenisiert. Anschließend wurde die RNA nach den Herstellerangaben ausgeschüttelt, präzipitiert und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde am Photometer in Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Zur Kontrolle der Integrität der RNA-Probe wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die RNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung von cDNA durch reverse Transkription wurde das ProSTAR First Strand RT-PCR Kit verwendet. Zu 5 µg RNA in 38 µl RNase freiem Wasser wurden 3 µl random Primer gegeben und der Ansatz 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 5 μ l First Strand-Buffer, 1 μ l RNase Inhibitor (10 U/ μ l), 2 μ l dNTP und 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C, dreißig Minuten bei 42 °C und abschließend fünf Minuten bei 90 °C inkubiert. Ansätze, denen keine Reverse Transkriptase hinzugefügt worden war, dienten in anschließenden PCR-Untersuchungen als Negativkontrollen.

2.2.15. RT-PCR-Analyse einer altersabhängigen mRNA-Expression

Für die PCR-Analyse der altersabhängigen Expression der α_1 , β_1 und β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase der Ratte wurde Taq DNA Polymerase High Fidelity eingesetzt. Ein 25 µl Ansatz enthielt 1 µl der jeweiligen durch reverse Transkription gewonnenen cDNA entprechend 100 ng Gesamt-RNA. Die Oligonukleotide für die α_1 Untereinheit waren P173 (5'-CTG GCC ATT CTG CAG CTG GGT AAT-3') und P174 (5'-AGC CCG TGC CTG TTC CCC TAT C-3'), PCR-Produkt 378 bp, für die β_1 Untereinheit P33 (5'-TCC CTC TCC ATG ATG CTA CAC G-3') und P32 (5'-TCG CCA TCT ACT TGA ACT TGA CCA-3'), PCR-Produkt 517 bp, und für die β_2 Untereinheit P40 (5'-AGG GAA GAA GGA GCA TGT TGT GTT-3') und P53 (5'-TGA GGG TGG ACG ATG GAG AAA TAC-3'), PCR-Produkt 429 bp. Das PCR Profil war für die α_1 Untereinheit 95 °C 1 min, 34 Zyklen 95°C 40

s, 56 °C 40 s und 72 °C 1 min und für die β_1 und β_2 Untereinheiten 95 °C 1 min, 34 Zyklen 95 °C 20 s, 55 °C 20 s und 72 °C 30 s mit einem abschließendem Extensionsschritt von 4 min bei 72 °C in beiden Reaktionen.

2.2.16. Western blot-Analyse einer altersabhängigen Proteinexpression

Ein Antikörper gegen ein synthetisches Peptid der β_1 Untereinheit (H₂N-CSRKNTGTEETNQDEN-COOH, Aminosäuren 605 bis 619 der β_1 Untereinheit der Ratte) wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit diesem Peptid gewonnen. Für die Untersuchung der Proteinexpression der β_1 Untereinheit in neonatalem und adultem Lungengewebe der Ratte wurde aus entnommenem Gewebe (siehe 2.2.14.) die cytosolische Fraktion präpariert und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). 20 µg und 30 µg Gesamtprotein wurden im anschließenden Western blot eingesetzt. Der Antikörper wurde in einer 1:1000 Serumkonzentration verwendet. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Peptidverdrängung mit dem für die Immunisierung verwendeten synthetischen Peptid in einer Konzentration von 2,5 µg/ml überprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Chromosomale Lokalisation der Gene der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase des Menschen

3.1.1. Lokalisation des Gens GUCY1B2 der neu klonierten humanen B2 Untereinheit

In Abstimmung mit der Genbank Datenbank wurde unter Beachtung der Nomenklaturvorgaben für das Gen der humanen β_2 Untereinheit der Genname GUCY1B2 vorgeschlagen und als offizieller Genname und Datenbankeintrag festgelegt. Durch das Durchsuchen einer genomischen Bank mit der neuen menschlichen Teilsequenz der β_2 Untereinheit wurde ein genomischer PAC Klon von etwa 100 kb isoliert (LLNLP704E17877Q3). Durch direkte Sequenzierung dieses Klons wurde sichergestellt, dass dieser tatsächlich das Gen GUCY1B2 enthält. Zur chromosomalen Lokalisation des Genes wurde der isolierte PAC Klon mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung an menschlichen Metaphase-Chromosomen eingesetzt. Abbildung 3 zeigt beispielhaft einen Metaphase-Ausstrich humaner Chromosomen vor und nach der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Fluoreszenzsignale waren jeweils auf beiden Chromatiden der beiden Chromosomen 13 sichtbar. Durch Vergleich mit der vor der Fluoreszenz in situ Hybridisierung durchgeführten GTG-Bänderung konnte der chromosomale Bereich mit den positiven Signalen auf die chromosomale Bande 13q14 eingegrenzt werden.



Abbildung 3: Lokalisierung des PAC Klons LLNLP704E17877Q3 (β_2 Untereinheit) durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung. a: Metaphase-Ausstrich menschlicher Chromosomen nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit PAC LLNLP704E17877Q3 als molekulare Sonde. Die Pfeile weisen auf die sichtbaren Signale auf beiden Chromosomen 13 hin. Die Chromosomen wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Der PAC Klon wurde mit Fluorescein markiert. b: Der gleiche Metaphase-Ausstrich aus Lymphozyten mit einem normalen Karyotyp GTGgebändert vor der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Beide Chromosomen 13 sind durch Pfeile angezeigt.

3.1.2. Lokalisation des Gens GUCY1A3 der α_1 Untereinheit

Die Lokalisierung des Gens der humanen β_2 Untereinheit auf Chromosom 13 sollte in Beziehung zu der Lokalisation der anderen löslichen Guanylyl-Cyclase Untereinheiten gesetzt werden. Widersprüchliche Befunde existierten in der Literatur zu der Frage der Lokalisation des Gens GUCY1A3 der α_1 Untereinheit: Während Giuili und Mitarbeiter die α_1 Untereinheit zusammen mit der β_1 Untereinheit auf Chromosom 4 lokalisieren konnten, liegt die α_1 Untereinheit nach den Ergebnissen eines internationalen Konsortiums auf Chromosom 8 (Giuili et al. 1993, Schuler et al. 1996). Um diese widersprüchlichen Befunde zu klären und eine Kolokalisation der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten zu bestätigen oder zu widerlegen, wurden genomische PAC Klone, die die Gene der α_1 bzw. β_1 Untereinheit enthielten, identifiziert. Abbildung 4 zeigt eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Prometaphase-Chromosomen von normalen menschlichen Lymphozyten. Durch die humanen PAC Klone RPCIP704E0497Q25, RPCIP704P06831Q2 und RPCIP704P221187Q2 konnte die α_1 Untereinheit auf dem langen Arm von Chromosom 4 kartiert werden. Auf Chromosom 8 war mit diesen Klonen kein Signal detektierbar.





Abbildung 4: Lokalisierung des PAC Klons RPCIP704E0497Q25 (α_1 Untereinheit) durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung. a: Prometaphase-Ausstrich menschlicher Chromosomen nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit PAC RPCIP704E0497Q25 als molekulare Sonde. Die Pfeile weisen auf die sichtbaren Signale auf beiden Chromosomen 4 hin. Die Chromosomen wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Der PAC Klon wurde mit Fluorescein markiert. b: Der gleiche Prometaphase-Ausstrich aus Lymphozyten mit einem normalen Karyotyp GTG-gebändert vor der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Beide Chromosomen 4 sind durch Pfeile angezeigt.

3.1.3. Kolokalisation der Gene GUCY1A3 und GUCY1B3 der α_1 bzw. β_1 Untereinheit

Um die genomische Orientierung der α_1 und β_1 Untereinheiten auf Chromosom 4 zu untersuchen, wurden die PAC Klone RPCIP704E0497Q25 (α_1 Untereinheit) und RPCIP704I18992Q2 (β_1 Untereinheit) gleichzeitig in einer Zweifarbfluoreszenz in situ Hybridisierung an Prometaphase-Chromosomen eingesetzt. Ein Prometaphase-Ausstrich humaner Chromosomen ist in Abbildung 5 gezeigt. Hierdurch konnte das Gen GUCY1A3 der α_1 Untereinheit zentromerisch in der chromosomalen Region 4q31.1-31.2 und das Gen GUCY1B3 der β_1 Untereinheit telomerisch in der chromosomalen Region 4q31.3-q32 lokalisiert werden. Zwei in der Zweifarbfluoreszenz in situ Hybridisierung sichtbare, klar getrennten Signale der beiden Gensonden weisen auf einen Abstand beider Gene von mehr als 50 kb hin (Ferguson-Smith 1995).



Abbildung 5: Lokalisierung der PAC Klone RPCIP704E0497Q25 (α_1 Untereinheit) und RPCIP704I18992Q2 (β_1 Untereinheit) durch Zweifarbfluoreszenz in situ Hybridisierung. a: Prometaphase-Ausstrich menschlicher Chromosomen nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit den zuvor isolierten PAC Klonen als molekulare Sonden. Das Gen der α_1 Untereinheit (türkis, mit Fluorescein markiert) liegt zentromerisch in der chromosomalen Region 4q31.1-31.2. Das Gen der β_1 Untereinheit (rot, mit dem Indocarbocyanin-Farbstoff "CY3" markiert) liegt telomerisch in der chromosomalen Region 4q31.3-q32. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt. b: Der gleiche Prometaphase-Ausstrich aus Lymphozyten mit einem normalen Karyotyp GTG-gebändert vor der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Beide Chromosomen 4 sind durch Pfeile angezeigt.

3.1.4. Lokalisation des Gens GUCY1A2 der α_2 Untereinheit

Yu und Mitarbeiter haben das Gen der α_2 Untereinheit durch in situ Hybridisierung der cDNA in der Region q21-q22 des menschlichen Chromosoms 11 kartiert (Yu et al. 1996). Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden ist versucht worden, diese Lokalisation durch Untersuchung einer monochromosomalen Zellhybridsammlung zu bestätigen (human STS WI-7571). Aus den Untersuchungen ergab sich allerdings kein eindeutiges Ergebnis (Thomas Hudson, Whitehead Institute for Biomedical Research, persönliche Mitteilung). Um eine eindeutige Aussage über die Frage machen zu können, ob tatsächlich nur die Gene der α_1 und β_1 Untereinheiten kolokalisiert vorliegen und die Gene der α_2 und β_2 Untereinheiten auf einzelnen Chromosomen liegen, haben wir zusätzliche Untersuchung von Zellhybridsammlungen angestellt. Hierbei wurden die Oligonukleotide und PCR Bedingungen gewählt wie im Datenbankeintrag beschrieben (human STS WI-7571, Genbank G06596). Durch die Untersuchung einer monochromosomalen Zellhybridsammlung konnten wir die Lokalisierung des Gens der α_2 Untereinheit auf Chromosom 11 bestätigen. Eine zusätzliche Untersuchung von Hybridzellen, die verschiedene Teilabschnitte des Chromosoms 11 beinhalten, ist in

Abbildung 6 dargestellt. Hiermit wurde die Position des Genes weiter auf die Region q13.3-q23.2 eingegrenzt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Yu und Mitarbeitern.



Abbildung 6: Chromosomale Lokalisierung des Gens der humanen α_2 -Untereinheit durch PCR-Untersuchung eines Zellhybridpanels. a: Schematische Darstellung des humanen Chromosoms 11. Die Hybridzelllinien 11936, 11943, 13400, 10482 und 11944 beinhalten verschiedene Teilabschnitte des Chromosoms. b: Durch PCR-Untersuchung konnte das Gen der α_2 Untereinheit bei vier von fünf Hybridzelllinien nachgewiesen werden (PCR-Produkt 365 bp). Damit ergibt sich für das Gen eine Lokalisation in der Region q13.3-q23.2 des Chromosoms 11. Als Positivkontrolle diente ein Zellhybrid mit dem humanen Chromosom 11 (Chr. 11), als Negativkontrolle ein Zellhybrid mit dem humanen Chromosom 13 (Chr. 13). Mit Standard ist der DNA-Größenstandard (1 kb DNA Standard) bezeichnet.

3.2. Untersuchungen zu den orthologen β2 Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase

3.2.1. Klonierung der humanen β₂ Untereinheit

Die α_1 und β_1 Untereinheiten konnten bei einer Reihe von Spezies in voller Länge kloniert werden. Demgegenüber konnte die β_2 Untereinheit nur bei der Ratte gezeigt werden. Einige Autoren haben daher die Frage aufgeworfen, ob diese Untereinheit eine über diese Spezies hinausgehende Bedeutung hat (Denninger und Marletta 1999). Wir konnten mit Hilfe der 5' und 3' RACE PCR ein 2755 bp PCR-Produkt aus menschlicher Nieren-cDNA kloniert, das die cDNA der menschlichen β_2 Untereinheit in voller Länge repräsentiert. Die neue Sequenz wurde bei der Genbank unter der Nummer AF218382 eingereicht. Die Analyse der neuen menschlichen Nukleotidsequenz der β_2 Untereinheit zeigte einen offenen Leserahmen von 1854 bp (von Position 281 bis 2134). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies eine Aminosäureähnlichkeit von 78 % mit der β_2 Untereinheit der Ratte und 37 % mit der β_1 Untereinheit der Ratte auf. Im Vergleich mit der publizierten Sequenz der β_2 Untereinheit der Ratte (Yuen et al. 1990) war die Sequenz N-terminal um 17 Aminosäuren verkürzt. In Abbildung 7 ist ein Aminosäurevergleich der N-terminalen Bereiche der neu identifizierten humanen β_2 Untereinheit und der publizierten Sequenzen beider β Untereinheiten der Ratte abgebildet. Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang 6.1. abgebildet.

5' nichttranslatierter Bereich*

Mensch β₂* MYGFINTCLQSLVIEKFGEETWEKLKTSAEVQDA--FMTYTMYDDVITIKLIQEACNILGV Ratte β₂ Ratte β₁ MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNL

offener Leserahmen

Mensch β ₂	K <mark>MSGYDRMLRTLGGNL</mark> MEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRV
Mensch β ₂ *	S <mark>MEAILKLFGEYF</mark> -Q <mark>F</mark> .
Ratte β ₂	<mark>MEAILKLFGEYF</mark> FK <mark>F</mark> CK <mark>MSGYDRMLRTLGGNL</mark> TEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRV
Ratte β1	NAGE <mark>IL</mark> QM <mark>FG</mark> KM <mark>F</mark> FV <mark>F</mark> CQE <mark>SGYD</mark> TI <mark>LR</mark> VLGSNVR <mark>EF</mark> LQNLDALHDHLATI <mark>Y</mark> PG <mark>MRAPSFR</mark> C

Abbildung 7: Aminosäurevergleich der neu klonierten humanen β_2 Untereinheit mit der β_2 und β_1 Untereinheit der Ratte. Die erste Zeile zeigt die abgeleitete menschliche Aminosäuresequenz aus dem 5' nichttranslatierten Bereich (Mensch β_2^* , das Stopcodon wir durch einen Punkt dargestellt). Der Anfang des offenen Leserahmens von der Position 281 plus einem Lysin (K) vor dem Startmethionin (M) ist mit "Mensch $\beta_2^{\text{"}}$ bezeichnet. Zum Vergleich sind die publizierten Sequenzen der β_2 und β_1 Untereinheiten der Ratte (swissprot: P22717 bzw. P20595) dargestellt. Abgeleitete Aminosäuren der humanen β_2 Untereinheit, die mit den β Untereinheiten der Ratte übereinstimmend, sind im 5' nichttranslatierten Bereich gelb und im offenen Leserahmen türkis hinterlegt.

In einem anderen Leserahmen der humanen β_2 Untereinheit im 5' nichttranslatierten Bereich konnte eine abgeleitete Aminosäuresequenz mit Homologie zur β_2 Untereinheit der Ratte identifiziert werden. Diese Sequenz ist in Abbildung 7 abgebildet. Die weitere Analyse dieser Aminosäuresequenz ergab eine Sequenz von 74 Aminosäuren (abgeleitet von den Nukleotiden 54-278) mit 33 % Aminosäureähnlichkeit zu den ersten 77 Aminonsäuren der β_1 Untereinheit der Ratte. Insbesondere war das Sequenzmotif "MYG" (Einbuchstabencode der Aminosäuren, Nomenklatur Komitee der internationalen Union der Biochemie, Eur J Biochem 1985) vorhanden, das in β Untereinheiten selbst entfernter Spezies wie der Fruchtfliege (Drosophila, Shah und Hyde 1995), des Tabakschwärmers (Manduca sexta, Nighorn et al. 1998, Nighorn et al. 1999) und des japanischen Knochenfisches Medaka (Oryzias latipes, Mikami et al. 1998) konserviert ist. Beide Aminosäuresequenzen würden durch das Einfügen eines Nukleotids in die Sequenz verbunden werden wie es bei der β_2 Untereinheit der Ratte der Fall ist. Die Leserasterverschiebung beim Menschen konnte aber einen Fehler der DNA Polymerase oder der Reversen Transkriptase darstellen. Um dies auszuschließen wurde das kritische Exon aus dem zuvor isolierten humanen PAC Klon (LLNLP704E17877Q3), der das Gen GUCY1B2 enthält, direkt subkloniert. Die Sequenzierung des so isolierten Exons ergab eine Übereinstimmung mit der cDNA-Nukleotidsequenz auf genomischer Ebene (eingereicht bei der Genbank unter AF218383).

3.2.2. Identifikation einer menschenspezifischen Leserasterverschiebung der B2 Untereinheit

Um zu untersuchen wie weit die Diskrepanz zwischen der neuen humanen Sequenz und der orthologen Sequenz bei der Ratte in der Evolution zurückreicht, klonierten wir das entsprechende Exon von GUCY1B2 bei vier dem Menschen nahe verwandten Primaten. Beim Schimpansen (Pan troglodytes, bei der Genbank eingereicht unter AF218386), Gorilla (Gorilla gorilla, AF218385), Gibbon (Hylobates lar, AF218387) und Rhesusaffen (Macaca mulatta, AF218384) war der Leserahmen in dem betreffenden Exon durchgehend. Abbildung 8 zeigt einen Sequenzvergleich der fraglichen Abschnitte beim Menschen, der Ratte und den untersuchten nichtmenschlichen Primaten. Bei allen nichtmenschlichen Primaten führt der durchgehende Leserahmen zu einer Verbindung der entsprechenden Aminosäuresequenzen mit Homologie zur β_2 Untereinheit der Ratte. Wie bei der Sequenz der β_2 Untereinheit der Ratte war ein zusätzliches Phenylalanincodon in den nichtmenschlichen Primatensequenzen vorhanden.

Ratte	GGC	GAA	TAC	TTC	TTT	AAG	TTC	TGT	AAG	ATG	
Rhesusaffe	GGA	GAA	TAC	TTC	TTT	CAA	TTC	TAT	AAG	ATG	
Gibbon	GGA	GAA	TAC	TTC	TTT	CAA	TTC	TGT	AAG	ATG	
Gorilla	GGA	GAA	TAC	TTC	TTT	CAA	TTC	TGT	AAG	ATG	
Schimpanse	GGA	GAA	TAC	TTC	TTT	CAA	TTC	TGT	AAG	ATG	
Mensch	GGA	<mark>GAA</mark>	TAC		T <mark>TT</mark>	C AA	TT <mark>C</mark>	TG-	AAG	ATG	
Restriktionsenzym		Xmn] <mark>GAA</mark> Phen	nnn ylalar	 1111	n <mark>TT</mark>	C	Eco57I <mark>C TG</mark> - <mark>AAG</mark> Leserasterverschieb				

Abbildung 8: Nukleotidsequenzvergleich der β_2 Untereinheiten des Menschen, der Ratte und nichtmenschlicher Primaten (Nukleotide 258 bis 283 der menschlichen Untereinheit (AF218382)). Gelb dargestellt ist die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XmnI. Türkis dargestellt ist die entsprechende Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Eco57I.

Der evolutionäre Unterschied zwischen humanen und nichthumanen Primaten warf die Frage auf, ob die beobachtete menschliche Leserasterverschiebung in der generellen menschlichen Population verbreitet ist. Um einen schnellen Test für die Analyse von genomischer DNA zu entwickeln, wurden die gleichen Oligonukleotide wie zu der Amplifikation der entsprechenden Sequenzen bei nichtmenschlichen Primaten verwendet. Wie in Abbildung 8 gezeigt ist, enthält die entsprechende aus dem PAC Klon LLNLP704E17877Q3 isolierte menschliche Sequenz eine Eco57I Restriktionsschnittstelle, die kritisch von dem gegenüber den Primatensequenzen fehlenden Nukleotid abhängt, das die Leserasterverschiebung verursacht. Diese Eco57I Restriktionsschnittstelle fehlt daher in den untersuchten nichtmenschlichen Primatensequenzen. Zusätzlich weist die menschliche Sequenz eine XmnI Restriktionsschnittstelle auf, die von dem fehlenden Phenylalanincodon in der menschlichen
Sequenz abhängt. Durch PCR Amplifikation und anschließende Restriktionsanalyse wurde die zuvor isolierte Leserasterverschiebung bei verschiedenen menschlichen Individuen untersucht. Genomische DNA mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund wurde für diese Untersuchung freundlicherweise von Svante Pääbo (Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie, Leipzig) und Hans Eiberg (Institute of Medical Genetics, Kopenhagen) zur Verfügung gestellt. Weitere menschliche DNA Proben wurden aus der im Labor zur Verfügung stehenden Sammlung von menschlichen Herzgeweben und aus dem Blut freiwilliger, anonymisierter Probanden präpariert. Es wurden insgesamt ca. 130 überwiegend deutschstämmige Individuen (genomische DNA aus Herzgewebe und Blutproben), 2 indonesische, 1 indische, 1 iranische, 1 thailändische, 1 philippinische, 2 japanische, 2 chinesische, 6 afrikanische Individuen und 4 australische Aboriginee (Svante Pääbo, Leipzig) sowie 17 grönländische Inuits und 11 Personen mit der autosomal dominant vererblichen Krankheit Enuresis nocturna (Hans Eiberg, Kopenhagen) untersucht. In allen Fällen war die Eco57I Restriktionsschnittstelle nachweisbar, was auf die Anwesenheit der Leserasterverschiebung in allen diesen Fällen hindeutete. Eine exemplarische Untersuchung der Leserasterverschiebung ist in Abbildung 9 dargestellt. Analoge Ergebnisse wurden mit dem Restriktionsenzym XmnI erzielt, was auf das Fehlen des Phenylalanincodons bei allen untersuchten menschlichen Individuen hindeutete.



Abbildung 9: PCR- und Restriktionsanalyse von genomischer DNA dreier menschlicher Individuen (Person A-C) auf das Vorliegen der Leserasterverschiebung im Gen GUCY1B2. Zum Vergleich wurde genomische DNA der nichtmenschlichen Primaten Gorilla und Rhesusaffe der gleichen Analyse unterworfen. Das PCR-Produkt wurde zum Vergleich jeweils ungeschnitten (-) und mit dem Restriktionsenzym Eco57I geschnitten (+) aufgetragen. Erwartete PCR-Produkt-Längen waren 213 bp für nichtmenschliche Primaten und 209 bp für Menschen, nach Eco57I Restriktionsverdau von Fragmenten mit Leserasterverschiebung 151 bp und 58 bp.

Um diese Daten zu bestätigen, führten wir Southern blot-Untersuchungen mit genomischer DNA nach Restriktionsverdau mit XmnI durch. Aufgrund der vorherigen Analyse des menschlichen PAC Klons (siehe 2.2.9.) erwarteten wir ein Fragment von 2400 bp für die Allele mit der XmnI Restriktionsschnittstelle und 7100 bp für die Allele, die diese Restriktionsschnittstelle nicht enthalten. Als Kontrolle wurde die Untersuchung parallel an genomischer DNA des Rhesusaffen durchgeführt. Abbildung 10 zeigt einen repräsentativen Vergleich von genomischer DNA des Rhesusaffens und verschiedener menschlicher Individuen. Eine einzelne Bande von 2400 bp war sichtbar bei menschlicher genomischer DNA, während wie erwartet eine Bande bei 7100 bp für die Rhesusaffen DNA nachweisbar war. Die Analyse von verschiedenen menschlichen DNA Proben bestätigte die vorherigen Daten und sprach damit für die Gegenwart dieser menschenspezifischen Leserasterverschiebung in der allgemeinen Bevölkerung.



Abbildung 10: Southern blot-Analyse der humanen Leserasterverschiebung nach Restriktionsverdau von genomischer DNA mit XmnI. Eine spezifische Sonde aus dem 5' Bereich der Leserasterverschiebung wurde eingesetzt. a: Eine menschenspezifische XmnI Schnittstelle war bei allen untersuchten menschlichen Individuen vorhanden (Person A-F), es entstehen ca. 2400 bp lange Restriktionsfragmente. b: Bei einer vergleichenden Analyse von Mensch (Person G) und Rhesusaffe zeigte sich beim Rhesusaffen durch die Abwesenheit der fraglichen Restriktionsschnittstelle ein Fragment von ca. 7100 bp.

Beim Rhesusaffen wurde sowohl durch die PCR-Analyse als auch durch die Southern blot-Analyse die Abwesenheit der Leserasterverschiebung auf genomischer Ebene gezeigt. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob der daraus theoretisch resultierende durchgängige Leserahmen auch auf mRNA-Ebene nachweisbar ist. Nierengewebe eines Rhesusaffen wurde freundlicherweise vom Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen zur Verfügung gestellt. Hieraus wurde RNA präpariert. Durch RT-PCR mit Oligonukleotiden, die für die menschliche β_2 Untereinheit spezifisch sind, konnte ein 779 bp langes Fragment amplifiziert werden. Wie erwartet wies dieses Fragment im fraglichen Bereich keine Leserasterverschiebung auf. Allerdings zeigten sich bei dem amplifizierten Fragment im Vergleich zum humanen Klon an anderen Positionen Einschübe oder Deletionen. So fehlen die Nukleotide 597 bis 605 und 792 bis 895 des humanen Klons, zusätzliche 97 Nukleotide sind hinter der Positionen 493 und ein zusätzliches Nukleotid hinter Position 932 des humanen Klons eingefügt. Dadurch kommt es zu mehreren Leserasterverschiebungen. Ein offener Leserahmen über die gesamte Länge des isolierten Fragmentes ist daher auch bei der isolierten Sequenz des Rhesusaffen nicht vorhanden. Ein Vergleich der isolierten Sequenz mit der humanen Sequenz ist im Anhang 6.2. gezeigt.

3.2.3. Abweichung der C-terminalen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit im Vergleich zu anderen Spezies

Wie bei der Leserasterverschiebung im N-terminalen Abschnitt kommt es auch im C-terminalen Abschnitt zu Abweichungen der humanen β_2 Untereinheit von der β_2 Untereinheit der Ratte. Die humane Untereinheit ist hierbei um 49 Aminosäuren verkürzt und besitzt kein abschließendes Isoprenylierungsmotiv (CVVL). Allerdings weist eine aus dem 3' nicht translatierten Bereich abgeleitete Aminosäuresequenz (Nukleotide 2468 bis 2713) eine Ähnlichkeit von ca. 37 % zum Cterminalen Abschnitt der Ratte auf. Dies schließt ein C-terminales Isoprenylierungsmotif ein (CVLL). Die Vermutung war daher, dass es sich bei dem isolierten Klon um eine im 3' Bereich nicht vollständig oder alternativ gespleißte Variante handeln könnte. Wir untersuchten daraufhin die Sequenz dieses Bereiches auf genomischer Ebene, um potentielle Spleißsignale zu identifizieren. Aus humaner genomischer DNA wurde mittels PCR ein Fragment aus dem fraglichen 3' Bereich amplifiziert und zum Teil sequenziert (Sequenz im Anhang 6.3.). In einer Computeranalyse wurden mehrere potentielle Donor- (Exon/Intron-Grenzen) und Akzeptorstellen (Intron/Exon-Grenzen) identifiziert. Die Spleißstellenwahrscheinlichkeit wurde nach der Methode von Shapiro und Senapathy bewertet (Shapiro und Senapathy 1987). Mit Hilfe der ermittelten Donor- und Akzeptorstellen konnten verschiedene theoretische Spleißvarianten konstruiert werden. Neben der von uns isolierten cDNA-Sequenz wurden vier theoretische Spleißvarianten mit offenem Leserahmen bis zur Isoprenylierungssequenz identifiziert. Eine dieser Spleißvarianten zeigte Ähnlichkeit zur Rattensequenz. Eine schematische Darstellung des isolierten genomischen Abschnittes und einiger theoretisch möglicher Spleißvarianten ist in Abbildung 11 gezeigt. Weitere Experimente wurden durchgeführt mit der Fragestellung, ob diese theoretischen Spleißvarianten auch tatsächlich gebildet werden. Hierzu wurde die β_2 Untereinheit des Rhesusaffen untersucht. Für den Rhesusaffen konnten schon im N-terminalen Bereich der β_2 Untereinheit Unterschiede zum Menschen und Homologien zur Rattensequenz gezeigt werden (siehe 3.2.). Andererseits können Sequenzinformationen vom Rhesusaffen aufgrund der stark konservierten DNA-Sequenz helfen, Rückschlüsse auf humane Sequenzen zu ziehen. Eine vergleichende Untersuchung von DNA-Sequenzen vom Rhesusaffen und dem Menschen sollte daher auch für diese C-terminale Region durchgeführt werden. Mittels RT-PCR konnten zwei Sequenzen der B2 Untereinheit des Rhesusaffen aus dem fraglichen Bereich isoliert werden (Sequenzen im Anhang 6.4.). Diese unterscheiden sich durch einen Einschub von 108 bp. Beide stimmen im fraglichen Bereich mit der durch Analyse der Spleißstellen vorhergesagten humanen Spleißvariante überein, die zur Rattensequenz homolog ist (Abbildung 11). Somit konnte beim

Rhesusaffen das Vorliegen einer Spleißvariante mit Isoprenylierungsmotif gezeigt werden. Für weitere Untersuchungen beim Menschen wurden mehrere Oligonukleotide ausgesucht, die für die beim Rhesusaffen isolierte Spleißvariante spezifisch waren. In PCR-Untersuchungen konnte kein Fragment aus humanen cDNA-Proben amplifiziert werden. Dies spricht für das Vorliegen eines weiteren wichtigen Unterschiedes der β_2 Untereinheit zwischen Mensch und nichtmenschlichen Primaten.



Abbildung 11: Schematische Darstellung des amplifizierten Fragmentes aus dem genomischen 3' Bereich der β_2 Untereinheit des Menschen. In einer Computeranalyse wurden mehrere potentielle Spleißstellen identifiziert. Eine Auswahl der potentiellen Donorstellen (Exon/Intron-Grenzen) und Akzeptorstellen (Intron/Exon-Grenzen) ist gezeigt. Spleißstellenwahrscheinlichkeiten nach Shapiro und Senapathy sind für Donorstellen rot, für Akzeptorstellen grün angegeben. Verschiedene potentielle Spleißvarianten sind mit ihren offenen Leserahmen abgebildet. Die identifizierte humane Spleißvariante führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch (Stop). Eine alternative, beim Rhesusaffen gefundene Spleißvariante endet mit einem Isoprenylierungsmotif (...CVLL) und ist homolog zur Rattensequenz. Drei weitere mögliche Spleißvarianten mit offenem Leserahmen bis zu einem abschließenden Isoprenylierungsmotif sind abgebildet.

3.2.4. Identifikation eines neuen Startcodons der β_2 Untereinheit der Ratte

Der menschliche Klon der β_2 Untereinheit weist in einem Leserahmen Homologien zum N-terminalen Abschnitt der β_1 Untereinheit auf (Abbildung 7). Besonders ein auch in β Untereinheiten von evolutionär weit entfernten Spezies konserviertes "MYG"-Motiv ist vorhanden. Dies warf die Frage auf, ob die β_2 Untereinheit der Ratte ebenfalls ein solches Motiv beinhaltet könnte. Die von Yuen und Mitarbeitern veröffentlichte Sequenz ist im Vergleich zur β_1 Untereinheit N-terminal um 62 Aminosäuren verkürzt (Yuen et al. 1990). Im 5' nicht translatierten 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 nicht vollständig gespleißte, intronhaltige mRNA-Spezies handelt (Koesling 1995). Koesling konnte einen im 5' Bereich verlängerten Klon isolieren (Koesling 1995). Dieser Klon weist starke Homologien zu der von uns klonierten menschlichen β_2 Untereinheit auf, allerdings fehlt bei diesem Klon in der abgeleiteten Aminosäuresequenz das Methionin (M) des Startmotives "MYG". Ein anderes Methionin wurde daher von Koesling als Startcodon angenommen, so dass der erhaltene Klon im Vergleich zur β_1 Untereinheit N-terminal um neun Aminosäuren verlängert ist. Bei diesem Klon konnte ebenso wie bei dem von Yuen isolierten Klon keine Enzymaktivität festgestellt werden. Wir vermuteten daher, dass es sich bei diesem Klon ebenfalls um eine im 5' Bereich nicht vollständig gespleißte Variante handelt und konnten mit Hilfe einer RACE PCR eine neue Sequenz aus dem 5' Bereich isolieren (Nukleotid- und Aminosäuresequenz im Anhang 6.5.). Abbildung 12 zeigt die hieraus abgeleitete Aminosäuresequenz mit einem konservierten "MYG" Motif. Ein Klon der β_2 Untereinheit der Ratte mit diesem neuen Startcodon konnte identifiziert werden. Die Sequenz wurde bei der Genbank unter der Nummer AY004153 eingereicht. Der neue Klon der β_2 Untereinheit wurde innerhalb der Arbeitsgruppe auf Enzymaktivität untersucht. Es konnte bisher allerdings sowohl bei isolierter Expression als auch bei Koexpression mit anderen Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase in Sf9-Zellkultur keine Aktivität gemessen werden.

β_1	Nakane	11	MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRI
β_2	neu	11	MYGFINTCLQSLVTEKFGEETWEKLKASAEVQDAFMTYTV-
β_2	Koesling	11	MCLFTSLWNLYGFINTCLQSLVTEKFGEETWEKLKASAEVQDAFMTYTV-
β_2	Yuen		
β_1	Nakane	42	IYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGEILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLG
β_2	neu	40	-YDDIITIKLIQEACKVLDVSMEAILKLFGEYFFKFCKMSGYDRMLRTLG
ß2	Vooling	ΕO	VDDTTETZI TODA CZULI DUCMEN TI ZI ECEVERZEZZMOCU DDMI DELC
P^2	Roesning	59	- IDDITITKLIQEACKVLDVSMEATLKLFGEIFFKFCKMSGIDRMLRILG

Abbildung 12: Aminosäuresequenzvergleich der verschiedenen Klone der β_2 Untereinheiten der Ratte und dem von Nakane und Mitarbeitern isolierten Klon der β_1 Untereinheit der Ratte (Nakane et al. 1988). Der von Yuen und Mitarbeitern isolierte Klon ist im Vergleich zur β_1 Untereinheit N-terminal um 62 Aminosäuren verkürzt (Yuen et al. 1990). Koesling isolierte einen im N-terminalen Abschnitt verlängerten Klon (Koesling 1995). Der neu isolierte Klon (β_2 neu) besitzt als einziger β_2 Klon die in β Untereinheiten verschiedener Spezies stark konservierte Aminosäure-Startsequenz "MYG". Homologe Aminosäuren der verschiedenen β_2 Klone mit der β_1 Untereinheit sind grau hinterlegt.

Eine weitere, nicht vollständig gespleißte Sequenz von 1119 Nukleotiden konnte in der 5' RACE PCR isoliert werden (Sequenz im Anhang 6.6.). Diese zeigt, dass der von Koesling isolierte Klon eine alternative Spleißvariante darstellt. Die isolierte Sequenz enthält zwei Exons, die den von Koesling isolierten äußersten 5' Bereich bilden. Die betreffende Sequenzbereiche werden bei einer Spleißstellenanalyse als Donor- und Akzeptorstrellen mit hoher Spleißstellenwahrscheinlichkeit erkannt (Werte von 87. bzw. 86. nach Shapiro und Senapathy 1987). Beide Exons werden durch einen

Intronabschnitt von 292 bp getrennt. Das von uns neu identifizierte Exon liegt nicht auf der isolierten ungespleißten Sequenz. Daher werden die beiden Exons, die zusammen das "MYG"-Motif bilden, durch einen mindestens 869 bp langen Abschnitt getrennt.

3.3. Untersuchungen zur Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase

3.3.1. Tumorspezifische Expression der humanen β_2 Untereinheit

Eine Vergleich der neuen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit mit bereits in der Genbank Datenbank vorhandenen Sequenzen zeigte Übereinstimmungen im 3' nichttranslatierten Bereich der β_2 Untereinheit mit drei bisher nicht zugeordneten EST-Sequenzen aus menschlicher Niere (Genbank: AI822009, AI792818 und AA917369). Zusätzlich wurde eine andere, bisher nicht zugeordnete EST-Sequenz aus einem geringgradig differenzierten Adenokarzinom des Magens mit Siegelringzellanteilen als Fragment des 3' nichttranslatierten Bereich der menschlichen β_2 Untereinheit identifiziert (Genbank: AI247180). Eine Expression der β_2 Untereinheit in der menschlichen Niere steht in Übereinstimmung mit der vorwiegenden Expression in der Rattenniere (Yuen et al. 1990) und der Klonierung der humanen Untereinheit aus Nieren-cDNA. Um zu klären, ob die Expression in einem Magenadenokarzinom mit Siegelringzellanteilen eine generelle Expression der β_2 Untereinheit im Magen oder eine tumorspezifische Expression widerspiegelt, wurde durch PCR die Expression der menschlichen β_2 Untereinheit in einem Siegelringzellkarzinom mit der Expression in normalem Magengewebe verglichen. Wie in Abbildung 13 gezeigt, konnte die Expression der β_2 Untereinheit durch Amplifikation eines 1546 bp langen Fragmentes aus cDNA im Siegelringzellkarzinom des Magens, nicht aber in normalem Magengewebe desselben Patienten nachgewiesen werden. Als Kontrolle der cDNA wurde eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die β_1 Untereinheit durchgeführt, welche sowohl im Tumorgewebe als auch in normalem Magengewebe nachgewiesen werden konnte. Um eine Expression in weiteren Tumoren nachzuweisen, wurde cDNA aus verschiedenen Tumorgeweben in analoger Weise untersucht. Eine Expression der β_2 Untereinheit konnte damit auch in einem Mamma-, einem Colon-, einem Ovarial-, einem Lungen- und einem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden, während ein Nachweis von β_2 -cDNA in einem anderen Lungen- und Colonkarzinom und einem Prostatakarzinom nicht gelang.



Abbildung 13: Durch Amplifikation eines 1576 bp langen Fragments wurde eine tumorspezifische Expression der β_2 Untereinheit im Siegelringzellkarzinoms des Magens (T) im Vergleich zu normalem Magengewebe (N) gezeigt. Ein Fragment von 846 bp der β_1 Untereinheit wird als Kontrolle sowohl im Tumor- als auch im normalen Magengewebe amplifiziert. Als Positivkontrolle (+) diente cDNA aus menschlicher Placenta, als Negativkontrolle (-) H₂O. Die auf Höhe von ca. 100 bp laufenden Banden sind durch die PCR entstehende Artefakte (Primer-Dimer).

3.3.2. Altersabhängige Expression der β₂ Untereinheit der Ratte

Bloch und Mitarbeiter konnten in der Lunge eine physiologische Expressionsregulation für die α_1 und β_1 Untereinheit auf mRNA-Ebene zeigen (Bloch et al. 1997). Die Expression der Untereinheiten in der Lunge ist dabei altersabhängig. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Untersuchungen zur Expression der β_2 Untereinheit in der Lunge von neonatalen und adulten Ratten durchgeführt. Yuen und Mitarbeiter konnten die β_2 Untereinheit erstmals aus Nierengewebe klonieren (Yuen et al. 1990). Daher wurde zusätzlich zur Lunge die β_2 Expression in den Nieren von neonatalen und adulten Ratten gemessen. Gesamt-RNA wurde aus den entnommenen Organen isoliert und mittels RT-PCR die Expression der β_2 Untereinheit untersucht. Wie in Abbildung 14 gezeigt, wurde die β_2 Untereinheit in der Lunge bei neonatalen Tieren deutlich stärker exprimiert als bei adulten Tieren, bei denen nur ein schwaches Signal detektierbar war. In der Niere wurde eine deutlich stärkere Expression bei adulten Tieren als bei neonatalen Tieren gemessen. Für die Organverteilung der β_2 Untereinheit bei neonatalen Ratten ergibt sich hieraus, gemessen an der Gesamt-RNA, eine deutlich stärkere Expression in der Lunge im Vergleich zur Niere. Bei adulten Ratten sind die Verhältnisse umgekehrt mit einer stärkeren Expression in der Niere im Vergleich zur Lunge. Die Ergebnisse der RT-PCR Untersuchung konnten innerhalb der Arbeitsgruppe durch RNase Protection Assay bestätigt werden.



Abbildung 14: Vergleich der mRNA-Expression der β_2 Untereinheit in Lunge und Niere von neonatalen (neo) und adulten Ratten. Mittels RT-PCR wurde ein 429 bp Fragment amplifiziert. Es besteht in beiden Organen eine altersabhängige Expression, wobei die β_2 Untereinheit in der Lunge wesentlich stärker bei neonatalen Ratten und in der Niere wesentlich stärker bei adulten Ratten exprimiert wird. Den Ansätzen wurde 1 µl Reverse Transkriptase (+) oder 1 µl Wasser als Negativkontrolle (-) hinzugefügt.

3.3.3. Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungen- und Nierengewebe der Ratte

Unsere Untersuchung basierte auch hier auf den Ergebnissen von Bloch und Mitarbeitern, die eine altersabhängige mRNA-Expression der α_1 und β_1 Untereinheit im Lungengewebe der Ratte nachweisen konnten (Bloch et al. 1997). Hierbei wurde in der Perinatalzeit eine stärkere mRNA-Expression beider Untereinheiten im Vergleich zu adulten Ratten gezeigt. Zusätzlich konnte mittels Western blot eine stärkere Proteinexpression der α_1 Untereinheit im perinatalen Lungengewebe gezeigt werden (Bloch et al. 1997). Wir konnten mittels RT-PCR diese Ergebnisse auf mRNA Ebene bestätigen. In der Lunge wurde für beide Untereinheiten eine stärkere Expression bei neonatalen Ratten im Vergleich zu adulten Ratten gezeigt. Zusätzlich untersuchten wir die Expression beider Untereinheiten im Nierengewebe. Im Gegensatz zur Lunge zeigte sich hier für beide Untereinheiten kein Unterschied in der mRNA-Expression zwischen neonatalen und adulten Ratten. Die Ergebnisse der RT-PCR konnten innerhalb der Arbeitsgruppe durch RNase Protection Assay bestätigt werden. Darüberhinaus wurde die Expression der β_1 Untereinheit im Lungengewebe auch auf Proteinebene gemessen. Im Western blot zeigten sich für die β_1 Untereinheit analoge Ergebnissen zu denen der Arbeitsgruppe um Bloch für die α_1 Untereinheit. In Abbildung 15 ist ein repräsentativer Western blot gezeigt. Die β_1 Untereinheit weist im neonatalem Lungengewebe eine stärkere Proteinexpression auf als im adulten Gewebe. Im Lungengewebe liegt also auch auf Proteinebene eine altersabhängige, koordinierte Expression beider Untereinheiten vor



Abbildung 15: Western blot-Analyse der cytosolischen Fraktion aus neonataler und adulter Rattenlunge. 20 μ g oder 30 μ g Gesamtprotein wurden pro Bahn geladen und mit einem gegen ein synthetisches Peptid der β_1 Untereinheit gerichteten Antikörper inkubiert (1:1000 Serum-Konzentration). Die Spezifität wurde durch Zugabe des für die Immunisierung benutzten Peptides in einer Endkonzentration von 2,5 μ g/ml überprüft (+p). Der Western blot zeigt in der Lunge neonataler Ratten eine stärkere Proteinexpression im Vergleich zu adulten Ratten.

3.3.4. Untersuchung der Promotorabschnitte der Gene der α_1 und β_1 Untereinheit

Um Hinweise auf den Mechanismus der Expressionsregulation der α_1 und β_1 Untereinheit zu untersuchen, wurden aus den humanen PAC Klonen RPCIP704E0497Q25 (α_1) und RPCIP704I18992Q2 (β_1) Promotorregionen im 5' Bereich des jeweiligen ersten Exons isoliert. Diese Promotorregionen wiesen in einer Computeranalyse Konsensussequenzen für die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren auf. Sie wurden in einen Vektor kloniert, der die cDNA-Sequenz für Luciferase enthält. Mit Hilfe dieser Konstrukte wurden die isolierten Fragmente auf ihre Promotoraktivität untersucht. Hierbei zeigten die Fragmente vergleichbare Promotoraktivität von 10 % (α_1) und 12 % (β_1) im Vergleich zur Positivkontrolle. Mit diesen ersten Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die humanen PAC Klone der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase gute Werkzeuge zur Analyse von Promotorabschnitten darstellen.



Abbildung 16: Analyse der Promotoraktivität der isolierten DNA Fragmente der α_1 und β_1 Untereinheit. Links: Schematische Darstellung der untersuchten Konstrukte. Die Promotorregionen wurden vor das Gen der Luciferase mit nachfolgendem SV40 Enhancer kloniert. Als Positivkontrolle diente ein Konstrukt mit vorgeschaltetem SV40 Promotor, als Negativkontrolle ein Konstrukt ohne Promotor. Rechts: Die Promotoraktivität wurde durch Messung der Luciferaseaktivität ermittelt. Die Luciferaseaktivität ist in Relation zur Positivkontrolle dargestellt.

4. DISKUSSION

Die lösliche Guanylyl-Cyclase spielt als physiologischer Rezeptor für NO und NO-freisetzende Pharmaka eine wichtige Rolle im menschlichen Herz-Kreislauf-System. Während bei Säugern vier verschiedene Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase kloniert werden konnten, konnten von diesen bisher nur drei beim Menschen nachgewiesen werden (Harteneck et al. 1991, Giuili et al. 1992). Die β_2 Untereinheit wurde bisher nur bei der Ratte identifiziert (Yuen et al. 1990). Zehn Jahre nach ihrer Identifikation ist noch wenig über ihre Funktion bekannt. Daher wurde eine generelle, über die Ratte hinausgehende Bedeutung dieser Untereinheit in Frage gestellt (Denninger und Marletta 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte ein vollständiger Klon der humanen β_2 Untereinheit identifiziert werden.

4.1. Die β₂ Untereinheit bei verschiedenen Spezies

Gupta und Mitarbeitern ist es gelungen, eine Guanylyl-Cyclase Aktivität der β_2 Untereinheit zu zeigen. Ein Heterodimer aus β_2 und α_1 Untereinheit der Ratte konnte durch NO aktiviert werden, allerdings war die Aktivitätssteigerung nur halb so groß wie die des Heterodimers bestehend aus α_1 und β_1 Untereinheit (Gupta et al. 1997). Diese Ergebnisse konnten bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden (Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). In den Untersuchungen von Gupta und Mitarbeitern wurde der 1990 identifizierte Klon der β_2 Untereinheit der Ratte verwendet (Yuen et al. 1990). Dieser besitzt eine im Vergleich zur β_1 Untereinheit um 62 Aminosäuren verkürzte Häm-Bindungsdomäne. Koesling konnte zeigen, dass der von Yuen und Mitarbeitern isolierte Klon eine im N-terminalen Bereich unvollständig gespleißte Variante darstellt und einen neuen N-terminal verlängerten Klon isolieren (Koesling 1995). Dieser zeigte im N-terminalen Bereich Ähnlichkeiten mit der β_1 Untereinheit. Allerdings wies der von Koesling isolierte Klon nicht das Startmotif "MYG" auf, das in den β Untereinheiten auch evolutionär weit entfernter Spezies (Fruchtfliege Drosophila (Genbank: AAA87941), Tabakschwärmer Manduca sexta (Genbank: AF064514), Medaka-Fisch Oryzias latipes (Genbank: AB000850)) konserviert ist. Daher stellte sich die Frage, ob der von Koesling isolierte Klon ebenfalls eine nicht vollständig gespleißte Variante darstellt. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit einen Klon der B2 Untereinheit der Ratte mit dem Startmotiv "MYG" isolieren. Dieser Klon ist im Vergleich zu dem veröffentlichten und von Gupta und Mitarbeitern verwendeten Klon N-terminal um 64 Aminosäuren verlängert. Die von uns neu klonierte β_2 Untereinheit und die β_1 Untereinheit weisen eine gleiche Länge am N-teminalen Ende auf mit einer Aminosäureähnlichkeit von 35 %. Aufgrund dieser Ähnlichkeit können durch Betrachtung der Eigenschaften dieses Bereiches der β_1 Untereinheit Rückschlüsse auf die β_2 Untereinheit gezogen werden. α_1/β_1 Heterodimere mit N-terminal verkürzter α_1 oder β_1 Untereinheit wurden auf ihre

Aktivierbarkeit durch NO untersucht (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996). Eine Guanylyl-Cyclase mit einer N-terminal um 64 Aminosäuren verkürzten β_1 Untereinheit zeigte hierbei einen Verlust der prosthetischen Häm-Gruppe. Daraus resultierte eine komplette Aufhebung der Aktivierbarkeit durch NO. Eine basale Guanylyl-Cyclase Aktivität war dagegen auch bei dieser N-terminalen Deletionsmutante vorhanden. Daher erscheint die Aktivierbarkeit eines Heterodimers aus verkürzter β_2 Untereinheit und α_1 Untereinheit durch NO, wie von Gupta und Mitarbeitern gefunden, zweifelhaft (Gupta et al. 1997).

Wir konnten neben dem neuen Klon der β_2 Untereinheit der Ratte eine weitere, nicht vollständig gespleißte Sequenz aus dem 5' Bereich der β_2 Untereinheit isolieren. In der isolierten Sequenz konnte nur eine für die Aminosäuresequenz "YG" kodierende Sequenz genau hinter einem potentiellen Spleißsignal identifiziert werden. Daher muß das von uns identifizierte Startmotif "MYG" durch zwei Exons kodiert werden. Auf dem ersten Exon befindet sich das Startcodon für das Methionin, auf dem zweiten Exon die für die weiteren Aminosäuren kodierende Sequenz. Die von Koesling identifizierte Startsequenz wird von Nukleotiden des von uns teilweise isolierten, zwischen den Exons liegenden Introns kodiert und kann durch alternatives Spleißen entstehen. Erst vor kurzem wurde die genomische Sequenz der humanen β_2 Untereinheit, noch in ungeordneten Teilabschnitten, im Rahmen des humanen Genomprojektes veröffentlicht (Genbank: AL160157). Bei der humanen β_2 Untereinheit liegt wie bei der Ratte das Codon für das Methionin des "MYG"-Motives am Ende des ersten Exons, während die übrigen Aminosäuren von Sequenzen des zweiten Exons kodiert werden. Die genomische Sequenz der β_1 Untereinheit der Fruchtfliege (Drosophila, Genbank: AE00377) und des japanischen Knochenfisches Medaka (Oryzias latipes, Genbank: AB022281) konnte vor kurzem isoliert werden. Auch hier liegen die jeweiligen Startcodons auf den ersten Exons. Die weiteren Sequenzen sind jeweils durch Introns davon getrennt. Eine vorläufige Sequenz des humanen Genom Projektes beinhaltet die gesamte kodierende Sequenz der humanen β_1 Untereinheit und weist ebenfalls ein Intron zwischen Startmethionin und folgender Sequenz auf (Genbank: AC021433). Diese Befunde sprechen nicht nur für eine konservierte Intron/Exon-Struktur zwischen den B2 Untereinheiten von Mensch und Ratte, sondern darüber hinaus für eine konservierte Intron/Exon-Struktur zwischen den β_1 und β_2 Untereinheiten. Das konservierte Spleißverhalten zeigt deutlich, dass die von uns neu klonierte β_2 Untereinheit der Ratte den vollständigen N-terminalen Bereich aufweist. Zusätzlich unterstützt dies die Hypothese, dass die β_1 und die β_2 Untereinheit aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden sind.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit einen cDNA Klon der humanen β_2 Untereinheit voller Länge isolieren. Dieser weist eine Aminosäureähnlichkeit von 78 % zur β_2 Untereinheit der Ratte auf, unterscheidet sich von dieser aber sowohl im N-terminalen als auch im C-terminalen Bereich. Die humane β_2 Untereinheit ist durch eine Leserasterverschiebung N-terminal um 77 Aminosäuren verkürzt. Die Aminosäuresequenz, die den ersten 74 Aminosäuren der β_2 Untereinheit der Ratte entspricht, kann dabei aus einem anderen Leserahmen abgeleitet werden. Die N-terminale Leserasterverschiebung konnte bei ca. 180 menschlichen Individuen nachgewiesen werden. Dagegen zeigte eine Teilsequenz der β_2 Untereinheit von vier nichtmenschlichen Primaten einen durchgehenden Leserahmen an der fraglichen Stelle. Die Leserasterverschiebung scheint daher menschenspezifisch zu sein und allgemein in der menschlichen Population vorzuliegen. Durch die N-terminale Verkürzung der humanen β_2 Untereinheit gegenüber der β_2 Untereinheit der Ratte stellt sich die Frage nach einer konservierten prosthetischen Häm-Gruppe und eine dadurch bedingte NO-Sensitivität bei beiden Untereinheiten. Der im offenen Leserahmen der humanen β_2 Untereinheit nicht vorhandene Nterminale Abschnitt ist in der analogen β_1 Untereinheit essentiell für eine erhaltene NO-Sensitivität (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996). Dies spricht gegen die Möglichkeit einer Aktivierung der humanen β_2 Untereinheit durch NO, während ein konservierter N-terminaler Bereich der β_2 Untereinheit der Ratte für NO-Sensitivität spricht. Ein schematischer Vergleich der Häm-Bindungsdomänen der β_1 Untereinheit und der β_2 Untereinheiten von Mensch und Ratte zeigt Abbildung 17.



Abbildung 17: Vergleich der Häm-Bindungsdomäne der β_1 Untereinheit mit der publizierten Sequenz der β_2 Untereinheit der Ratte (Yuen et al. 1990) und den neu klonierten β_2 Untereinheiten von Mensch und Ratte. NO bindet an die prosthetische Häm-Gruppe der β_1 Untereinheit. Eine lösliche Guanylyl-Cyclase mit einer um 64 Aminosäuren verkürzten β_1 Untereinheit besitzt dagegen keine Häm-Gruppe und kann nicht durch NO aktiviert werden (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996). Die publizierte Sequenz der β_2 Untereinheit der Ratte ist im Vergleich zur β_1 Untereinheit um 62 Aminosäuren verkürzt. Wir konnten eine N-terminal um 64 Aminosäuren verlängerte β_2 Untereinheit der Ratte identifizieren und die Sequenz dadurch korrigieren. Die neu klonierte humane β_2 Untereinheit ist aufgrund einer Leserasterverschiebung im N-terminalen Bereich um 77 Aminosäuren verkürzt. Eine Sequenz mit starker Homologie zum N-terminalen Ende β_2 Untereinheit ist die Bindung einer prosthetischen Häm-Gruppe an die verlängerte β_2 Untereinheit der Ratte kann aus einem anderen Leserahmen abgeleitet werden. Durch den Vergleich mit der β_1 Untereinheit ist die Bindung einer Abbildung dargestellt. Dagegen weist die von Yuen et al. (1990) publizierte β_2 Untereinheit der Ratte und die neu klonierten β_2 Untereinheit des Menschen wahrscheinlich keine prosthetische Häm-Gruppe auf.

Für mehrere Aminosäuren konnte eine kritische Rolle bei der Bindung der Häm-Gruppe an die β_1 Untereinheit gezeigt werden. Durch Mutationsanalysen wurde das Histidin 105 der β_1 Untereinheit als axialer Ligand des zentralen Eisenatoms der Häm-Gruppe identifiziert (Wedel et al. 1994, Zhao et al. 1998). Wie in allen bekannten Hämoglobin- und Myoglobinketten findet sich auch in der β_1 Untereinheit ein Leucin vier Positionen vor diesem Histidin (Wedel et al. 1994). Beide Aminosäuren sind bei den β_2 Untereinheiten des Menschen und der Ratte konserviert. Friebe und Mitarbeiter konnten zeigen, dass zwei Cysteine (C78 und C214 der β_1 Untereinheit) eine kritische Rolle bei der Affinität der β_1 Untereinheit zur Häm-Gruppe spielen (Friebe et al. 1997). Untereinheiten, bei denen die Cysteine durch Serin ersetzt wurden, waren nicht sensitiv für NO. Diese Mutanten konnten allerdings mit Häm rekonstituiert werden, wodurch die NO-Sensitivität wiederhergestellt werden konnte. Beide Cysteine sind bei der β_2 Untereinheit der Ratte konserviert. Bei der β_2 Untereinheit des Menschen ist das Cystein 214 der β_1 Untereinheit konserviert, das Cystein 78 ist aufgrund der Nterminalen Verkürzung nicht vorhanden. Auffällig ist, dass beide Cysteine bei den α Untereinheiten des Menschen konserviert sind, eine Mutation dieser Aminosäuren aber keinen Einfluß auf die NO-Sensitivität hat (Friebe et al. 1997). Dagegen sind bei den α Untereinheiten weder das Histidin als axialer Ligand der Häm-Gruppe noch das Leucin in der minus vier Position konserviert. Die Abbildung 18 zeigt einen Sequenzvergleich der von uns neu klonierten humanen β_2 Untereinheit, der β_2 Untereinheit der Ratte und weiterer Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase. Die darin gezeigte Konservierung aller vier Aminosäuren bei der β_2 Untereinheit der Ratte erhärtet den Verdacht, dass bei dieser Untereinheit analog zur β_1 Untereinheit eine prosthetische Häm-Gruppe vorliegt.

1	MSG	21	NLDALHSYLS	189	EKTFCNAFPFH
70	EYFFKFCKMSG	98	NLDALHSYLA	266	EEVFCDAFPFH
72	KMFFVFCQESG	100	NLDALHDHLA	210	PYTFCKAFPFH
137	EELFKICYEED	164	SFSTLLKQSS	278	TSLFCKTFPFH
175	EEFFNICFHEN	202	GFDALLEHIR	320	INTFCRAFPFH
71	VYFVGFVSQYG	99	GLDNLHEYLK	205	ASVLFEIFPFC
71	TSFYKFLTKFE	109	GLDNLHEYLR	219	SDIFFDIFPFI
	1 70 72 137 175 71 71	1 MSG 70 EYFFKFCKMSG 72 KMFFVFCQESG 137 EELFKICYEED 175 EEFFNICFHEN 71 VYFVGFVSQYG 71 TSFYKFLTKFE	1 MSG 21 70 EYFFKFCKMSG 98 72 KMFFVFCQESG 100 137 EELFKICYEED 164 175 EEFFNICFHEN 202 71 VYFVGFVSQYG 99 71 TSFYKFLTKFE 109	1MSG21NLDALHSYLS70EYFFKFCKMSG98NLDALHSYLA72KMFFVFCQESG100NLDALHDHLA137EELFKICYEED164SFSTLLKQSS175EEFFNICFHEN202GFDALLEHIR71VYFVGFVSQYG99GLDNLHEYLK71TSFYKFLTKFE109GLDNLHEYLR	1MSG21NLDALHSYLS18970EYFFKFCKMSG98NLDALHSYLA26672KMFFVFCQESG100NLDALHDHLA210137EELFKICYEED164SFSTLLKQSS278175EEFFNICFHEN202GFDALLEHIR32071VYFVGFVSQYG99GLDNLHEYLK20571TSFYKFLTKFE109GLDNLHEYLR219

Abbildung 18: Sequenzvergleich verschiedener Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase. Gezeigt sind Abschnitte mit Aminosäuren, die bei der β_1 Untereinheit eine Rolle bei der Häm-Bindung spielen. Das Histidin 105 der β_1 Untereinheit bildet den axialen Liganden der prosthetischen Häm-Gruppe, ein Leucin in der minus vier Position ist auch bei Hämoglobin und Myoglobin konserviert, die ebenfalls in ihrer sauerstofffreien Form einen fünffach koordinierten Häm-Komplex mit Histidin als axialem Liganden bilden. Die Cysteine 78 und 214 sind notwendig für eine erhaltene Affinität zur Häm-Gruppe. Allerding kann eine β_1 Untereinheit, bei der die Cysteine durch Serin ersetzt wurden, mit Häm rekonstituiert werden. Die Aminosäuren sind in den verschiedenen Untereinheiten zum Teil konserviert (grau hinterlegt), zum Teil durch andere ersetzt. R-SA1: α_1 Untereinheit (UE) der Ratte (swissprot: P19686); H-SA2: α_2 UE des Menschen (swissprot: P33402); R-SB1: β_1 UE der Ratte (swissprot: P20595); R-SB2 und H-SB2: β_2 UE der löslichen GC von Ratte bzw. Mensch, (Genbank: AY004153 bzw. Genbank: AF038499); MDB3: β_3 UE des Tabakschwärmers Manduca sexta (Genbank: AF064514); CEB3: β_3 UE des Nematoden C. elegans (Genbank: AAA83158).

Das Fehlen eines für die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase durch NO essentiellen Proteinabschnittes wirft die Frage auf, ob es sich beim isolierte humanen Klon um das mRNA-Produkt eines Pseudogenes handelt. Pseudogene stellen Sequenzen innerhalb des Genoms dar, die Ähnlichkeiten zu vorhandenen Genen zeigen, im Gegensatz zu diesen aber nicht funktionell exprimiert werden (Mighell et al. 2000). Ein Pseudogen kann auf zwei Arten entstehen: Durch Wiedereingliederung von mRNA in das Genom oder durch Duplikation von genomischen Sequenzen. Ein durch Reintegration von mRNA entstandenes sogenanntes Retro-Pseudogen hat typischerweise keine Introns. Meist fehlt ein vorgeschalteter Promotorbereich. Nur in dem Fall, dass die mRNA-Sequenz hinter einem existierenden Promotorbereich reintegriert wird, kann es zu einer Transkription kommen (Mighell et al.2000). Wir konnten in der vorliegenden Arbeit einen genomischen PAC Klon der humanen β_2 Untereinheit mit typischer Intron/Exon-Struktur identifizieren. Dieser PAC Klon wies ebenfalls die menschenspezifische Leserasterverschiebung auf. Der isolierte Klon der β_2 Untereinheit ist daher kein Produkt eines Retro-Pseudogens. Die zweite Möglichkeit zur Entstehung eines Pseudogens ist die Duplikation von genomischer DNA (Mighell et al. 2000). Durch fehlenden Selektionsdruck für einen so entstandenen neuen DNA-Abschnitt kann es zu Mutationen kommen. Dadurch entsteht eine Sequenz, die stark homolog zu dem ursprünglichen Gen ist, aber kein funktionelles Protein mehr bilden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde durch einen genomischen Southern blot das Vorliegen der menschenspezifischen Leserasterverschiebung bei allen untersuchten Individuen nachgewiesen. Neben einem Signal für die Sequenz mit der fraglichen Leserasterverschiebung wurde bei keinem Individuum ein weiteres Signal detektiert. Bei einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit dem genomischen PAC Klon der β_2 Untereinheit wurde neben einem Signal auf Chromosom 13 kein weiteres Signal detektiert. Bei einer Datenbank-Suche nach genomischen Sequenzen der β_2 Untereinheit wurde bisher nur eine vollständige, dem Chromosom 13 zugeordnete Sequenz gefunden (Genbank: AL160157). Daher scheint im humanen Genom keine zweite, homologe Sequenz der B2 Untereinheit vorzuliegen. Diese Befunde schließen ein Pseudogen im Sinne der allgemein akzeptierten Definition aus (Mighell et al. 2000). Allerdings ist damit nicht entschieden, ob es sich bei der menschlichen B2 Untereinheit um ein funktionelles oder nicht funktionelles Genprodukt handelt.

Die β_2 Untereinheit der Ratte besitzt an ihrem C-terminalen Ende ein Isoprenylierungsmotiv (CVVL). Das Leucin an der letzten Position deutet auf die kovalente Bindung eines Geranylgeranylrestes an das Schwefelatoms 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 Carboxyl-Gruppe des Cysteins übertragen werden. Durch diese Isoprenylierung wird eine Lokalisation an der Membran ermöglicht. Die von uns isolierte humane β_2 Untereinheit besitzt dagegen kein Isoprenylierungsmotiv und ist im Vergleich zur Untereinheit der Ratte C-terminal um 49 Aminosäuren verkürzt. Eine für ein Isoprenylierungsmotiv (CVLL) kodierende Sequenz ist allerdings 3' des offenen

Leserahmens vorhanden. Eine Untersuchung der fraglichen genomischen Sequenz der humanen β_2 Untereinheit zeigte, dass theoretisch die Möglichkeit besteht, eine zur Rattensequenz homologe Spleißvariante mit erhaltenem Isoprenylierungsmotiv zu bilden. Allerdings konnte diese Spleißvariante bisher beim Menschen nicht nachgewiesen werden. Dagegen zeigte eine Untersuchung der fraglichen cDNA-Sequenz des Rhesusaffen, eines dem Menschen evolutionär eng verwandten Primaten, einen durchgehenden Leserahmen mit abschließendem Isoprenylierungsmotiv. Diese Befunde lassen die Frage offen, ob die identifizierte Sequenz der humanen β_2 Untereinheit die alleinige Spleißvariante darstellt oder ob eine weitere Spleißvariante mit Isoprenylierungsmotif gebildet wird. Hierbei wären auch intraindividuelle Unterschiede denkbar. Tatsächlich konnten Lin und Worman zeigen, dass intraindividuelle Spleißvarianten eines Genes vorkommen, die ähnliche Proteine mit und ohne Isoprenylierungsmotiv bilden (Lin und Worman 1993). Bei der β_2 Untereinheit der Ratte liegen bezüglich der intrazellulären Lokalisation widersprüchliche Angaben vor. Während Gupta und Danziger durch Immunhistochemie eine Lokalisation der β_2 Untereinheit an der basolateralen Membran von Nierentubuluszellen zeigen konnten, 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. 1994, Gupta und Danziger 1998). Eine Isoprenylierung kann starke Auswirkungen auf die Funktion von Proteinen haben. Ras-Proteine und die Untereinheiten der γ Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine werden durch eine Farnesylgruppe an der Zellmembran verankert. Eine Hemmung der Isoprenylierung führt hingegen zu ihrem Aktivitätsverlust. Bei anderen Proteinen ist die Funktion der Isoprenylierung allerdings noch unklar (Gelb et al. 1998).

4.2. Dimerisierungspartner der β_2 Untereinheit und Stellung innerhalb der Familie der Nukleotid-Cyclasen

Die von uns N-terminal verlängerte β_2 Untereinheit der Ratte und die neu identifizierte β_2 Untereinheit des Menschen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe auf Guanylyl-Cyclase Aktivität untersucht. Allerdings konnte bisher für keine dieser beiden Untereinheiten allein oder in Verbindung mit anderen Untereinheiten Aktivität gezeigt werden. Die β_2 Untereinheit könnte daher eine nicht funktionelle Untereinheit darstellen oder einen bisher nicht identifizierten Aktivator benötigen. Kürzlich wurden in verschiedenen Spezies β Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase identifiziert, die nicht durch NO aktivierbar sind. Nighorn und Mitarbeiter konnten beim Tabakschwärmer Manduca sexta neben einer α_1 und einer β_1 Untereinheit, die zusammen ein NO-sensitives Heterodimer bildeten, eine weitere, sogenannte β_3 Untereinheit klonieren (Nighorn et al. 1999). Diese β_3 Untereinheit von Manduca sexta war in Abwesenheit einer zweiten Untereinheit aktiv, aber relativ insensitiv gegenüber NO. Im Genom von C. elegans wurden sieben Gene für β Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase gefunden (Morton 1999). In Homogenaten von C. elegans konnte basale Guanylyl-Cyclase Aktivität gezeigt werden. Eine NO-stimulierte Aktivität war dagegen bisher nicht nachweisbar (Hudson und O'Shea 1998). Eine Betrachtung der N-terminalen Abschnitte der β_3 Untereinheit von Manduca sexta und der Untereinheiten von C. elegans zeigt, dass das für die Häm-Bindung essentielle Histidin und ein vier Aminosäuren davor gelegenes Leucin in allen Untereinheiten konserviert sind (Morton 1999, siehe Abbildung 18). Dagegen sind zwei für die Affinität der Untereinheiten zur Häm-Gruppe wichtigen Cysteine nicht konserviert (Friebe et al. 1997, Morton 1999). Ein konserviertes Histidin als axialer Ligand der prosthetischen Häm-Gruppe geht daher nicht notwendigerweise mit einer starken NO-Sensitivität einher. Analog zu diesen Befunden könnte sich die von uns neu identifizierte β_2 Untereinheit in Aufbau und Regulation von den anderen bekannten Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase unterscheiden.

Die Guanylyl-Cyclase bildet zusammen mit der Adenylyl-Cyclase die Familie der Nukleotid-Cyclasen (Liu et al. 1997, Hurley 1998). 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 (Klasse III Adenylyl-Cyclasen) wird von mindestens zwei katalytischen Domänen gebildet (Hurley 1998). Liu und Mitarbeiter schlussfolgern, dass diese Dimerisierung ein generelles Prinzip der Enzym-Familie darstellt (Liu et al. 1997). Sowohl in der Familie der Adenylyl-Cyclasen als auch in der Familie der Guanylyl-Cyclasen sind heterodimere und homodimere Enzyme bekannt (Hurley 1998). Humane Adenylyl-Cyclasen besitzen zwei ähnliche, aber nicht identische katalytische Domänen (C1 und C2) auf einer Polypeptidkette. Sie bilden daher ein sogenanntes "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). Einige der bakteriellen Klasse III Adenylyl-Cyclasen, die β_3 Untereinheit von Manduca sexta und die membranständigen Guanylyl-Cyclasen bilden dagegen Homodimere (oder Homooligomere) mit jeweils einer katalytischen Domäne pro Untereinheit (Chinkers und Wilson 1992, Pitt et al. 1992, Ochoa de Alda et al. 2000). Für die β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase stellt sich noch immer die Frage nach ihrem physiologischen Dimerisierungspartner. Wir haben versucht, über einen Sequenzvergleich des katalytischen Abschnittes der β_2 Untereinheiten von Mensch und Ratte mit den entsprechenden Abschnitten von anderen bekannten Nukleotid-Cyclasen Hinweise auf einen möglichen Dimerisierungspartner zu erhalten.

Der katalytische Bereich der humanen Adenylyl-Cyclase konnte vor kurzem 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 des Schleimpilzes Dictyostelium discoideum, der homodimeren retinalen Guanylyl-Cyclase und der löslichen Guanylyl-Cyclase bilden (Liu et al. 1997). Die von Liu und Mitarbeitern aufgestellten Strukturmodelle sind als Bänderstruktur in Abbildung 19 gezeigt (Liu et al. 1997).



Abbildung 19: Bänderstruktur der Modelle der humanen Adenylyl-Cyclase I (a), der löslichen Guanylyl-Cyclase bestehend aus α_1 und β_1 Untereinheit (b), der homodimeren Adenylyl-Cyclase von Dictyostelium discoideum (c) und der homodimeren retinalen Guanylyl-Cyclase (d). Gezeigt sind die Polypeptidketten mit gebundenem Substrat (ATP bzw. GTP), dem Aktivator der Adenylyl-Cyclasen Forskolin und Metallionen. Für Bindung und Katalyse essentielle Aminosäuren sind gezeigt. Aus: Liu et al. 1997.

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). Diese sind in Abbildung 20, einem Sequenzvergleich der katalytischen Bereiche verschiedener Nukleotid-Cyclasen, dargestellt.

		Me ²⁺ Ribose Guanin Me ²⁺	
		 ▼ ▼	
	291	RIFHKIYI QRHDNVSILFADIVGFTGLASQCTAQELVKLLNELFGKFDELATENHCRRIKILGDCYTCVSGL	
	85/	PROMULY IQSYSQVGVMFASIPNFNDFYIELDGNNMGVECLALLERIADFDELMDKDFYKDLEKIKTIGSTIMAAVGL	
CIAG	382	ENGEDVVAERSNNACVFFLDIAGFTRFSSIHSPEQUIQVLIKIFNSMDLLCAKHGIEKIKTIGDAIMATCGI	
H-SAL	415/	WOGOVVGAKKFSNVTMLFSDIVGFTAICSOCSPLOVITMLANLYTKFDOOCGELDViKVETIGDAICVAGGL	
H-SAZ	507	WGGQV GA - KKFDDV TMLF5DIVGFTAICAQCTPMVIJMLELYTKFDHQCGFLDIVKVETIGDAICVAAGL	
H-SBI	407	RHKRYVPAKRIDNVTILFSGIVGFNAFCSKHASGEGAMKIVNLLNDLYTRFDTLTDSRKNPFVIKVETVGDKIMTVSGL	
n-362 D_002	3//	REGRAVARG-EFRSCHLESDVVIFINICIACEP	
RTSB2	404	ALGRAVARG-EFETCTILFSDVVTFINICARCEFGUIVMLINSMISAFDRLISVNDVIAVETCDAIMVVGGV	
PCC1	866	RIGGENE DICEMED SYSTEM SUVYETETCSRITEREVISITENT STEDITTERNEVIRVETCDAVINVSGA	
		β-Phosphat Adenin Guanin α-Phospha	at
		* * *	
I C1	363	TQPKTDHAHCCVEMGLDMIDTITSV-AEATEVDLNMRVGLHTGRVLCGVL-GLRKWQYDVWSNDVTLANVME	
I C2	936	APTAGTKAKKCISSHLSTLADFAIEMFDVLDEINYQSYNDFVLRVGINVGPVVAGVI-GARRPQYDIWGNTVNVASRMD	
CYAG	454	FPKCDDIRHNTYKMLGFAM-DVLEFIPKEMSFHLGLQVRVGIHCGPVISGVISGYAKPHFDVWGDTVNVASRME	
H-SA1	539	H-KESDTHAVQIALMALKMMELSDEV-MSP-HGEPIKMRIGLHSGSVFAGVV-GVKMPRYCLFGNNVTLANKFE	
H-SA2	579	H-RKSLCHARPIALMALKMMELSEEV-LTP-DGRPIQMEIGIHSGSVLAGVV-GVRMPRYCLFGNNVTLASKFE	
H-SB1	486	PE-PCIHHARSICHLALDMMEIAGQVQVDGESVQITIGIHTGEVVTGVI-GQRMPRYCLFGNTVNLTSRTE	
H-SE2	449	P-VPIGNHQRVANFALGMRISAKEV-TNPVTGEPIQLRVGIHTGPVLADVV-GDKMPRYCLFGDTVNTASRME	
R-SB2	526	P-VPVESHQRVANFALGMRISAKEV-MNPVTGEPIQIRVGIHTGPVLAGVV-GDKMPRYCLFGDTVNTASRME	
MDB3	477	P-EKEDNHAEKVCDMALDMVDAITDL-KDPSTGSHLSIRVGVHSGAVAGIV-GLKMPRYCLFGDSVNTASRME	
RGCI	938	rykngykhrafianmsldilsavgtfkmkhmpfvpvkikiglhsgpcvagvv-gltmpryclfgDTvntAskme	
		↑ ↑	
		Ribose Me ²⁺	

Abbildung 20: Aminosäurevergleich der katalytischen Domäne verschiedener Nukleotid-Cyclasen, modifiziert nach Liu et al. (1997). Die farbig gekennzeichneten Aminosäuren sind essentiell für die Bindung des Substrates und katalytische Aktivität. Drei Aminosäuren (grün und lila eingefärbt) führen zu einer Spezifität einer Nukleotid-Cyclase zugunsten eines Adenosin- bzw. Guanosinnukleotids. Blau gefärbte Aminosäuren interagieren direkt und rot gefärbte Aminosäuren interagieren über zweiwertige Metallionen (Me2+) mit der Ribose und den Phosphatgruppen des Nukleotids. Bei den β_2 Untereinheiten von Mensch und Ratte sowie bei den bekannten homodimeren Nukleotid-Cyclasen sind alle für die Katalyse essentiellen Aminosäuren konserviert. Heterodimere katalytische Bereiche weisen die essentiellen Aminosäuren häufig nur auf einer katalytischen Domäne auf. Diese besitzen daher im Gegensatz zu homodimeren Enzymen nur eine Nukleotid-Bindungstasche. Verwendete Aminosäuresequenzen (AS) der Adenylyl-Cyclasen (AC) und Guanylyl-Cyclasen (GC): I C1: C1 Domäne, AC I des Rindes, AS 291 - 432 (swissprot: P19754); I C2: C2 Domäne, AC I des Rindes, AS 857-1013 (swissprot: P19754); CYAG: Dictyostelium discoideum AC, AS 382-526 (swissprot: Q03101); H-SA1, H-SA2 und H-SB1: α_1 , α_2 bzw. β_1 Untereinheit der löslichen GC des Menschen, AS 467-608 (swissprot: Q02108), 507-648 (swissprot: P33402) bzw. 407-554 (swissprot: Q02153); H-SB2 und R-SB2: β₂ Untereinheit der löslichen GC von Mensch bzw. Ratte, AS 377-519 (Genbank: AF038499) bzw. 454-596 (Genbank: AY004153); MDB3: β₃ Untereinheit der GC des Tabakschwärmers Manduca sexta, AS 403-552 (Genbank: AF064514); RGC1: retinale GC, AS 866-1010 (swissprot: Q02846).

Tesmer und Mitarbeiter konnten ein Lysin und ein Aspartat in der C2 Domäne identifizieren (K923 bzw. D1000 der Adenylyl-Cyclase I), die Wasserstoffbrücken zu den Stickstoffatomen N-1 und N-6 des Adenin-Ringes bilden (Tesmer et. al 1997). Diese sind bei den Guanylyl-Cyclasen durch ein Glutamat und ein Cystein ersetzt (E473 bzw. C541 der humanen β_1 Untereinheit), die mit dem N-2 bzw. dem O-6 des Guanin-Ringes interagieren könnten (Liu et al. 1997, Sunahara et al. 1998). Ein Arginin (R593 der humanen α_1 Untereinheit) könnte für die Erkennung des Guanin-Ringes wichtig sein (Zhang et al. 1997). Dieses ist bei den Adenylyl-Cyclasen durch ein Glutamin (Q416 der Adenylyl-Cyclase I) oder ein Histidin (H511 der Adenylyl-Cyclase von Dictyostelium discoideum) ersetzt. Durch

Austausch dieser drei kritischen Aminosäuren konnte 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 wurde (Sunahara et al. 1998, Tucker et al. 1998). Anhand dieser kritischen Aminosäuren 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 in dieser Arbeit neu klonierte β_2 Untereinheiten des Menschen und die β_2 Untereinheit der Ratte besitzen ebenfalls die für die Guanylyl-Cylasen spezifischen Aminosäuren, welche neben der starken Homologie zu der β_1 Untereinheit eine eindeutige Zuordnung der β_2 Untereinheit zu der Klasse der Guanylyl-Cyclasen erlauben.

Weitere Aminosäuren spielen eine kritische Rolle bei der Bindung des Substrates und der katalytischen Aktivität (Liu et al. 1997, Hurley 1998). Liu und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das Aspartat D310 und das Glutamat E432 der C1 Domäne (entsprechend D486 und E608 der α_1 Untereinheit) über ein Mg²⁺-Ion an das β - und γ -Phosphat binden (Liu et al. 1997). Tesmer und Mitarbeiter konnten diese Ergebnisse bestätigen und noch dahingehend erweitern, dass ebenfalls das Aspartat D354 (D530 der α_1 Untereinheit) an der Bindung des Mg²⁺-Ions beteiligt ist (Tesmer et al. 1999). Alle drei Aminosäuren binden zusätzlich noch ein weiteres zweiwertiges Metall-Ions, bei dem es sich wahrscheinlich auch um Mg^{2+} handelt (Tesmer et al. 1999). Diese drei Aminosäuren sind bei den α Untereinheiten, der β_2 Untereinheit der Ratte und der von uns neu identifizierten humanen β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase sowie allen homodimeren Nukleotid-Cyclasen konserviert. In der β_1 Untereinheit ist das Aspartat D310 dagegen durch ein Serin ersetzt. Zwei weitere Aminosäuren, ein Threonin und ein Arginin (T491 bzw. R574 der α_1 Untereinheit), sind an der Bindung der Ribose bzw. des β -Phosphates beteiligt (Liu et al. 1997). Auch diese Aminosäuren sind bei den α Untereinheiten und den β_2 Untereinheit von Mensch und Ratte und allen homodimeren Nukleotid-Cyclasen konserviert, während sie bei der β_1 Untereinheit durch ein Asparagin bzw. ein Threonin ersetzt sind. Ein Asparagin und ein Arginin (N548 bzw. R552 der β_1 Untereinheit) sind aufgrund ihrer günstigen Positionierung essentiell für die Katalyse (Liu et al. 1997). Sie könnten an der Bildung des Übergangszustandes beteiligt sein. Beide Aminosäuren sind konserviert in der β_1 und den von uns neu identifizierten β_2 Untereinheiten von Mensch und Ratte sowie den homodimeren Nukleotid-Cyclasen, in den α Untereinheiten dagegen ersetzt durch ein Threonin bzw. ein Lysin. Zusammengefasst besitzen die α Untereinheiten und die β_1 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase zusammengenommen alle für die Reaktion essentiellen Aminosäuren. Allerdings sind davon einige Aminosäuren nur bei jeweils einer Untereinheit vorhanden. Zabel und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sowohl die β_1 Untereinheit als auch die α_1 Untereinheit in der Lage sind, Homodimere zu bilden (Zabel et al. 1999). Diese Homodimere waren allerdings nicht katalytisch aktiv. Dies kann durch die Abwesenheit von kritischen Aminosäuren in den katalytischen

Domänen beider Untereinheiten erklärt werden und zeigt die Notwendigkeit zur Bildung eines Heterodimers aus beiden Untereinheiten (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991, Zabel et al. 1999). Dagegen weist die β_2 Untereinheiten von Mensch und Ratte alle Aminosäuren auf, die essentiell für eine Guanylyl-Cyclase Aktivität sind. Ebenso besitzen die homodimeren Nukleotid-Cyclasen alle für die Reaktion essentiellen Aminosäuren. Dies gibt Anlaß zu der Vermutung, dass die β_2 Untereinheit ebenfalls als Homodimer aktiv sein könnte. Da sie alle für katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren besitzt, ist die Anwesenheit einer zweiten, unterschiedlichen Untereinheit nicht erforderlich. Auch die β_3 Untereinheit von Manduca sexta besitz alle für enzymatische Aktivität essentiellen Aminosäuren. Sie zeigt Guanylyl-Cyclase Aktivität in Abwesenheit einer weiteren Untereinheit (Nighorn et al. 1999). Allerdings sind hierbei spezielle experimentelle Bedingungen wie Mn²⁺ als Kofaktor notwendig. Analog könnten auch für einen Nachweis von Enzymaktivität einer homodimeren β_2 Untereinheit von Mensch und Ratte spezielle Bedingungen erforderlich sein. Diese Möglichkeit wird zur Zeit innerhalb der Arbeitsgruppe intensiv untersucht. Eine Analyse der Sequenzähnlichkeit der katalytischen Domänen der neu klonierten humanen β_2 Untereinheit und der β_2 Untereinheit der Ratte mit der β_3 Untereinheit von Manduca sexta und katalytischen Domänen anderer Nukleotid-Cyclasen ist in Abbildung 21 dargestellt. Sie zeigt für die β_2 Untereinheiten von Mensch und Ratte am meisten Ähnlichkeit zur β_3 Untereinheit von Manduca sexta (55 % bzw. 56 %). Dies unterstreicht die Annahme, dass die β_2 Untereinheit ebenso wie die β_3 Untereinheit von Manduca sexta als Homodimer existieren könnte.

IC1	100															
IC2	26	100														
*CYAG	24	25 100 % Aminosäureähnlichkeit														
H-SA1	32	20	24	100												
H-SA2	34	23	28	75	100											
H-SB1	30	27	23	38	42	100										
H-SB2	29	24	29	44	47	41	100									
R-SB2	29	25	29	47	50	43	91	100								
*MDB3	34	21	28	40	44	38	55	56	100							
*RGC1	27	23	27	42	46	37	46	49	45	100						
	IC1	IC2	*CYAG	H-SA1	H-SA2	H-SB1	H-SB2	R-SB2	*MDB3	*RGC1						

Abbildung 21: Aminosäureähnlichkeiten der katalytischen Domänen von verschiedenen Adenylyl- und Guanylyl-Cyclasen. Domänen, die homodimere katalytische Bereiche bilden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die in Abbildung 20 abgebildeten Sequenzen wurden verwendet. Die Abkürzungen entsprechen den in Abbildung 20 verwendeten Abkürzungen. In einem Sequenzabschnitt der katalytischen Domäne einer homodimeren Nukleotid-Cyclase sind alle für Substratbindung und Katalyse essentiellen Aminosäuren konserviert. Daher bilden sie aufgrund ihrer antiparallelen Anordnung zwei katalytische Zentren (Hurley 1998). Bei heterodimeren Enzymen sind die kritischen Aminosäuren auf beide Sequenzabschnitte der katalytischen Domänen verteilt. Dadurch besitzen sowohl die bekannten löslichen Guanylyl-Cyclasen als auch die Adenylyl-Cyclase von Säugetieren nur ein katalytisches Zentrum und eine pseudosymmetrische zweite Bindungstasche (Liu et al. 1997, Hurley 1998). 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). Für mehrere Aminosäuren konnte eine günstige Positionierung für eine spezifische Bindungen des Forskolins gezeigt werden (Tesmer et al. 1997, Zhang et al. 1997). Dies sind insbesondere ein Aspartat der C1 Domäne und ein Lysin und ein Serin in der C2 Domäne (D418 und L897 bzw. S927 der Adenylyl-Cyclase I). Durch die Übernahme einer ehemals vorhandenen Nukleotid-Bindungstasche durch Forskolin entsteht somit ein neuer Regulationsmechanismus des heterodimeren Enzyms (Hurley 1998, Liu et al. 1997). Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase weist ebenfalls eine pseudosymmetrische Bindungstasche mit unbekannter Funktion auf (Hurley 1998, Friebe et al. 1999). YC-1 konnte als ein von der Häm-Gruppe unabhängiger Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase identifiziert werden (Wu et al. 1995). Durch spektrometrische Untersuchungen zeigten Denninger und Mitarbeiter, dass YC-1 an der Häm-Bindungsdomäne der β_1 Untereinheit bindet (Denninger et al. 2000). Dagegen vermuten Friebe und Mitarbeiter die Bindungsstelle von YC-1 analog zu Forskolin in der pseudosymmetrischen Bindungstasche des katalytischen Bereiches (Friebe et al. 1999). Sie konnten durch Mutation des Cysteins C596 der α_1 Untereinheit des Rindes zu einem Serin eine lösliche Guanylyl-Cyclase erhalten, deren Phänotyp ähnlich dem der natürlichen, mit YC-1 stimulierten löslichen Guanylyl-Cyclase war. Dieses 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 Guaninrestes essentiell ist, führte dagegen zu einem kompletten Verlust der Aktivität (Friebe et al. 1999). Falls YC-1 tatsächlich an die pseudosymmetrische Bindungstasche einer α_1/β_1 löslichen Guanylyl-Cyclase bindet, würde diese Substanz als Aktivator einer homodimeren β_2/β_2 Isoform nicht in Frage kommen. Auch die NO-Sensitivität könnte von dem heterodimeren Aufbau der Guanylyl-Cyclase abhängen. Aus Gewebe gereinigte α_1/β_1 lösliche Guanylyl-Cyclase kann durch NO bis zu 400fach aktiviert werden (Koesling und Friebe 1999, Denninger und Marletta 1999). Obwohl die prosthetische Häm-Gruppe an der β_1 Untereinheit gebunden ist, wurde die NO-Sensitivität des Heterodimers durch eine N-terminale Verkürzung der α_1 Untereinheit vermindert (Wedel et al. 1995, Foerster et al. 1996, Zhao und Marletta 1997). Dies weist auf eine Bedeuting der α_1 Untereinheit bei der Signaltransduktion innerhalb des Enzymes hin. Dagegen weist die isoliert exprimierte β_3 Untereinheit von Manduca sexta eine basale Aktivität auf, die nur wenig durch NO gesteigert wird (Nighorn et al. 1999).

4.3. Expressionsregulation der Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase

Bei einer Datenbanksuche mit Sequenzen der neu klonierten humanen β_2 Untereinheit wurden vier cDNA Klone identifiziert, die Sequenzen der β_2 Untereinheit enthalten. Von diesen cDNA Klonen wurden drei aus der Niere und einer aus einem Magenkarzinom mit Siegelringzellanteilen isoliert. Eine Expression in der Niere steht in Übereinstimmung mit der Klonierung der von uns identifizierten humanen β_2 Untereinheit aus humaner Niere und der erstmaligen Klonierung der β_2 Untereinheit der Ratte aus Nierengewebe (Yuen et al. 1990). Durch vergleichende Untersuchung von cDNA aus Tumorgewebe eines Siegelringzellkarzinoms des Magens und normalem Magengewebe konnten wir eine tumorspezifische Expression der β_2 Untereinheit nachweisen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Funktion der β_2 Untereinheit bei der Tumorentstehung, Zell- oder Gefäßproliferation sein. Kürzlich konnte eine Beteiligung von cGMP an der Regulation der Zellproliferation gezeigt werden. In mehreren Geweben führt cGMP, zum Teil unabhängig von NO, zu einer erhöhten Zellproliferation (Firestein und Bredt 1998, Hood und Granger 1998, Pham et al. 2000). Andererseits konnte in anderen Geweben auch eine Unterdrückung proliferativer Prozesse durch cGMP gezeigt werden (Fukumoto et al. 1999, Mericq et al. 2000). Inwieweit die β_2 Untereinheit als Tumormarker für das Siegelringzellkarzinom in Frage kommt, wird derzeit innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte das Gen der β_2 Untereinheit auf dem humanen Chromosom 13 in der Region q14.3 lokalisiert werden. Auf der identifizierten Region wurden bisher vor allem verschiedene mit Tumoren assoziierte Gene wie das Retinoblastom Gen 1, das Gen des translations-kontrollierten Tumor-Proteins und die Leukämieassoziierten Gene 1 und 2 lokalisiert (http://gdbwww.gdb.org/gdb-bin/fg/genes).

Bloch und Mitarbeiter konnten auf mRNA-Ebene eine altersabhängige Expression der α_1 und β_1 Untereinheiten im Lungengewebe von Ratten zeigen (Bloch et al. 1997). Diese Befunde veranlassten uns zu prüfen, ob die β_2 Untereinheit in der Lunge der Ratte altersabhängig exprimiert wird. Da sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte die β_2 Untereinheit aus Nierengewebe kloniert werden konnte, wurden auch Nierengewebe von Ratten auf eine altersabhängige Expression hin untersucht. Im Vergleich von neonatalen und adulten Ratten konnte dabei in der Lunge eine deutlich stärkere Expression bei neonatalen Ratten, in der Niere dagegen eine deutlich stärkere Expression bei adulten Ratten gezeigt werden. Diese reziproke, altersabhängige Regulation der β_2 Untereinheit in beiden Organen deutet darauf hin, dass die β_2 Untereinheit nicht konstitutiv, sondern nur in besonderen physiologischen Situationen exprimiert wird.

Die Guanylyl-Cyclase mit der weitesten Gewebsverteilung wird aus der α_1 und der β_1 Untereinheit gebildet (Budworth et al. 1999). Während das Gen der β_1 Untereinheit auf dem humanen Chromosom 4 lokalisiert wurde, war die Lokalisation des Genes der α_1 Untereinheit unklar. Giuili und Mitarbeiter

fanden durch in situ Hybridisierung mit cDNA-Proben eine Kolokalisation der α_1 und β_1 Untereinheit auf dem humanen Chromosom 4 (Giuili et al. 1993). Dagegen lokalisierte ein internationales Konsortium das Gen der α_1 Untereinheit durch PCR-Analyse eines Hybrid-Panels auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 8 (Schuler et al. 1996). Wir konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Fluoreszens in situ Hybridisierung mit humanen PAC Klonen die Lokalisation beider Untereinheiten auf dem humanen Chromosom 4 bestätigen. Die α_1 Untereinheit liegt zum Zentromer hin in der Region 4q31.1-31.2 und die β_1 Untereinheit zum Telomer hin in der Region 4q31.3-q32. Eine Lokalisation der α_1 Untereinheit auf Chromosom 8 wurde dagegen widerlegt. Eine Kolokalisation der α_1 und der β_1 Untereinheit konnte kürzlich auch bei der Ratte auf dem Chromosom 2 (Azam et al. 1998) und bei der Maus auf dem Chromosom 3 gezeigt werden (Sharina et al. 2000). Auch im Genom der Fruchtfliege Drosophila (Shah und Hide 1995) und des japanischen Knochenfisches Medaka (Oryzias latipes, Mikami et al. 1999) liegen beide Untereinheiten kolokalisiert vor. Die Konservierung der Kolokalisation beider Gene lässt auf einen evolutionären Vorteil dieser Genanordnung schließen. Da nur beide Untereinheiten zusammen ein funktionelles Enzym bilden, könnte durch ihre chromosomale Kolokalisation eine koordinierte Expression beider Untereinheiten ermöglicht werden (Giuili et al. 1993). Mikami und Mitarbeiter konnten in der Tat in vitro zeigen, dass beim Medaka Fisch die Expression der β_1 Untereinheit teilweise unter der Kontrolle des α_1 Promotors steht (Mikami et al. 1999). Hierbei sind die Gene beider Untereinheiten nur 986 bp voneinander entfernt. Dagegen sind bei der Maus beide Gene durch einen größeren Abschnitt, entsprechend 2 % der Gesamtlänge des Chromosoms 3, voneinander entfernt (Sharina et al. 2000). Auch beim Menschen weisen getrennt sichtbare Signale in der in dieser Arbeit dargestellten Zweifarbfluoreszenz in situ Hybridisierung auf einen Abstand von mindestens 50 kb hin (Ferguson-Smith 1995). Dies schließt in beiden Fällen eine direkt koordinierte Genexpression wie beim Medaka Fisch aus. Eine trans-koordinierte Expressionsregulation über denselben Transkriptionsfaktor ist aber denkbar (Sharina et al. 2000). Wir konnten putative Promotorregionen der Gene der humanen Untereinheiten isolieren. Erste Untersuchungen zeigten geringe Promotoraktivität beider isolierter Regionen. Weitere, eingehende Untersuchung der Promotorabschnitte beider Untereinheiten sind nötig, um den genauen Mechanismus der Expressionsregulation zu identifizieren.

Bloch und Mitarbeiter konnten in der Rattenlunge eine koordinierte Regulation der α_1 und β_1 Untereinheit auf mRNA-Ebene zeigen (Bloch et al. 1997). Beide Untereinheiten werden in der Perinatalzeit stärker exprimiert als bei adulten Ratten. Eine stärkere Expression konnte für die α_1 Untereinheit auch auf Proteinebene gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression der β_1 Untereinheit in der Lunge von neonatalen Ratten im Vergleich zu adulten Ratten gezeigt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die α_1 und β_1 Untereinheiten in der Lunge auch auf Proteinebene einer altersabhängigen, koordinierten Expression unterliegen. Eine erhöhte Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase könnte notwendig sein für eine Umstellung des fetalen auf den neonatalen Blutkreislauf nach der Geburt. Die lösliche Guanylyl-Cyclase konnte im fetalen Lamm besonders in den Lungenvenen und den für die Blutdruckregulation wichtigen kleinen Widerstandsgefäßen lokalisiert werden (D'Angelis et al. 1998). Neben der löslichen Guanylyl-Cyclase weisen auch andere Enzyme des NO-cGMP Signalweges, eNOS und cGMP-spezifische PDE, eine perinatale Expressionsregulation auf (Kawai et al. 1995, Hanson et al. 1998). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Hemmung des NO-cGMP Signalweges vor der Geburt zu einem pulmonalem Hypertonus führt (Abman et al. 1990, Cornfield et al. 1992). Der NO-cGMP Signalweg spielt nach diesen Ergebnissen eine wichtige Rolle für die Regulation des Gefäßtonus in der Lunge des Neugeborenen (Abman et al. 1994).

Bei etwa einem von tausend Neugeborenen kommt es zu einer nicht ausreichenden Vasodilatation der Lungengefäße nach der Geburt (Walsh-Sukys 1993). Dies führt zum Krankheitsbild des persitierenden pulmonalen Hypertonus mit pathologischem Rechts-Links-Shunt in den Herzvorhöfen und dem noch nicht geschlossenen Ductus arteriosus. Es existieren verschiedene Pathomechanismen, von denen bisher nur ein Teil geklärt werden konnte. Eine pathologische Regulation des NO-cGMP Signalweges könnte zu der Entwicklung eines persistierenden pulmonalen Hypertonus beitragen (Abman et al. 1990). Als neue, lokale Behandlungsmethode dieses Krankheitsbildes wurde vor kurzem die Inhalation von niedrig dosiertem NO eingeführt (Kinsella et al. 1992, Roberts et al. 1992). Diese Behandlung vermindert die Notwendigkeit zu invasiveren Methoden wie einer extrakorporalen Membranoxygenierung (Roberts et al. 1997). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte erhöhte Expression der α_1 und der β_1 Untereinheit in der neonatalen Lunge macht die Effektivität von inhalativem NO bei Neugeborenen besonders plausibel.

5. Zusammenfassung

Die lösliche Guanylyl-Cyclase stellt im Organismus den wichtigsten Rezeptor für NO und NOfreisetzende Pharmaka dar. Sie setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Die bisher isolierten Isoenzyme werden aus einer α und einer β Untereinheit gebildet. Von den vier bei Säugetieren bekannten Untereinheiten konnten bisher drei beim Menschen kloniert werden. Die β_2 Untereinheit wurde bisher nur bei der Ratte gefunden. Daher war unklar, ob diese Untereinheit auch beim Menschen vorkommt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die β_2 Untereinheit beim Menschen zu klonieren und das Gen der Untereinheit zu lokalisieren. Zusätzlich sollte versucht werden, durch Untersuchung der Expression der Untereinheit Hinweise auf ihre physiologische Funktion zu gewinnen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein cDNA Klon der menschlichen β_2 Untereinheit isoliert werden. Das Gen der menschlichen β_2 Untereinheit wurde auf Chromosom 13 lokalisiert. Innerhalb der Nukleotidsequenz der menschlichen β_2 Untereinheit konnte eine Leserasterverschiebung identifiziert werden. Diese wurde in vergleichenden Untersuchungen von nichtmenschlichen Primaten als menschenspezifisch nachgewiesen. Die Leserasterverschiebung führt zu einer im Vergleich zur β_2 Untereinheit der Ratte N-terminal verkürzten Untereinheit. Da der Nterminale Bereich in der homologen β_1 Untereinheit notwendig ist für eine Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase durch NO, ist die humane β_2 Untereinheit höchstwahrscheinlich nicht NO-sensitiv. Eine Datenbankrecherche mit Hilfe der neu klonierten humanen Sequenz ergab Übereinstimmung mit einem Sequenzabschnitt aus einem Siegelringzellkarzinom des Magens. Wir konnten die Expression in tumorösem Magengewebe bestätigen und zeigen, dass die β_2 Untereinheit in normalem Magengewebe nicht exprimiert wird. Für die β_2 Untereinheit der Ratte konnte eine altersabhängige Expression in der Niere und der Lunge gezeigt werden. Nach Analyse von Sequenzvergleichen der β_2 Untereinheit mit anderen Nukleotid-Cyclasen ist es wahrscheinlich, dass die β_2 Untereinheit im Unterschied zu den anderen Untereinheiten eine homodimere Guanylyl-Cyclase bildet. Die β_2 Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase konnte damit auf genomischer und mRNA-Ebene beim Menschen nachgewiesen werden, wobei deutliche Unterschiede zu anderen bekannten Untereinheiten hinsichtlich Gewebeverteilung, Aufbau und Aktivierbarkeit des Enzyms bestehen.

6. ANHANG

6.1. Vergleich der Primärstruktur der neu identifizierten β_2 Untereinheiten mit der β_1 Untereinheit der Ratte

Primärstrukturvergleich der β_1 und β_2 Untereinheiten der Ratte (β_1 Ratte/ β_2 Ratte), der humanen β_2 Untereinheit und den durch RT-PCR erhaltenen Teilsequenzen der β_2 Untereinheit des Rhesusaffen. Der Abschnitt der humanen β_2 Untereinheit vor dem offenen Leserahmen ist mit β_2 human* bezeichnet, der Abschnitt des offenen Leserahmens und darüber hinaus abgeleitete Aminosäuresequenzen mit β_2 human. Im N-terminalen Teil des Rhesusaffen kommt es mehrfach zu Leserahmenverschiebungen. Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Leserahmen sind mit β_2 Rhes, β_2 Rhes* und β_2 Rhes** bezeichnet. Im C-terminalen Abschnitt wurde die lange Spleißvariante des Rhesusaffen mit β_2 Rhes L und die kurze mit β_2 Rhes S bezeichnet. Homologe Bereiche in den Untereinheiten von Mensch und Ratte sind grau hinterlegt.

βı	Ratte	1	${\tt MYGFV} MALELLVIRNYGPEVWEDIKKE A QLDE E GQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGEILQMFG$
β_2	Ratte	1	MYGFINTCLQSLVTEKFGEETWEKLKASAEVQDAFMTYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMEAILKLFG
β_2	human*	1	${\tt MYGFINTCLQSLVIEKFGEETWEKLKT} {\tt SAEVQDAFMTYTMYDDVITIKLIQEACNILGVSMEAILKLFG}$
β ₂	Rhes	1	AILKLFG
B₁	Ratte	72	KMFFVFCOESGYDTILRVLGSNVREFLONLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKGKGLILHYYSEREGL
B ₂	Ratte	70	EYFFKFCKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYOEMNAPSFRVEEGADG-AMLLHYYSDRHGL
β ₂	human*	70	EYFOF*
B2	human	1	MSGYDRMI, RTT, GGNI, MEETENI, DALHSYI, AL, SYOEMNAPSERVERGADG - KMELHYYSDRSGL
P∠ B₂	Rhes	9	EVEFOFYKMSGYDRMI.RTI.GGNI.MEFTENI.DALHSYI.AI.SYOEMHAPSFRVERGADG-NMFI.HYYSDRSGI.
P∠	ittieb	2	
ß₁	Ratte	143	
P⊥ ß_	Ratto	140	
թ ₂ Ռ	human	62 62	
թ ₂ Ռ	Dhog	70	
pշ Ռ	Rhes	19	
p_2	Riles*	T	I LEAVARDFFDIEVIMDI LDMMEEVERIGKKEN
β_1	Ratte	169	QR-NEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFEENGTQESRISPPYT
β_2	Ratte	179	vvflvvqkahrqirgakasrpqgsedsqadqealqgtllrmkerylnipvcpgekshstavrasvlfgkgp
β_2	human	102	$\tt VVFLIVQKAHRKMRKTKPKRLQDSQGMERDQEALQAAFLKMKEKYLNVSACPVKKSHWDVVRSIVMFGKGH$
β ₂	Rhes*	34	VVFLKAYRKKRKAKSKRLQDSQGIERDQEALQAAFLRMKEKYLNVSACPVKKHHWDVVRSIVMFGKAT
βı	Ratte	214	FCKAFPFHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDIS
β2	Ratte	250	LRDTFQPVYPERLWVEEEVFCDAFPFHIVFDEALRVKQAGVNIQKYVPGILTQKFALDEYFSIIHPQVTFN
β_2	human	173	LMNTFEPIYPERLWIEEKTFCNAFPFHIVFDESLQVKQARVNIQKYVPGLQTQNIQLDEYFSIIHPQVTFN
β2	Rhes	229	YVPGLOTOKIOLDEYFSIIHPOVTFN
β_2	Rhes**	1	LQVKQAGVIIQK
β_1	Ratte	266	FHGILSHINTVFVLRSKEGLLDVEKLECEDLTGTEISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTRR
β2	Ratte	321	ISSICKFINSQFVLKTRKEMMPKARKSQPMLKLRGQMIWMESLRCMIFMCSPNVRSLQELEES
β2	human	244	IFSIRRFINSOFVLKTRREMMPVAWOSRTTLKLOGOMIWMESMWCMVYLCSPKLRSLOELEEL
β_2	Rhes	255	IFSIRR
-			
ß,	Ratte	337	GLYLSDTPLHDATRDLVLLGEOFREEYKLTOELETLTDRLOLTLRALEDEKKKTDTLLYSVLPPSVANELR
rr⊥ B_	Ratte	384	KMHI,SDIAPHDTTRDI,II,INOORI,AEMEI,SCOLEKKKEEI,RVI,SNHI,AIEKKKTETI,IVAMI,PEHVANOLK
P∠ B₂	human	307	NMHLSDIAPNDTTRDLILLNOORLAEIELSNOLERKKEELOVLSKHLAIEKKKTETI. VAMI.PKHVANOLR
1-4			

 β_1 Ratte 408 HKRPVPAKRYDNVTILFSGIVGFNAFCSKHASGEGAMKIVNLLNDLYTRFDTLTDSRKNPFVYKVETVGDK β_2 Ratte 455 EGRKVAAGEFETCTILFSDVVTFTNICAAC----EPIQIVNMLNSMYSKFDRLTS---VHDVYKVETIGDA β_2 human 378 EGKKVAAGEFKSCTILFSDVVTFTNICTAC---EPIQIVNVLNSMYSKFDRLTS---VHAVYKVETIGDA β_1 Ratte 479 YMTVSGLPEPCIHHARSICHLALDMMEIAGQV--QVDGESVQITIGIHTGEVVTGVIGQRMPRYCLFGNTV eta_2 Ratte 519 YMVVGGVPVPVESHAQRVANFALGMRISAKEVMNPVTGEPIQIRVGIHTGPVLAGVVGDKMPRYCLFGDTV β_2 human 442 YMVVGGVPVPIGNHAQRVANFALGMRISAKEVTNPVTGEPIQLRVGIHTGPVLADVVGDKMPRYCLFGDTV β_1 Ratte 548 NLTSRTETTGEKGKINVSEYTYRCLMSPENSDPQFHLEHRGPVSMKGKKEPMQVWFLSRKNTGTEETKQDD β_2 Ratte 590 NTASRMESHGLPSKVHLSPTAHRAL----KNKGFEIVRRGEIEVKGKGK-MTTYFLIQNLNATEDEIMGR β_2 human 513 NTASRMESHGLPNKVHLSPTAYRAL----KNQGFKIIERGEIEVKGKGR-MTTYFLIQNLNATEDEIMGR β_2 Rhes 1 1 LIQNLNATEDEIMGR β_2 Rhes s 1 LIQNLNATEDEIMGR β_1 Ratte 619 D* β_2 Ratte 655 PSAPADGK------ β_2 human 578 SKTPVDHKGSTQKASLPTTKLQGSVQPSCPEHSSLASWLL.RSLSWADRSS.RVLHTLVFKVLLWAFPMQL β_2 Rhes 1 16 SKTPLDHK------ β_2 Rhes s 16 SKTPLDHK------ β_2 Ratte 663 ----- β_2 human 649 SGSWGMICNEYMKHVKCPSASLPRHPTAGTSIQSFT.WAPVGNLPGAADVQRHPKKVSHFGSHEAHSCNRP eta_2 Rhes 1 24 ----- β_2 Rhes s 24 ----- β_2 Ratte 663 -----EVCTPGNQVRKSPAVPRNTDHQQQVYKGDP-AD----- β_2 human 720 HFSFLSRFFAEASAQGNEDRRTAAVMSYADSQQLIPDRNAADAD------ β_2 Rhes 1 24 -----EASAQGNQDRRT--VMSYADSQQLIPDRDTADADVGSRHRIQQWRTHATCSWALPLHCGSG β₂ Rhes s 24 -----EASAQGNQDRRT--VMSYADSQQLIPDRDTADAD----- β_2 Ratte 695 -----ASNEVTLAGSPVAGRNS-TDAVNNQPSPDETKTSVVASGPVLSAFCVVL*

. β_2 human 764 -----APDEIIPVGSAGPDGDSMETADRRQPS-APTKTHHLANDTLPSGFCVLL* β_2 Rhes 1 83 PGSHGFSGPAPDETIPVGSAGADGDSMEAADLRQPS-VPTKTHHLAHDTLPSGFCVLL*

 β_2 Rhes s 56 -----APDETIPVGSAGADGDSMEAADLRQPS-VPTKTHHLANDTLPSGFCVLL*

6.2. Vergleich der isolierten Sequenzen aus dem 5' Bereich der β_2 Untereinheiten von Mensch und Rhesusaffe

Homologe Sequenzbereiche der humanen B2 Untereinheit und der des Rhesusaffen sind grau hinterlegt.

 β_2 human 238 AAGCCATCCTGAAACTCTTTGGAGAATACTTT--CAATTCTGA-AGATGTCTGGCTATGACAGGATGCT β_2 Rhesus 1 AAGCCATCCTGAAACTCTTTGGAGAATACTTCTTTCAATTCTATAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGCT β_2 human 304 ACGGACACTGGGAGGAAATCTCATGGAGTTTATTGAAAACCTGGATGCCCTCCACAGTTACCTGGCACTC β_2 Rhesus 71 ACGGACACTGGGAGGAAATCTCATGGAGTTTATTGAAAACCTGGATGCCCTCCACAGTTACCTGGCACTC β_2 human 374 TCTTATCAGGAGATGAATGCACCATCGTTTCGTGTGGAGAGAGGAGCAGATGGGAAAATGTTTCTCCATT β_2 Rhesus 141 TCTTATCAGGAGATGCATGCACCATCGTTTCGTGTGGAGAGAGGAGCAGATGGGAACATGTTTCTCCATT β_2 human 444 ACTACTCGGATAGAAGTGGTCTGTGCCACATTGTACCAGG----- β_2 Rhesus 211 ACTACTCAGATAGAAGTGGTCTGTGCCATATTGTACCAGGCATGGAAATGGCTTAGCTGACTGCAGAGCT β_2 human 484 -----TAT β_2 Rhesus 281 ATGGAGCTTCTGAAGTGAGGAGAGTTTCCCCACAGATTCTCCAGGATGGCTAATAGCCGGCTACGGGTAT β_2 Rhesus 351 CATTGAGGCTGTGGCCAAAGACTTCTTTGACATTGAGGTAACCATGGACATTCTTGACATGAAAGAA β_2 human 697 CCTCAAGATGAAGGAGAAATATTTGAATGTCTCTGCTTGTCCTGTGAAAAAATCCCACTGGGATGTTGTG β_2 Rhesus 552 CCTCAGGATGAAGGAGAAATATTTGAATGTTTCTGCTTGTCCTGTGAAAAAACACCACTGGGATGTTGTG β_2 human 767 AGAAGCATAGTCATGTTTGGAAAAGGGCATCTCATGAACACCTTTGAGCCAATTTATCCTGAGAGACTCT eta_2 Rhesus 622 AGAAGCATAGTCATGTTTGGAAAAG------β2 Rhesus 648 -----CTACAGGTAAA β₂ human 907 GCAAGCCAGAGTGAACATTCAGAAGT-ACGTACCAGGACTCCAAACCCAGAATATTCAACTGGATGAGTA β_2 Rhesus 659 GCAAGCTGGAGTGATCATTCAGAAGTTACGTGCCAGGACTCCAAACCCAGAAGATTCAACTGGATGAGTA β₂ human 976 TTTCTCCATCATTCATCCTCAAGTTACCTTCAACATTTTCAGCATCCGCAGA β₂ Rhesus 729 TTTCTCCATCATTCATCCTCAAGTTACCTTCAACATTTTCAGCATCCGCAGA

6.3. Genomische Sequenz des 3' Bereiches der humanen β₂ Untereinheit

Die Sequenz wurde durch PCR aus humaner genomischer DNA amplifiziert. Mehrere theoretische Spleißvarianten lassen sich aus der Sequenz ableiten. Grau hinterlegte Sequenzen zeigen die nach Spleißen entstehende Sequenz der isolierten humanen β_2 Untereinheit. Die fett gedruckten Sequenzen zeigen eine theoretische Spleißvariante. Diese konnte nur beim Rhesusaffen amplifiziert werden und ist zur β_2 Untereinheit der Ratte homolog.

. . .

6.4. Sequenzvergleich des 3' Bereiches der β2 Untereinheiten von Mensch und Rhesusaffe

Dargestellt sind zwei Spleißvarianten Rhes L und Rhes S aus dem 3' Bereich der β_2 Untereinheit des Rhesusaffen und die entsprechende Sequenz aus der β_2 Untereinheit des Menschen. Rhes L hat im Vergleich zu Rhes S einen Einschub von 108 bp. Zur humanen β_2 Untereinheit homologe Nukleotide sind grau hinterlegt.

β_2	human 1967	TTGATCCAGAACTTGAATGCCACAGAGGATGAGATCATGGGGAGATCTAAAACCCCCA <mark>G</mark> TTGATCACAAGG
β_2	Rhes L 1	TTGATCCAGAACTTGAATGCCACAGAGGACGAGATCATGGGGAGATCTAAAACCCCCACTTGATCACAAGG
β₂	Rhes S 1	TTGATCCAGAACTTGAATGCCACAGAGGACGAGATCATGGGGAGATCTAAAACCCCCACTTGATCACAAGG
D	h	
p ₂	numan 2037	GGTCAACACAGAAAGCATCCTTGCCCACCAAGCTCCAGGCTCAGGTTCAACCATCTTGCCCTGAACA
β_2	Rhes L 71	
β_2	Rhes S 71	
β ₂	human 2107	CTCTTCTCTTGCATCCTGGTTATTATGACGTTCTTTGAGCTGGGCCGATAGATCCAGCTGAAGAGTTCTA
β2	Rhes L 71	
β2	Rhes S 71	
•		
0	1	
β ₂	human 2177	CATACATTAGTCTTCAAGGTTCTTCTCTGGGCGTTTCCCATGCAGCTCTCTGGTAGCTGGGGGAATGATTT
β_2	Rhes L 71	
β_2	Rhes S 71	
ß2	human 2247	GTAATGAGTACATGAAACACGTTAAATGTCCTTCAGCCTCCCTACCACGACATCCAACAGCTGGAACTTC
B2	Rheg L 71	
P² B₂	Rhes S 71	
۳2	10102 0 /1	
β₂	human 2317	${\tt CATCCAGTCCTTCACATGATGGGGCACCTGTGGGAAACCTGCCAGGGGGCAGCCGATGTTCAGAGGCATCCA}$
β₂	Rhes L 71	
β_2	Rhes S 71	

 β_2 Rhes L 71 ----β₂ Rhes S 71 ------ β_2 human 2457 GGTTTTTTGCAGAAGCAAGTGCTCAGGGAAATGAAGACAGGAGAACTGCTGCCGTCATGAGCTATGCCGA β_2 Rhes L 71 -----AAGCAAGTGCTCAGGGAAATCAAGACAGGAGAACCG----TCATGAGCTATGCCGA β_2 Rhes S 71 ------AAGCAAGTGCTCAGGGAAATCAAGACAGGAGAACCG-----TCATGAGCTATGCCGA β_2 human 2527 CAGTCAGCAGCTGATCCCCCGACAGAAACGCAGCAGATGCAGAC----- eta_2 Rhes L 123 CAGTCAGCAGCTGATCCCCGACAGAGACACAGCAGACGCAGACGTTGGCAGCAGACATAGAATACAGCAA β_2 Rhes S 123 CAGTCAGCAGCTGATCCCCCGACAGAGACACAGCAGACGCAGAC----- eta_2 human 2570 ---- eta_2 Rhes L 193 TGGAGGACTCATGCCACCTGCTCATGGGCCCTGCCTCTTCACTGTGGTTCAGGTCCTGGTTCTCATGGGT β_2 Rhes S 166 ----- β_2 human 2570 -----GCTCCTGATGAAATCATCCTGTGGGGAGTGCAGGGCCAGATGGGGACTCCATGGAGAC β_2 Rhes L 263 TTTCAGGTCCAGCTCCTGACGAAACCATCCCTGTGGGGGAGTGCAGGGGCAGATGGGGACTCCATGGAGGC β_2 Rhes S 166 -----GCTCCTGACGAAACCATCCCTGTGGGGGAGTGCAGGGGCAGATGGGGACTCCATGGAGGC β_2 human 2629 AGCCGACCGGCGACAGCCTTCAGCTCCGACAAAGACACATCACCTTGCAAATGACACTTTGCCGTCTGGT β_2 Rhes L 333 AGCCGACCTGCGACAGCCTTCAGTTCCGACAAGACACATCACCTTGCACATGACACTCTGCCGTCTGGT β_2 Rhes S 225 AGCCGACCTGCGACAGCCTTCAGTTCCGACAAGACACATCACCTTGCACATGACACTCTGCCGTCTGGT β_2 human 2699 TTCTGTGTTTTGTTGTAACAGGTTAAATGAACCCCTGGGCTTAATTTTCCC β_2 Rhes L 403 TTCTGTGTTTTGTTGTAACAGGTTAAATGAACCCCTGGGCTTAATTTTCCC

β_2 Rhes S 295 TTCTGTGTTTTGTTGTAACAGGTTAAATGAACCCCTGGGCTTAATTTTCCC

6.5. Neu identifizierte Startsequenz der β₂ Untereinheit der Ratte

Mittels 5' RACE PCR konnte aus Ratten-cDNA eine neue Sequenz aus dem 5' Bereich isoliert werden. Gezeigt sind die cDNA-Sequenz mit daraus abgeleiteter Aminosäuresequenz. Der offene Leserahmen und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind grau hinterlegt.

1	CTCGGTTGCTACAAGTCCACATCCAGAGACTTGGCAAGAAACTTGCTGTGCGGCTCCAGCCTGGAGACACATCGCTGGACACC																											
		R	L	L	Q.	V	Η	Ι	Q	R	L	G	K	K	L	A	V	R	L	Q	Ρ	G	D	Т	S :	L :	D'	Т
85	ATGTATGGATTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACATGGGAGAAGCTGAAGGCTTC															TTCT												
	Μ	Y	G	F	Ι	Ν	Т	С	L	Q	S	L	V	Т	Ε	K	F	G	Ε	Ε	Т	W	Ε	Κ	L	Κ	А	S
169	GC	AGA	AGT	GCA	AGA'	TGC	CTT	CAT	GAC	CTA	CAC	CCGT	GTA	TGA	TGA	CAJ.	CAT	CAC	CAT	TAA	GCT	CAT	CCA	AGA	AGC	CTG	CAA	GGTT
	А	Ε	V	Q	D	А	F	М	Т	Y	Т	V	Y	D	D	Ι	Ι	Т	Ι	Κ	L	Ι	Q	Ε	А	С	Κ	V
253	СТ	GGA	TGT	GTC	CAT	GGA	AGC	CAT	TCT	GAA	GCI	CTT	TGG	CGA	ATA	CTT	CTT	1										
	L	D	V	S	М	Ε	А	Ι	L	Κ	L	F	G	Ε	Y	F												

6.6. Nicht vollständig gespleißte Sequenz aus dem 5' Bereich der β_2 Untereinheit der Ratte

In der 5' RACE PCR der Ratten-cDNA wurde eine nicht vollständig gespleißte Sequenz amplifiziert. Diese beinhaltet zwei Exons, die zusammen den von Koesling isolierten Klon bilden (Koesling 1995). Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenzen der zwei Exons, die zusammen den offenen Leserahmen des von Koesling identifizierten Klons bilden, sind grau hinterlegt.

1	GTA.	AGA F.	GTC S	CAG. R	ATA V	TAT M	GCA	GTC. .S	AAC" T	TTC S	CAG S	CCA O	GAC T	AGT V	gag. R	AAA' N	TAA K	AAA K	GAT T	CCT T.	TCG R	CTT F	TTG W	GTA(GAAI K	AC: T	rtc S	raga R
	•	-	D	10	-		×	D	-	U	U	×	-	v	10		10	10	-		10	-		•	10	-	C	10
86	AC T	TCA Q	GGT V	CAT I	ttg W	gcc P	tga. E	ATT F	CAT M	gcc' P	TGG G	ggt. V	agg G	GGC A	CCA Q	gga E	GTT L	gag R	gag R	ggt. V	AGT V	gtg W	GCT(L	GAA' N	rgci A	ATTO L	GGG	I I
170	AC'	TGA	GCA	CTA	AAG	AGA	GGT	GCT	TAG	GAG	CCC	TTC	CTC	CAG	CTC	TGC	TGG	AGC	AAA	GAA	GAC.	AAC	AGA	GGA	GGA	3GG/	AGC	CTAT
	Т	Ε	Η	•	R	Ε	V	L	R	S	Ρ	S	S	S	S	А	G	Α	Κ	Κ	Т	Т	Ε	Ε	Ε	G	Α	Y
254	TG	GAA	ACT	ТСТ	ccc	TGT	TTC	TCT	GTG	TTA	ТСТ	TTT	GGG	GAG'	TGA	GAC	TTG	GGG	TAG	AGT	CAG	GTT	CAC	CCT	rcc:	AGTO	GTT	ATCC
	W	K	L	L	Ρ	V	S	L	С	Y	L	L	G	S	Ε	Т	W	G	R	V	R	F	Т	Г	Ρ	V	L	S
338	TT F	TTC C	TCT T	CCT T.	TCT T.	CTT F	CCT	TCT T	CTC C	CCT(CCT T	CCA U	TCT T.	CCT T	CTT F	CTC C	TTT D	CTT F	CAT' T	TCC. D	AGT	GAG D	GGA	ACC(JCT.	TTT(GCAC U
	Т.	5		ш	ш	Т.		ш	5	ш	ш	11	ш	<u>ц</u>	Т.	5	Т.	Т.	<u>т</u>	г	v	К	ظ	Г	К	ш	ш	11
422	ag. R	acc. P	agg G	caa K	gtg C	CTC. S	aaa N	cac T	tga E	GCCI P	ata Y	сст L	CTG C	CTC S	gtc S	TTC S	CTC. S	agt V	CTG C	tac T	tgt V	tgg G	TTC S	CTT: F	FTT F	CCTO L	CCG R	CTGT C
506	ጥጥ	GCT	TCC	тса	аса	СЪТ	ACC	CTG	ACC	тас	ፚጥጥ	СЪТ	ጥጥጥ	TAT		GAA	AAC	ልልጥ	GTG	тст	ጥጥጥ	CAC	דידריי	ᡗᢕ᠋ᡎ	ГТG	322(ግርግሞ	GTA
	L	L	P	E	Η	I	P	•	Р	R	F	I	F	I	K	K	Т	Μ	C	L	F	T	S	L	W	Ν	L	V
590	AG.	AAG	CAT	GTG	CCC	TGG	GGT	TCC	CAA'	TGT	CTG.	ATA	CAA	TGA	TTC	GAA	CCC	CCT	CAT	CTA.	ACC.	AAC	AAC	CTC	CTA	rtt <i>i</i>		GTGG
	R	S	М	С	Ρ	G	V	Ρ	Ν	V	•	Y	Ν	D	S	Ν	Ρ	L	Ι	•	Ρ	Т	Т	S	Y	L	K	W
674	GA	TCC	CCT	GGA	GAA	GGA	AGC.	ACC	TTC	TCA	ACG	TGG	TGT	GAT	TGG.	AAC	TCC	AGC	TCA	CAG	GGT	TGC	TGT	GTG	CGT	GCCA	ATC	AGCT
	D	Ρ	Ц	凸	ĸ	凸	А	Р	Б	Q	ĸ	G	V	T	G	Τ.	Ρ	А	н	ĸ	V	А	V	C	V	Ρ	Б	A
758	GC. A	AGG C	CAG S	CTC. S	AGC A	TTT F	CTT F	TCC. P	ACC. P	AGGI G	ATA	GAG. R	AAC T	CCC P	gga. F.	AAA K	AGC A	CTC S	AGA D	cag R	GTC S	TAT T	CGT V	GGT(V	GTG C	CTTC F	CAT' T	гстс Т.
010	 C7	770	~ ന <i>്</i> ന	~		- നനന	- നഗനം	- 	- (1777)	ر ستى		 א ידידי	<u>–</u> מאיד	<u>–</u>		<u></u>				TOT			۲. С. Л.	י ת ת יי		- Taar		-
042	Q	S	L	S	S	F	V	F	•	Y	G	F	I	N	T	C	L	Q	S	L	V	T	E	K	F	G	E	E
000	7 0	א שמע	aaa	7 7 7	aam	C T T T	aaa		maa	7 07	م م	aaa	7 (7)	maa	amm	73 m	ar a	CILL 2	ana	aam	CILL N	m ci au		<u>م</u> ۳	<u>م</u> ب م		س د ۲	
926	ас. Т	W	E	GAA K	L	GAA K	A	S	A	AGA E	V	Q	dga D	A	F	M	GAC T	Y	T	V	Y	D	D	I	I	T	I	K
1010	СТ	CAT	CCA	AGA	AGC	CTG	CAA	GGT	TCT	GGA'	TGT	GTC	CAT	GGA	AGC	CAT	ТСТ	GAA	GCT	CTT	TGG	CGA	ATA	CTT	CTT			
	T.	Т	0	E	А	С	K	V	T.	D	V	S	М	E	А	Т	T.	K	T.	F	G	E	Y	F				

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abman SH, Chatfield BA, Hall SL, McMurtry IF (1990) Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. Am J Physiol 259: H1921-1927

Abman SH (1994) Pathogenesis and treatment of neonatal and postnatal pulmonary hypertension. Curr Opin Pediatr 6: 239-247

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

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

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

Bloch KD, Filippov G, Sanchez LS, Nakane M, de la Monte SM (1997) Pulmonary soluble guanylate cyclase, a nitric oxide receptor, is increased during the perinatal period. Am J Physiol 272: L400-406

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

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

Brandish PE, Buechler W, Marletta MA (1998) Regeneration of the ferrous heme of soluble guanylate cyclase from the nitric oxide complex: acceleration by thiols and oxyhemoglobin. Biochemistry 37: 16898-16907

Brüne B, Ullrich V (1987) Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. Mol Pharmacol 32: 497-504

Brüne B, Mohr S, Messmer UK (1996) Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMPindependent 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, Nakane M, Murad F (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. Biochem Biophys Res Commun 174: 351-357

Caudill TK, Resta TC, Kanagy NL, Walker BR (1998) Role of endothelial carbon monoxide in attenuated vasoreactivity following chronic hypoxia. Am J Physiol 275: R1025-1030

Champion HC, Bivalacqua TJ, Wang R, Kadowitz PJ, Keefer LK, Saavedra JE, Hrabie JA, Doherty PC, Hellstrom WJ (1999) Induction of penile erection by intracavernosal and transurethral administration of novel nitric oxide donors in the cat. J Urol 161: 2013-2019

Chinkers M, Garbers DL (1989) The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. Science 245: 1392-1394

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

Cohn JN (1988) Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Eur Heart J 9 (Suppl): 171-173

D'Angelis CA, Nickerson PA, Steinhorn RH, Morin FC 3rd (1998) Heterogeneous distribution of soluble guanylate cyclase in the pulmonary vasculature of the fetal lamb. Anat Rec 250: 62-69

Denninger JW, Marletta MA (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. Biochim Biophys Acta 1411: 334-350

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

Drewett JG, Garbers DL (1994) The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. Endocr Rev 15: 135-162

Ferguson-Smith MA (1995) Gene order by FISH and FACS in Meyers RA (Hrsg.), Molecular Biology and Biotechnology, Verlag Chemie VCH, Weinheim, pp. 354-359

Firestein BL, Bredt DS (1998) Regulation of sensory neuron precursor proliferation by cyclic GMPdependent protein kinase. J Neurochem 71: 1846-1853

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

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

Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, Corbin JD (1992) Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. Am J Physiol 263: C607-615

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

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, 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

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

Fukumoto S, Koyama H, Hosoi M, Yamakawa K, Tanaka S, Morii H, Nishizawa Y (1999) Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation. Circ Res 85: 985-991

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

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

Giuili 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

Giuili G, Roechel 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
Goldberg ND, O'Dea RF, Haddox MK (1993) Cyclic GMP. Adv Cyclic Nucleotide Res 3: 155-223

Goraczniak RM, Duda T, Sharma RK (1992) A structural motif that defines the ATP-regulatory module of guanylate cyclase in atrial natriuretic factor signalling. Biochem J 282: 533-537

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. Potential relevance to regulation of blood pressure. J Clin Invest 100: 1488-1492

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

Hanson KA, Burns F, Rybalkin SD, Miller JW, Beavo J, Clarke WR (1998) Developmental changes in lung cGMP phosphodiesterase-5 activity, protein, and message. Am J Respir Crit Care Med 158: 279-288

Hardman JG, Sutherland EW (1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine trihosphate. 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

Hawkins RD, Zhuo M, Arancio O (1994) Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. J Neurobiol 25: 652-665

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

Hood J, Granger HJ (1998) Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. J Biol Chem 273: 23504-23508

Hudson ML O'Shea (1998) Is nitric oxide a signalling molecule in Caenorhabditis elegans? Soc Neurosci Abs 24: 359

Hurley JH (1998) The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. Curr Opin Struct Biol 8: 770-777

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, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. J Pharmacol Exp Ther 237: 893-900

Ingi T, Cheng J, Ronnett GV (1995) Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxidecyclic GMP signaling system. Neuron16: 835-842

Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ (1994) A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. Nat Genet 6: 84-89

Iversen HH, Ehren I, Gustafsson LE, Adolfsson J, Wiklund NP (1995) Modulation of smooth muscle activity by nitric oxide in the human upper urinary tract. Urol Res 23: 391-394

Juilfs DM, Fulle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA (1997) A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 3388-3395

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

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

Kawai N, Bloch DB, Filippov G, Rabkina D, Suen HC, Losty PD, Janssens SP, Zapol WM, de la Monte S, Bloch KD (1995) Constitutive endothelial nitric oxide synthase gene expression is regulated during lung development. Am J Physiol 268: L589-595

Kievits T, Dauwerse JG, Wiegant J, Devilee P, Breuning MH, Cornelisse CJ, van Ommen GJ, Pearson PL (1990) Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 53: 134-136

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

Kimura H, Murad F (1975) Subcellular localization of guanylate cyclase. Life Sci 17: 837-843

Kinsella JP, Neish SR, Shaffer E, Abman SH (1992) Low-dose inhalation nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. Lancet 340: 819-820

Koesling D (1995) Struktur und Regulation der löslichen Guanylyl-Cyclasen. Habilitationsschrift Freie Universität Berlin Fachbereich Humanmedizin: pp 45-51

Koesling D (1998) Modulators of soluble guanylyl cyclase. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 358: 123-126

Koesling D, Friebe A (1999) Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation.Rev Physiol Biochem Pharmacol 135: 41-65

Koller KJ, de Sauvage FJ, Lowe DG, Goeddel DV (1992) Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. Mol Cell Biol 12: 2581-2590

Kone BC (2000) Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. Acta Physiol Scand 168: 27-31

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

Leinders-Zufall T, Shepherd GM, Zufall F (1996) Modulation by cyclic GMP of the odour sensitivity of vertebrate olfactory receptor cells. Proc R Soc Lond B Biol Sci 263: 803-811

Liaudet L, Soriano FG, Szabo C (2000) Biology of nitric oxide signaling. Crit Care Med 28 (Suppl): N37-52

Lin F, Worman HJ (1993) Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. J Biol Chem 268: 16321-16326

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 USA 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

MacFarland RT, Zelus BD, Beavo JA (1991) High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. J Biol Chem 266: 136-142

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

Mericq V, Uyeda JA, Barnes KM, De Luca F, Baron J (2000) Regulation of fetal rat bone growth by Ctype natriuretic peptide and cGMP. Pediatr Res 47: 189-193

Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF (2000) Vertebrate pseudogenes FEBS Lett 468: 109-114

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

Morton DB, Hudson ML, Waters E, O'Shea M (1999) Soluble guanylyl cyclases in Caenorhabditis elegans: NO is not the answer. Curr Biol 9: R546-547

Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch JP, Kast R, Busse R (1997) Effect of YC-1, an NOindependent, 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) Nitro-Glycerine as a remedy for angina pectoris. Lancet 1: 80-81

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, 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

Nighorn A, Byrnes KA, Morton DB (1999) Identification and characterization of a novel β 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

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1985) Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. Eur J Biochem 150: 1-5

North AJ, Star RA, Brannon TS, Ujiie K, Wells LB, Lowenstein CJ, Snyder SH, Shaul PW (1994) Nitric oxide synthase type I and type III gene expression are developmentally regulated in rat lung. Am J Physiol 266: L635-641

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

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

Parker JD, Parker JO (1998) Nitrate therapy for stable angina pectoris. N Engl J Med 338: 520-531

Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J (1991) Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. Lancet 338: 1173-1174

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

Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D (2000) The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. Curr Biol 10: 555-558

Pitt GS, Milona N, Borleis J, Lin KC, Reed RR, Devreotes PN (1992) Structurally distinct and stagespecific adenylyl cyclase genes play different roles in Dictyostelium development. Cell 69: 305-315

Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM (1992) Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. Lancet 340: 818-819

Roberts JD Jr, Fineman JR, Morin FC 3rd, Shaul PW, Rimar S, Schreiber MD, Polin RA, Zwass MS, Zayek MM, Gross I, Heymann MA, Zapol WM (1997) Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The Inhaled Nitric Oxide Study Group. N Engl J Med 336: 605-610

Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM (1993) Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. N Engl J Med 328: 399-405

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

Scholz H, Schwabe U (2000) Taschenbuch der Arzneibehandlung, Angewandte Pharmakologie. Gustav Fischer Verlag, 12. neubearbeitete Auflage, pp 125-127

Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tome P, Aggarwal A, Bajorek E, Bentolila S, Birren BB, Butler A, Castle AB, Chiannilkulchai N, Chu A, Clee C, Cowles S, Day PJ, Dibling T, East C, Drouot N, Dunham I, Duprat S, Edwards C, Fan JB, Fang N,

Fizames C, Garrett C, Green L, Hadley D, Harris M, Harrison P,Brady S, Hicks A, Holloway E, Hui L, Hussain S, Louis-Dit-Sully C, Ma C, MacGilvery A, Mader C, Maratukulam A, Matise TC, McKusick KB, Morissette J, Mungall A, Muselet D, Nusbaum DC, Page DC, Peck A, Perkins S, Piercy M, Qin F, Quackenbush J, Ranby S, Reif T, Rozen S, Sanders C, She X, Silva J, Slonim DK, Soderlund C, Sun WL, Tabar P, Thangarajah T, Vega-Czarny N, Vollrath D, Voyticky S, Wilmer T, Wu X, Adams MD, Auffray C, Walter NAR, Brandon R, Dehejia A, Goodfellow PN, Houlgatte R, Hudson JR, Ide SE, Iorio KR, Lee WY, Seki N, Nagase T, Ishikawa K, Nomura N, Phillips C, Polymeropoulos MH, Sandusky M, Schmitt K, Berry R, Swanson K, Torres R, Venter JC, Sikela JM, Beckman JS, Weissenbach J, Myers RM, Cox DR, James MR, Bentley D, Deloukas P, Lander ES, Hudson TJ (1996) A gene map of the human genome. Science 274: 540-546

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

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

Shapiro MB, Senapathy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. Nucleic Acids Res 15: 7155-7174

Sharina IG, Krumenacker JS, Martin E, Murad F (2000) Genomic organization of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of the mammalian soluble guanylyl cyclase genes. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 10878-10883

Sharma VS, Magde D (1999) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: a mechanistic model. Methods 19: 494-505

Staritz M, Poralla T, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH (1985) Effect of glyceryl trinitrate on the sphincter of Oddi motility and baseline pressure. Gut 26: 194-197

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 Stone JR, Marletta MA (1998) Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. Chem Biol 5: 255-261

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

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

Tesmer JJ, Sunahara RK, Johnson RA, Gosselin G, Gilman AG, Sprang SR (1999) Two-metal-Ion catalysis in adenylyl cyclase. Science 285: 756-760

Torfgard KE, Ahlner J (1994) Mechanisms of action of nitrates. Cardiovasc Drugs Ther 8: 701-717

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

Walsh-Sukys MC (1993) Persistent pulmonary hypertension of the newborn. The black box revisited. Clin Perinatol 20: 127-143

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 USA 91: 2592-2596

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

Wilson EM, Chinkers M (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. Biochemistry 34: 4696-4701

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

Zabel U, Häusler C, Weeger M, Schmidt HH (1999) Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. J Biol Chem 274: 18149-18152

Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH (1997) Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 14848-14853

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

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

Zhuo M, Laitinen JT, Li XC, Hawkins RD (1998) On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus. Learn Mem 5: 467-480

8. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Originalarbeiten:

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

Behrends S, Vehse K (2000) 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

Eingereicht:

Koglin M, Vehse K, Budaeus L, Scholz H, Behrends S Nitric oxide activates the β_2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit.

Abstracts:

Behrends S, Vehse K (2000) A frameshift Deletion in the GUCY1B2 gene, a candidate gene for hypertension. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 361 (Suppl): R 42

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, Vehse K, Scholz H, Bullerdiek J, Kazmierczak B (2000) Colocalisation of the α_1 and β_1 subunit genes of NO-sensitive guanylyl cyclase genes in a chromosomal candidate region for eclampsia. Zeitschrift für Kardiologie 89 (Suppl 5): 338

9. LEBENSLAUF

geboren am 19.12.1974 in Hamburg

1980-1984	Grundschule Marschweg, Hamburg
1984-1994	Gymnasium Rissen, Hamburg
1994-1995	Ableistung der Wehrpflicht
10/1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
9/1997	Ärztliche Vorprüfung
8/1998	Erstes medizinisches Staatsexamen
3/2001	Zweites medizinisches Staatsexamen
10/1998	Beginn der Experimente für die Doktorarbeit im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Scholz

Hamburg, den 27.05.2002

10. DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hasso Scholz möchte ich mich für die Überlassung des Themas der Dissertation sowie prägende Einblicke in die wissenschaftliche Diskussion bedanken.

Frau Anna Steenpaß und Frau Jutta Starbatty danke ich für die Einführung in die Laborarbeit und für die hilfreiche Unterstützung bei zahlreichen Experimenten.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie vielen anderen Mitgliedern des Laborteams für die gute Zusammenarbeit sowie zahlreiche interessante und aufbauende Gespräche während meiner Tätigkeit im Labor.

Herrn PD Dr. Bernd Kazmierczak (Bremen) und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und der Messung der Promotoraktivität.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Sönke Behrends für seine engagierte und motivierende Unterstützung während der gesamten Dissertation sowie für die kompetente Einführung in die wissenschaftliche Arbeit.

Erklärung:

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

Klonierung und Untersuchung einer neuen Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase des Menschen

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

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

Hamburg, den 27.05.2002

Kai Vehse