

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

Untersuchungen zur Regulation und Expression der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-
Cyclase am Herzkreislaufsystem und an menschlichen Thrombozyten

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

vorgelegt von
Jörg Kempfert
aus Berlin

Hamburg 2002

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

Untersuchungen zur Regulation und Expression der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-
Cyclase am Herzkreislaufsystem und an menschlichen Thrombozyten

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

vorgelegt von
Jörg Kempfert
aus Berlin

Hamburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 10.04.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Priv. Doz. Dr. S. Behrends

Koreferent: Prof. Dr. Th. Eschenhagen

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BNP	neuronales natriuretisches Peptid (<i>brain natriuretic peptide</i>)
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cpm	registrierte Zerfälle pro Minute
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale Konzentration
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor (<i>endothelium derived relaxing factor</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
MOPS	3-Morpholino-propan-sulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
SEM	Standardabweichung (<i>standard error of the means</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
TBST	Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung (<i>Tris-buffered-saline-tween</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
YC-1	3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl]-1-benzylindazol

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	7
1.1 Allgemeines	7
1.2 NO-freisetzende Pharmaka und der NO / cGMP Signalweg	7
1.3 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Menschliche Thrombozyten und Membranpräparation	14
2.2 Versuchstiere und Gewinnung der Kardiomyozyten durch Langendorff-Perfusion	15
2.3 Gewinnung cytosolischen Proteins.....	16
2.4 Western-blot	16
2.5 Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität	17
3 Ergebnisse	20
3.1 Altersabhängige Expression der β_1 -Untereinheit in Herz- und Lungengewebe der Ratte	20
3.2 Expression und Regulation der β_1 -Untereinheit in der Dura mater Glyceroltrinitrat-behandelter Ratten gegenüber Kontroll-Tieren	28
3.3 Untersuchungen der Eigenschaften sowie der subzellulären Lokalisation der β_1 -Untereinheit in humanen Thrombozyten nach Aggregation.....	32
4 Diskussion	41
4.1 Aktivität und Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase während der postnatalen Entwicklung im Herzkreislaufsystem.....	42
4.2 Induktion der löslichen Guanylyl-Cyclase-Expression in der Dura mater bei Glyceroltrinitratbehandlung.....	46
4.3 Subzelluläre Lokalisation und Aktivität der löslichen Guanylyl-Cyclase in menschlichen Thrombozyten während des Aggregationsvorganges.....	47
5 Zusammenfassung	51
6 Literaturverzeichnis	52

7 Publikationsverzeichnis	66
8 Lebenslauf	68
9 Danksagung.....	69

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Stickstoffmonoxid (NO)-aktivierte Guanylyl-Cyclasen sind Rezeptoren für NO-freisetzende Pharmaka und endogen gebildetes NO. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Gefäßtonus und Blutdruck und sind Angriffspunkte für Pharmaka zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit. Insofern ist die Entwicklung von selektiven Substanzen für die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase in spezifischen Organen oder Zelltypen von großem pharmakologischem Interesse.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Rolle der löslichen Guanylyl-Cyclase als Rezeptor für die erwünschten und unerwünschten Wirkungen von NO-freisetzenden Substanzen wie Glyceroltrinitrat näher zu charakterisieren. Entsprechend wurden einerseits Untersuchungen am Herzen und an Thrombozyten durchgeführt, wo die lösliche Guanylyl-Cyclase an der Vermittlung des antianginösen bzw. des schwächer ausgeprägten antiaggregatorischen Effekts von Glyceroltrinitrat beteiligt ist. Andererseits wurden Untersuchungen an der schmerzempfindlichen Dura mater durchgeführt, wo Glyceroltrinitrat über bisher unbekannte Mechanismen Kopfschmerzen auslöst.

1.2 NO-freisetzende Pharmaka und der NO / cGMP Signalweg

Glyceroltrinitrat ist das älteste NO-freisetzende Pharmakon und wurde erstmals 1847 von Sobrero synthetisiert (Marsh und Marsh 2000). Schon Sobrero beobachtete, dass die Applikation selbst kleinster Mengen der neuen Substanz auf die Zunge starke Kopfschmerzen auslösen. Glyceroltrinitrat induzierte Kopfschmerzen werden durch Freisetzung von NO und einer konsekutiven cGMP-abhängigen Dilatation von Gefäßen der schmerzempfindlichen Dura mater vermittelt (Thomsen und Olesen 1998). Bereits 1977 konnte gezeigt werden, dass die lösliche Guanylyl-Cyclase durch Glyceroltrinitrat und andere NO-freisetzende Substanzen aktiviert wird (Katsuki et al. 1977, Miki et al. 1977, Arnold et al. 1977, Schultz und Schultz 1977). Diese Enzymaktivierung durch NO wurde als ein nicht-physiologisches Phänomen

aufgefasst, da zu diesem Zeitpunkt NO in biologischen Systemen unbekannt war. Furchgott und Mitarbeiter zeigten 1980 die Existenz einer vom Endothel produzierten Substanz, die erforderlich war, um die Relaxation von Blutgefäßen zu vermitteln (Furchgott und Zawadzki 1980). Sie bezeichneten diese Substanz als "Endothelium derived relaxing factor" (EDRF). Demgegenüber schlugen Ignarro und Furchgott 1986 unabhängig voneinander vor, dass EDRF mit NO identisch ist (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987, Moncada et al. 1988). Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass ein lösliches Enzym in Makrophagen NO aus der Aminosäure L-Arginin bildet. Es wurde später gereinigt und als NO-Synthase bezeichnet (Hibbs et al. 1988, Marletta et al. 1988, Hevel et al. 1991). Damit waren die beiden wesentlichen Komponenten des NO / cGMP Signalweges identifiziert: NO-produzierende NO-Synthasen und die cGMP-bildende lösliche Guanylyl-Cyclase.

Die Klonierung von Untereinheiten der löslichen Guanylyl-Cyclase gelang nach Reinigung des Enzyms aus Rinderlunge (Koesling et al. 1988, Koesling et al. 1990) bzw. Rattenlunge (Nakane et al. 1988, Nakane et al. 1990). Durch Koexpression der klonierten cDNAs der Untereinheiten des Rinder- bzw. Rattenlungenenzym (α_1 und β_1) wurde in vitro NO-stimulierbare Enzymaktivität erhalten (Harteneck et al. 1990, Buechler et al. 1991). Zwei weitere cDNAs für potentielle Guanylyl-Cyclase Untereinheiten wurden durch molekularbiologische Techniken identifiziert, ohne dass dem ein Nachweis oder eine Reinigung auf Proteinebene vorausgegangen war: Mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide in der Polymerasekettenreaktion und durch das Durchsuchen von Genbanken konnte eine cDNA mit Ähnlichkeit zur α_1 -Untereinheit aus humanem fetalem Hirngewebe kloniert werden, die mit α_2 bezeichnet wurde (Harteneck et al. 1991). Die wegen der größeren Ähnlichkeit zur β_1 -Untereinheit als β_2 bezeichnete Untereinheit konnte aus Nierengewebe der Ratte kloniert werden (Yuen et al. 1990). Koexpressionsexperimente der beiden neuen cDNAs ergaben NO-stimulierbare Enzymaktivität für die Kombination α_2 / β_1 (Harteneck et al. 1991). Koexpression der cDNA der β_2 -Untereinheit mit allen bekannten cDNAs führte dagegen nicht zu messbarer Enzymaktivität und Ergebnisse, nach denen die Koexpression der α_1 - mit der β_2 -Untereinheit in vitro zu katalytischer Aktivität führt sind stark umstritten (Yuen et al. 1990, Gupta et al. 1997, Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). Aus diesen Daten lässt sich die sichere Existenz der α_1 / β_1 Isoform aufgrund der Reinigung aus Lungengewebe und die naheliegende Bildung eines α_2 / β_1 heterodimeren Enzyms aufgrund der Koexpressionsexperi-

mente folgern. Tatsächlich konnte die α_2 / β_1 heterodimere Enzymisoform durch Immunpräzipitation und Immunoblot an Cytosol aus menschlicher Placenta nachgewiesen werden (Russwurm et al. 1998). Ein Vergleich der α_2 / β_1 heterodimeren Enzymisoform mit der klassischen α_1 / β_1 Isoform in Sf9 Zellen zeigte weitgehende Übereinstimmung in den pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften und identische Absorptionseigenschaften der prosthetischen Hämgruppe (Russwurm et al. 1998). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die β_2 -Untereinheit der Ratte in Abwesenheit einer weiteren Untereinheit ein durch NO aktivierbares Enzym bildet (Koglin et al. 2001). Damit wurde erstmals das Vorkommen einer homodimer angelegten, NO-sensitiven, löslichen Guanylyl-Cyclase bei Säugern nachgewiesen. Es konnte eine Leserasterverschiebung in der N-terminalen potentiell hämbindenden Domäne beim Menschen identifiziert werden, die stark dafür spricht, dass die humane β_2 -Untereinheit kein NO-sensitives Enzym zu bilden vermag (Behrends und Vehse 2000). Die lösliche Guanylyl-Cyclase benötigt als Substrat entweder Mg/GTP oder Mn/GTP. Des Weiteren ist das Vorhandensein eines zweiten metallischen Ions für die Katalyse essentiell. Dieses ist aber nicht an GTP gebunden (Tesmer et al. 1999). Abbildung 1 zeigt die verschiedenen aktivierbaren Enzymisoformen in schematischer Form.

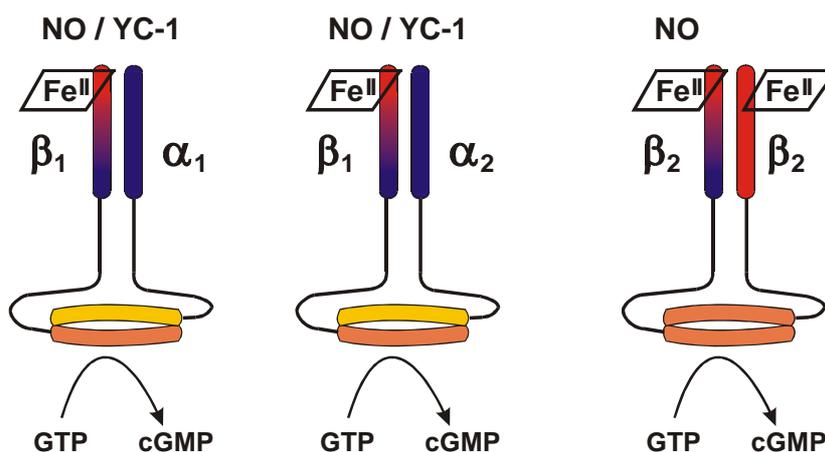


Abbildung 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Guanylyl-Cyclase Untereinheiten. Dargestellt sind durch NO- oder NO/YC-1-aktivierbare Kombinationen der entsprechenden Untereinheiten. Abbildung modifiziert nach Denninger und Marletta 1999.

Die Wirkung von Glyceroltrinitrat bei Angina pectoris wird durch die Dilatation der großen venösen Kapazitätsgefäße und einer damit verbundenen Senkung der kardialen Vorlast vermittelt (Williams et al. 1965). Darüber hinaus kommt es zu einer Dilatation von epikardialen Koronararterien und kardialen Kollateralgefäßen, deren Blutfluss durch endogen von Endothelzellen gebildetes NO verstärkt werden kann (Goldstein et al. 1974, Bache et al. 1975, Cohn et al. 1977, Brown et al. 1981, Klassen et al. 1999). Bei endothelialer Dysfunktion wird unter körperlicher Anstrengung die endogene NO-Bildung nicht ausreichend gesteigert und die Gabe von Glyceroltrinitrat vermag hier den Blutfluß durch kardiale Kollateralgefäße wieder den Erfordernissen anzupassen (Klassen et al. 1999). NO wird am Herzen aber nicht nur im Gefäßendothel, sondern auch innerhalb der Kardiomyozyten gebildet (Übersicht bei Canty 2000). Die Effekte von NO auf die Kardiomyozyten und die myokardiale Funktion sind dabei stark dosisabhängig. Im niedrigen Dosisbereich kommt es zu einer Steigerung der Kontraktibilität, während höhere NO-Konzentrationen zu einer Depression der myokardialen Kontraktibilität führen (Vila-Petroff et al. 1999). Inwieweit die Gabe von Glyceroltrinitrat auch Auswirkungen über eine Veränderung der Kontraktibilität und des Sauerstoffverbrauchs der Kardiomyozyten hat, ist umstritten (Weiss et al. 1995, Sadoff et al. 1996, Kojda et al. 1997, Straznicka et al. 1997). Untersuchungen zur Gewebslokalisierung der löslichen Guanylyl-Cyclase, als Zielenzym von NO und NO-freisetzenden Pharmaka am Herzen stehen zur Zeit noch aus.

Die Substanz YC-1, ein Benzylindazol Derivat (siehe Abbildung 2), wurde zunächst als ein Inhibitor der Thrombozytenaggregation beschrieben, der eine Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration bewirkte (Wu et al. 1995). YC-1 führte zu einer Aktivierung der gereinigten Guanylyl-Cyclase um das Zehnfache (Friebe et al. 1996, Mülsch et al. 1997). Diese Aktivierung ist unabhängig von NO, erfordert aber die Anwesenheit der prosthetischen Hämgruppe. In der Gegenwart von YC-1 ist die Konzentrationswirkungskurve zu niedrigeren EC₅₀-Werten verschoben und die maximal erreichbare katalytische Rate ist um 40 % gesteigert (Friebe et al. 1996). Der ansonsten schwache Aktivator CO aktiviert bei gleichzeitiger Zugabe von YC-1 die Guanylyl-Cyclase in einem ähnlichen Ausmaß wie NO (Friebe et al. 1996). YC-1 veränderte die Absorption der Soret Bande in der UV-VIS Spektroskopie nicht, was gegen eine direkte Interaktion dieser Substanz mit der prosthetischen Hämgruppe des Enzyms spricht (Friebe und Koesling 1998).

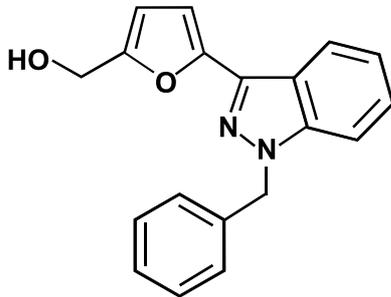


Abbildung 2 Chemische Struktur von YC-1, einem neuen Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase.

„YC-1“ ist der Name der Yung Shin Pharmaceutical Industry Corporation für 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol.

In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass YC-1 eine effektiv antithrombotisch wirkende Substanz ist (Teng et al. 1997). Darüber hinaus wurde auch ein blutdrucksenkender Effekt von YC-1 bei normotensive und hypertensiven Ratten nachgewiesen (Rothermund et al. 2000). An isolierten Aortenringen von Kaninchen wird die Konzentrationswirkungskurve von Glyceroltrinitrat durch YC-1 zu niedrigeren EC_{50} -Werten verschoben und die maximal erreichbare Vasodilatation erhöht (Mülsch et al. 1997). Ein kombinierter Einsatz von Glyceroltrinitrat und YC-1 Derivaten ist ein potentieller neuer therapeutischer Ansatz in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit.

Bei Infusion von Glyceroltrinitrat treten Kopfschmerzen nach 20-30 Minuten auf (Ashina et al. 2000). Welche Rolle der löslichen Guanylyl-Cyclase hierbei zukommt und unter welchen Bedingungen das Enzym in der Dura mater exprimiert wird, ist noch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit soll unter anderem auch versucht werden, mögliche Zusammenhänge zwischen der Auslösung von Kopfschmerzen durch Glyceroltrinitrat und der Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase zu untersuchen.

Durch intravenöse Infusion von Glyceroltrinitrat in klinisch relevanten Dosierungen kommt es zu einer Reduktion der Thrombozytenaggregation (Lam et al. 1988, Diodati et al. 1990, Karlberg et al. 1992, Johnstone et al. 1993, Lacoste et al. 1994). NO hemmt bei Thrombozyten sowohl die Adhäsion an Gefäßendothelien (Radomski et al. 1987a,b) als auch die Aggregation (Radomski et al. 1990) über Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase und nachfolgender cGMP-Erhöhung (Moro et al. 1996). Von den drei Isoformen der NO-Synthasen, die bis zum jetzigen Zeitpunkt bekannt sind, wurden zwei in Thrombozyten nachgewiesen: die endotheliale und die induzierbare Form (Mehta et al. 1995). Von Thrombozyten produziertes

NO führt zu einer moderaten Hemmung des primären Aggregationsprozesses. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses freigesetzte NO eine deutliche Hemmung der Thrombozyten-Rekrutierung bewirkt (Freedman et al. 1997). Durch diesen Mechanismus wird die intraarterielle Thrombenbildung verhindert oder verlangsamt (Peire und Puig-Parellada, 1998). Untersuchungen mit Antikörpern gegen Untereinheiten der Guanylyl-Cyclase zeigten, dass in Thrombozyten die Untereinheiten α_1 und β_1 vorkommen (Guthmann et al. 1992).

Die Guanylyl-Cyclase der Thrombozyten ist zurzeit Gegenstand umfangreicher Untersuchungen mit dem Ziel der Entwicklung neuer Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation. Dabei werden einerseits NO freisetzende (Kots et al. 2000) oder NO-unabhängige Aktivatoren wie YC-1 (Becker et al. 2000) oder BAY 41-2272 (Stasch et al. 2001) untersucht. YC-1 hemmt nicht nur die Aggregation von Thrombozyten, sondern ist auch in der Lage Thrombozytenaggregate aufzulösen (Ko et al. 1994). Auch für NO-Donatoren konnte gezeigt werden, dass sie die Disaggregation von Thrombozyten induzieren können (Stamler et al. 1989, Salas et al. 1994). Während die Guanylyl-Cyclase in menschlichen Thrombozyten aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften als Rezeptor für NO und YC-1 angesehen wird (Friebe et al. 1998, Becker et al. 2000), sind die Eigenschaften und mögliche Modifikationen der Guanylyl-Cyclase in aggregierten Thrombozyten weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob durch den Aggregationsprozess Eigenschaften der Guanylyl-Cyclase in Thrombozyten modifiziert werden.

1.3 Zielsetzung

Während die molekularen Mechanismen der Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase gut untersucht sind, ist über die Expression und Regulation des Enzyms in vivo noch relativ wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit soll zum besseren Verständnis der Enzymfamilie am Herzkreislaufsystem beitragen. Im Einzelnen lassen sich folgende Ziele abgrenzen:

1. Kommt es zu altersabhängigen Veränderungen der Aktivität und Expression des Enzyms am Herzkreislaufsystem?
2. Wird die lösliche Guanylyl-Cyclase an der schmerzempfindlichen harten Hirnhaut von Ratten exprimiert und ergibt sich ein Zusammenhang mit der Auslösung von Kopfschmerzen durch Glyceroltrinitrat?
3. Welchen Einfluss hat der Aggregationsprozeß in menschlichen Thrombozyten auf die Eigenschaften der löslichen Guanylyl-Cyclase?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Aktivität und Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase in nativen Geweben untersucht. Biochemische und pharmakologische Eigenschaften wurden durch Messung der Enzymaktivität unter verschiedenen physiologischen Bedingungen bestimmt. Die Expression und zelluläre Verteilung wurde unter Verwendung von zum Teil neu charakterisierten Antikörpern untersucht. Dabei wurden die Methoden des Westernblots und der Immunhistochemie angewandt.

2 Material und Methoden

2.1 Menschliche Thrombozyten und Membranpräparation

Menschliche Thrombozytenkonzentrate wurden von der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in anonymisierter Form zur Verfügung gestellt. Diese enthalten Citrat in einer Konzentration von 0,61 mM zur Komplexbildung von freiem Ca^{2+} . Freies Ca^{2+} ist für eine Aggregation der Thrombozyten essentiell. Durch die komplexierende Wirkung des Citrats wird eine Aggregation der Thrombozyten vor der Infusion vermieden. Aggregation *in vitro* wurde durch Erhöhung der Ca^{2+} -Ionen Konzentration ermöglicht. Hierzu wurde CaCl_2 in einer Konzentration von 1,22 mM zugefügt. Anschließend wurden die Thrombozytenkonzentrate in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Der eine Teil wurde zur Aggregation durch Zugabe von ADP (20 μM) angeregt, der andere Teil wurde als Kontrolle verwendet. Beide Thrombozytenkonzentrate wurden bei 3000 x g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und das Thrombozytensediment (ca. 1 g) wurde in 5 ml TEA-Puffer (50 mM TEA, pH 7.4, 2 mM DTT, 2 mM EDTA) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Das Cytosol wurde durch Zentrifugation bei 45000 x g für 1 h bei 4 °C gewonnen. Das restliche Sediment wurde in 10 ml TEA-Puffer resuspendiert und durch einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten, bestehend aus jeweils 13 ml 25 % und 30 % Saccharose (w/w), zentrifugiert. Nach Zentrifugation für 2 Stunden bei 120000 x g bei 4 °C wurden die Membranfraktionen an der Puffer / 25 % Saccharose Grenze (Membranen niedriger Dichte, M I) und der 25 % / 30 % Grenze (Membranen hoher Dichte, M II) gewonnen. Das verbleibende Sediment (Material sehr hoher Dichte SHD) und die gewonnenen Membranen wurden in TEA-Puffer gelöst und für 30 Minuten bei 120000 x g bei 4 °C zentrifugiert, um die restliche Saccharose zu entfernen.

2.2 Versuchstiere und Gewinnung der Kardiomyozyten durch Langendorff-Perfusion

Versuchstiere wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin^R) und Leitungswasser ad libitum gehalten. Wistar Ratten verschiedener Altersstufen stammten aus der Zucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf oder wurden von der Fa. Charles River bezogen. Die Tiere wurden nach CO₂-Narkose durch Dekapitation getötet. Nach Öffnung des Thorax wurde das Herz aus dem Herzbeutel gelöst, vom Gefäßstamm abgetrennt und entnommen. Das Herz wurde in 0,9 % NaCl für 1 min vom Blut befreit, getrocknet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Auch die Lunge wurde präpariert und tiefgefroren. Die Organe wurden bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

Herzen von geschlechtsreifen Ratten wurden wie oben beschrieben entnommen und in sterilem MOPS-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 5 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, 50 mM Taurin, 10 mM MOPS begast mit O₂, pH 6.9) kurz möglichst blutfrei gespült. Das Herz wurde nach Langendorff retrograd über die Aorta kanüliert und nicht-rezirkulierend bei einem konstanten Fluss von 10 ml / min für 3 min mit MOPS-Puffer perfundiert, um Calcium und Blut auszuwaschen. Anschließend wurde das Herz mit Kollagenase 0,1 %ig in MOPS-Puffer (Kollagenase von Clostridium histolyticum CLS II 215 U / mg, Boehringer Mannheim) rezirkulierend bei 35 °C für 30 min bei einem Fluss von 30 ml / min perfundiert. Anschließend wurden in KB-Medium nach Isenberg und Klöckner 1982 (70 mM KCl, 20 mM Taurin, 20 mM Glucose, 30 mM KH₂PO₄, 5 mM MgSO₄, 5 mM Bernsteinsäure, 5 mM Kreatin, 1 mM EGTA, 5 mM Brenztraubensäure, 7,3 mM β-Hydroxybuttersäure, 5 mM Na₂ATP, begast mit O₂, pH 7,4) die Vorhöfe von den Ventrikeln abgetrennt und Bindegewebe entfernt. Die Ventrikel wurden mit einem Skalpell zerkleinert und bei 37 °C für 30 – 60 min in KB-Medium inkubiert. Die Suspension wurde anschließend durch Nylongaze (200 µm Maschengröße) filtriert, um nicht aufgeschlossene Gewebeteile von isolierten Zellen zu trennen, und bei 50 x g für 8 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 10 ml MOPS-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf 6 % Albumin in MOPS-Puffer geschichtet und bei 50 g für 8 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend zweimal in 10 ml MOPS-Puffer gewaschen. Ein Aliquot wurde auf einen Objektträger aufgebracht und ein Tropfen 0,01 M CaCl zugegeben. Mittels eines

Phasenkontrastmikroskopes wurden die Kardiomyozyten auf erhaltene Kontraktionsfähigkeit überprüft. Das Zellsediment wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.3 Gewinnung von cytosolischem Protein

Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Metallstößels und eines Mörsers zerkleinert und in DEAE-Puffer (50 mM TEA / HCl, pH 7,0, 0,2 mM Benzamidin, 1 mM EDTA, 2 mM GSH) aufgenommen, im Homogenisator und anschließend noch durch 10-faches Auf- und Abziehen durch eine 22G Kanüle homogenisiert. Der Ansatz wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, und die Zellkerne und Membranen 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und mit 20000 rpm in der Ultrazentrifuge von der cytosolischen Fraktion abgetrennt. Der Überstand mit der cytosolischen Fraktion wurde im Anschluss in ein anderes Gefäß überführt. Die am Boden verbleibenden Membranen wurden in DEAE-Puffer resuspendiert.

2.4 Western-blot

Für die Untersuchung der Proteinexpression wurde im gewonnenem Gewebe der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Zwischen 20 μg und 80 μg Gesamtprotein wurden im Western-blot eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde mit 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran überführt (Biorad Minigel System). Die Membranen wurden mit Ponceau S gefärbt und unspezifische Bindungstellen durch Inkubation für 1 Stunde in TBST-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) mit 5 % Trockenmilch abgesättigt. Die Membranen wurden dann in TBST-Puffer mit 0,5 % Trockenmilch und dem Guanylyl-Cyclase- β_1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bzw. dem GP IIB / IIIa β_3 Antikörper (Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:100 für 1,5 Stunden inkubiert. Danach wurden die Membranen drei mal in TBST-Puffer gewaschen und mit dem zweiten Antikörper für 1 Stunde inkubiert (Horseradish-Peroxidase labeled Anti-Kaninchen-IgG, Sigma - Guanylyl-Cyclase- β_1 Antikörper; oder Anti-Ziege-IgG Antikörper, Santa Cruz - GP IIB / IIIa β_3 Antikörper). Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurden die Membranen unter Ver-

wendung des ECL Western-blot Entwicklungssystem nach dem empfohlenem Protokoll des Herstellers entwickelt (Amersham). Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Peptidverdrängung mit dem für die Immunisierung verwendeten synthetischen Peptid in einer Konzentration von 2,5 µg / ml überprüft.

2.5 Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität

Die Methode zur Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität, beruht auf der Bestimmung von aus $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ gebildetem $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ (Schultz und Böhme 1984). 50 µg Protein wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl in Anwesenheit von 0,025 mg Creatin-Kinase, 50 mM TEA / HCl (pH 7,4), 1 mM IBMX, 3 mM MgCl_2 , 5 mM Creatinphosphat, 1 mM cGMP, 0,5 mM GTP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von cGMP erhöht man nicht nur die Wiederfindungsrate von $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$, sondern verringert auch den durch Phosphodiesterasen abgebauten Anteil an $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$. Bei Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter stimulierten Bedingungen wurde den Ansätzen in unterschiedlichen Konzentrationen der Verdünnungsreihe DEA / NO oder DEA / NO und YC-1 zugegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Zinkacetat-Lösung gestoppt und die 5'-Nukleotide durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Natriumcarbonat-Lösung mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitiert (Chan und Lin 1974). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 min bei 4000 rpm) abgetrennt, wobei das $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ im Überstand verblieb. In Säulen wurde Aluminiumoxid mit 2 ml 0,1 N Perchlorsäure angesäuert und 800 µl Überstand der Inkubationsansätze noch während des Durchlaufs zugegeben und das $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ an die Säule gebunden. Die Säule wurde mit 5 ml demineralisiertem H_2O gespült und anschließend das $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ mit 5 ml 250 mM Natriumacetat in Scintillationsgefäße eluiert. Die Zerfälle pro Minute (cpm) des ^{32}P wurden durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler bestimmt.

Zur Berechnung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität benötigt man einen Leerwert, der durch einen Ansatz ohne Protein in der Versuchsreihe erzielt wurde. Nicht enzymatisch entstandenes $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ konnte so nachgewiesen werden und die Zählrate des Leerwertes von den Zählraten der Ansätze abgezogen werden. Die Wiederfindungsrate lässt sich in einigen An-

sätzen durch den Einsatz von [^{32}P]cGMP anstatt [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]GTP bestimmen, da während der Probenaufbereitung ein Teil des cGMP mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitierte bzw. nicht vollständig von den Aluminiumsäulen eluiert werden konnte. Die Wiederfindungsrate wurde dann aus dem Verhältnis von isolierter zu eingesetzter Radioaktivität errechnet und lag bei $0,5 \pm 0,05$. Die Reinheit des [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]GTP lag bei 0,9. Die spezifische Aktivität der Guanylyl-Cyclase lässt sich als Menge cGMP (in nmol), die von 1 mg Protein in 1 min gebildet wurde, nach folgender Formel berechnen:

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

v spez. Aktivität der Guanylyl-Cyclase ($\text{nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$)

C Zählrate der Probe (cpm)

C_0 Zählrate des Leerwertes (cpm)

C_t Zählrate des eingesetzten [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]GTP (cpm)

S Menge des eingesetzten Substrates 5'-GTP pro Ansatz (nmol)

W Wiederfindungsrate von cGMP (bestimmt mit ^{32}P -cGMP, um Verluste durch Kopräzipitation mit ZnCO_3 oder unvollständige Elution von der Säule zu quantifizieren)

RG Reinheitsgrad des [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]GTP

P Proteinmenge pro Inkubationsansatz (mg)

t Inkubationsdauer (min)

YC-1 (Alexis) wurde in DMSO gelöst, wobei die Endkonzentration von DMSO 2,5 % nicht überschritt. Bis zu dieser Konzentration wird die Guanylyl-Cyclase-Aktivität nicht beeinflusst. Die Konzentration der divalenten Metallionen wurde mit der Win-MaxC Software berechnet. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte in Doppelbestimmung. Um Unterschiede zwischen zwei Gruppen statistisch erfassen zu können wurde ein Student t-Test durchgeführt. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde ein Newman-Keuls post-Test vorgenommen. EC_{50} -Werte wurden unter Verwendung der Microcal Origin Software bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Altersabhängige Expression der β_1 -Untereinheit in Herz- und Lungengewebe der Ratte

Von Bloch et al. 1997 konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheit im Lungengewebe bei 8-16 Tage alten gegenüber fetalen oder geschlechtsreifen Ratten signifikant erhöht ist. Zusätzlich wurde mittels Western-blot eine stärkere Proteinexpression der α_1 -Untereinheit im perinatalen Lungengewebe festgestellt (Bloch et al. 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es möglich mit Hilfe eines neu generierten Antikörpers gegen die β_1 -Untereinheit zu untersuchen, inwieweit die mRNA Veränderungen während der Lungenentwicklung auch zu Änderungen in der Proteinexpression der β_1 -Untereinheit führen.

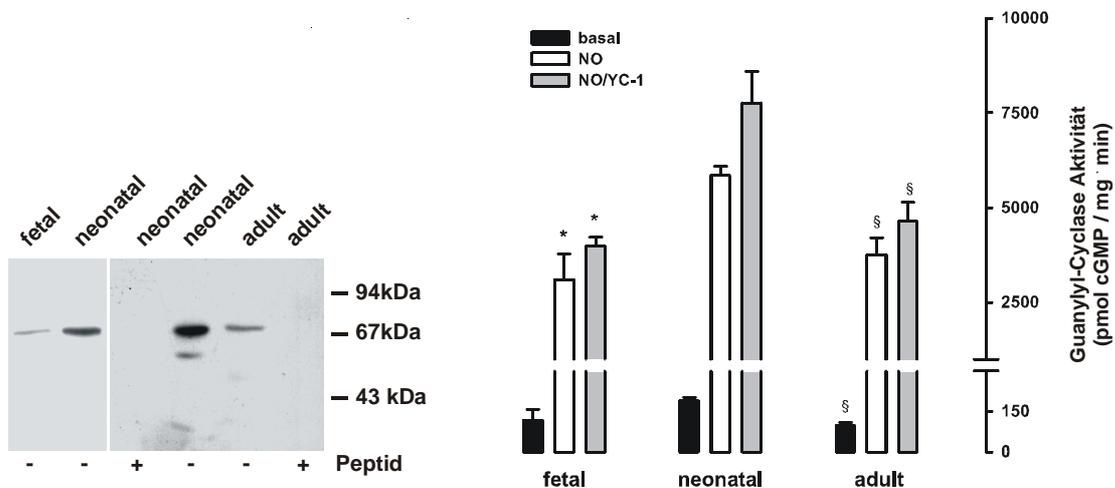


Abbildung 3 Vergleich der Expression der β_1 -Untereinheit und der Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Lungencytosol von fetalen, neonatalen und geschlechtsreifen Ratten. Immunoblot (links): 60 μ g cytosolisches Protein wurden pro Spur aufgetragen. Die Inkubation des Immunoblots mit dem Antikörper wurde in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) des zur Immunisierung verwendeten Peptids durchgeführt. Guanylyl-Cyclase-Aktivitätsmessungen (rechts): Cytosolische Fraktionen wurden unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (weiße Säulen) und NO/YC-1 stimulierten Bedingungen (graue Säulen) gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=4, *p<0,005 fetal gegenüber neonatal; §p<0,005 basal und NO-stimuliert, §p<0,01 NO/YC-1-stimuliert, geschlechtsreif gegenüber neonatal).

Die Expression der β_1 -Untereinheit war in neonataler Lunge höher als in fetaler Lunge bzw. Lunge von geschlechtsreifen Tieren (Abbildung 3 links). Das spezifische Signal wurde in Anwesenheit des zur Immunisierung verwendeten Peptids verdrängt. In Übereinstimmung mit den Western-blot Daten zeigten Messungen der Guanylyl-Cyclase-Aktivität (Abbildung 3 rechts) signifikant niedrigere Werte in fetalem gegenüber neonatalem Lungencytosol unter NO- und NO/YC-1-stimulierten Bedingungen ($p < 0,005$). Die Aktivität war auch in Lungencytosol von neonatalen gegenüber geschlechtsreifen Ratten unter allen experimentellen Bedingungen signifikant erhöht ($p < 0,005$ für basale and NO-stimulierte Aktivität; $p < 0,01$ für NO/YC-1-stimulierte Bedingungen).

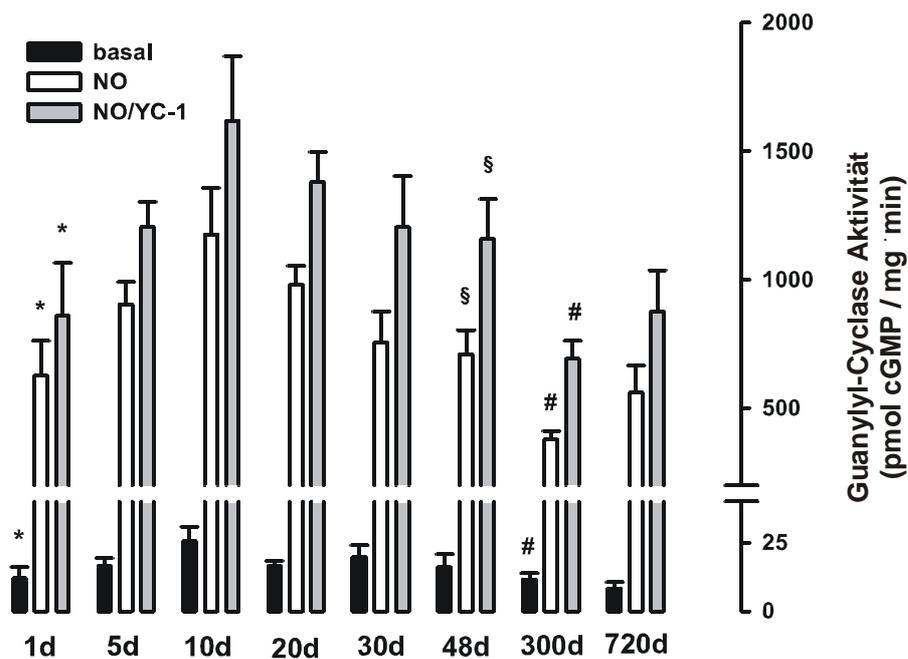


Abbildung 4 Guanylyl-Cyclase-Aktivität an Herzcytosolen von Ratten in der postnatalen Entwicklung angegeben in Tagen (d). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n=4$, * $p < 0,05$ basal, * $p < 0,025$ NO-stimuliert und NO/YC-1-stimuliert neonatal gegenüber 10 Tage alt; § $p < 0,01$ basal, § $p < 0,025$ NO-stimuliert, § $p < 0,05$ NO/YC-1-stimuliert, geschlechtsreif gegenüber 10 Tage alt; # $p < 0,025$ basal, # $p < 0,005$ NO-stimuliert und NO/YC-1-stimuliert, 300 Tage gegenüber 10 Tage alt).

Um zu untersuchen, ob es auch am Herzen zu einer entwicklungsabhängigen Regulation der löslichen Guanylyl-Cyclase kommt, wurden Herzen von 1-, 5-, 10-, 20-, 30-, 48-, 300-, und 720-Tage-alten Ratten gewonnen und Enzymaktivitätsbestimmungen und Western-blot Untersuchungen an diesen Proben parallel durchgeführt. Im Herzcytosol von 10 Tage alten Ratten war die Guanylyl-Cyclase-Aktivität (Abbildung 4) gegenüber neonatalen Ratten signifikant erhöht ($p < 0,05$ für basale; $p < 0,025$ für NO-stimulierte und NO/YC-1-stimulierte Bedingungen). Ebenso war die Aktivität im Herzcytosol von 10 Tage alten Ratten gegenüber 300 Tage alten Tieren unter basalen ($p < 0,025$), NO-stimulierten ($p < 0,005$) und NO/YC-1-stimulierten ($p < 0,025$) Bedingungen erhöht. Gegenüber 48 Tage alten Ratten fand sich bei 10 Tage alten Ratten eine signifikant höhere Aktivität unter NO-stimulierten ($p < 0,025$) und NO/YC-1-stimulierten Bedingungen ($p < 0,05$).

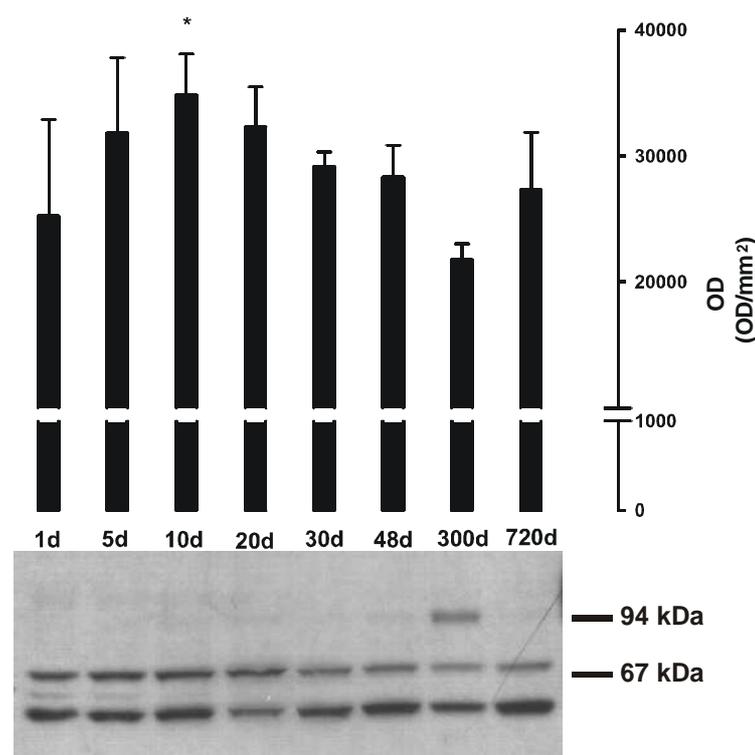


Abbildung 5 Western-blot Untersuchungen an Herzcytosolen von Ratten verschiedener Altersstufen angegeben in Tagen (d). Im unteren Abbildungsteil ist ein belichteter Röntgenfilm eines Immunoblots mit dem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit gezeigt. Im oberen Abbildungsteil sind die gemittelten optischen Dichten von $n=4$ unabhängigen Untersuchungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Es zeigte sich eine maximale Expression bei 10 Tage alten Tieren. *Die optischen Dichten unterschieden sich zwischen 300 Tage und 10 Tage alten Ratten signifikant ($p < 0,025$).

Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Herzcytosolen war fast 10-fach geringer als in altersentsprechenden Lungencytosolen. Dies steht in Übereinstimmung mit der beschriebenen hohen Expression der Guanylyl-Cyclase in der Lunge, die daher von verschiedenen Gruppen als Ausgangsmaterial für die Reinigung verwendet wird (Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). In Übereinstimmung mit der vergleichsweise geringeren Expression am Herzen, mussten Röntgenfilme länger belichtet werden, um spezifische Signale zu erhalten. Dies führte zum Erscheinen einer zusätzlichen Bande bei 60 kDa. Diese Bande war im Gegensatz zu der spezifischen Bande bei 70 kDa im Herzcytosol der Maus ebenfalls nachweisbar, was bestätigt, dass es sich bei der 60 kDa Bande um eine unspezifische Bande handelt (vergleiche Abbildung 5). Unterschiede in den Signalintensitäten der spezifischen 70 kDa Bande zwischen neonatalen und geschlechtsreifen Ratten waren weniger ausgeprägt, als in den entsprechenden Proben der Lunge. Die densitometrische Auswertung der belichteten Filme von vier Western-blots an unabhängig präpariertem Cytosol ergab eine maximale Expression bei 10 Tage alten Ratten und eine signifikant höhere Expression bei 10 Tage gegenüber 300 Tage alten Ratten ($p < 0,025$; Abbildung 5).

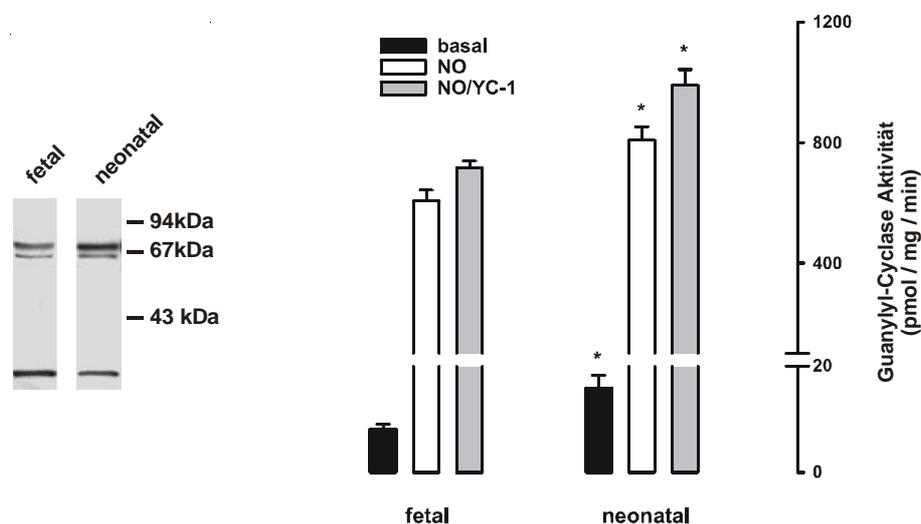


Abbildung 6 Untersuchungen an Herzcytosolen von fetalen und neonatalen Ratten. Links ist ein belichteter Röntgenfilm eines Immunoblots mit dem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit gezeigt. Rechts sind vergleichende Guanylyl-Cyclase-Aktivitätsbestimmungen unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (weiße Säulen) und NO/YC-1-stimulierten Bedingungen (graue Säulen) dargestellt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n=4$, * $p < 0,01$ basal und NO-stimuliert, * $p < 0,005$ NO/YC-1-stimuliert, fetal gegenüber neonatal).

Um zu prüfen, ob am Herzen ebenso wie das für die Lunge gezeigt werden konnte, Unterschiede in der Expression zwischen fetalen und neonatalen Herzen vorhanden sind, wurde eine zweite Serie von Untersuchungen durchgeführt. Der Vergleich von fetalen Herzen mit neonatalen Herzen ergab eine signifikant geringere Aktivität unter NO- und NO/YC-1-aktivierten Bedingungen (Abbildung 6). Wiederum deuteten Western-blot Untersuchungen auf eine geringere Expression der β_1 -Untereinheit hin.

Imunhistochemische Untersuchungen sollten klären, welche zelluläre Gewebsverteilung die β_1 -Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase am Herzen und der Lunge aufweist. Insbesondere sollte dabei auch untersucht werden, ob die quantitativen Veränderungen in der Expression des Enzyms mit einer unterschiedlichen Expression in verschiedenen Zelltypen einhergehen. Zunächst wurde die Spezifität des neu generierten Antikörpers für die Immunhistochemie getestet, indem die entsprechenden Experimente parallel an Proben der Ratte bzw. der Maus durchgeführt wurden. Die bei der Antikörperherstellung zur Immunisierung verwendete Peptidsequenz der β_1 -Untereinheit der Ratte, unterscheidet sich bei der Maus und dementsprechend erkennt der generierte Antikörper die β_1 -Untereinheit der Ratte bei 70 kDa nicht aber die der Maus (Abbildung 7). Zwei schwächere unspezifische Banden bei 60 kDa und 43 kDa waren bei beiden Spezies nachweisbar.

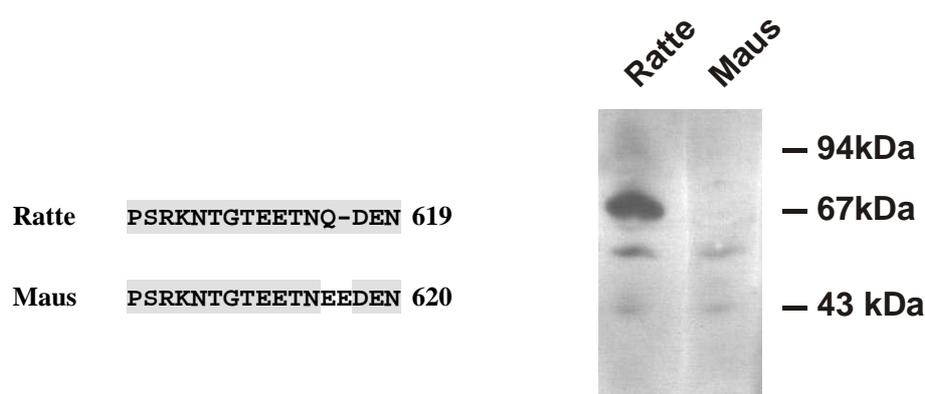


Abbildung 7 Vergleich des Aminosäureabschnitts der β_1 -Untereinheit von Ratte und Maus aus dem Bereich, der bei der Antikörperherstellung zur Immunisierung verwendet wurde (links). Vergleichende Western-blot Untersuchung von Lungencytosol von Ratte und Maus mit dem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit (rechts).

Der neue Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit wurde immunohistochemisch an Sagittalschnitten von Brustorganen von Rattenfeteten getestet. Hierbei ergab sich die deutlichste Immunoreaktivität in der Lunge (Abbildung 8a). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Daten, die zeigen, dass die Lunge höhere Expressionsspiegel der Guanylyl-Cyclase aufweist als andere Organe, weshalb dieses Gewebe auch als Ausgangsmaterial für die Reinigung des Enzyms verwendet wird (Denninger und Marletta 1999, Koesling und Friebe 1999). Wie erwartet ergaben sich keine spezifischen Signale in den entsprechenden Organen der Maus (Abbildung 8b). Auch in höherer Vergrößerung war in der Lunge der Maus keine Immunoreaktivität nachweisbar (Abbildung 8c). In fetalen Herzen waren endotheliale Zellen von kardialen Kapillaren immunoreaktiv. Kardiomyozyten zeigten nur eine schwache Färbung (Abbildung 8d). Glatte Muskelzellen waren in den untersuchten Schnitten von fetalem Herzen nicht nachweisbar, was in Übereinstimmung mit publizierten Daten steht (Hudlicka und Tyler 1986). In fetaler Lunge fand sich in der höheren Vergrößerung Immunoreaktivität in endothelialen Zellen von Kapillaren und glatten Muskelzellen von Arterien, nicht aber in den endothelialen Zellen der gleichen Arterien (Abbildung 8e). Bronchialepithel und die glatte Muskulatur der Bronchien zeigten keine Immunoreaktivität. Bei neonatalen Herzen war eine deutliche Immunoreaktivität in endothelialen Zellen von Venen und Kapillaren vorhanden. In den kardialen intramuralen Arterien ergab sich eine deutliche Expression in glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen der gleichen Gefäße (Abbildung 8f). Ähnlich fand sich bei neonatalen Tieren in Lungenarterien eine deutliche Anfärbung von glatten Muskelzellen und endothelialen Gefäßen der gleichen Gefäße (Abbildung 8g). Die Immunoreaktivität der endothelialen Zellen von Lungenarterien unterschied sich also zwischen fetalen und neonatalen Tieren (vergleiche Abbildung 8e und g). Die Untersuchung von Herz und Lunge von geschlechtsreifen Tieren zeigte eine starke Abnahme der Expression in glatten Muskelzellen und Zunahme in den auskleidenden endothelialen Zellen der gleichen Gefäße (Abbildung 8h und i).

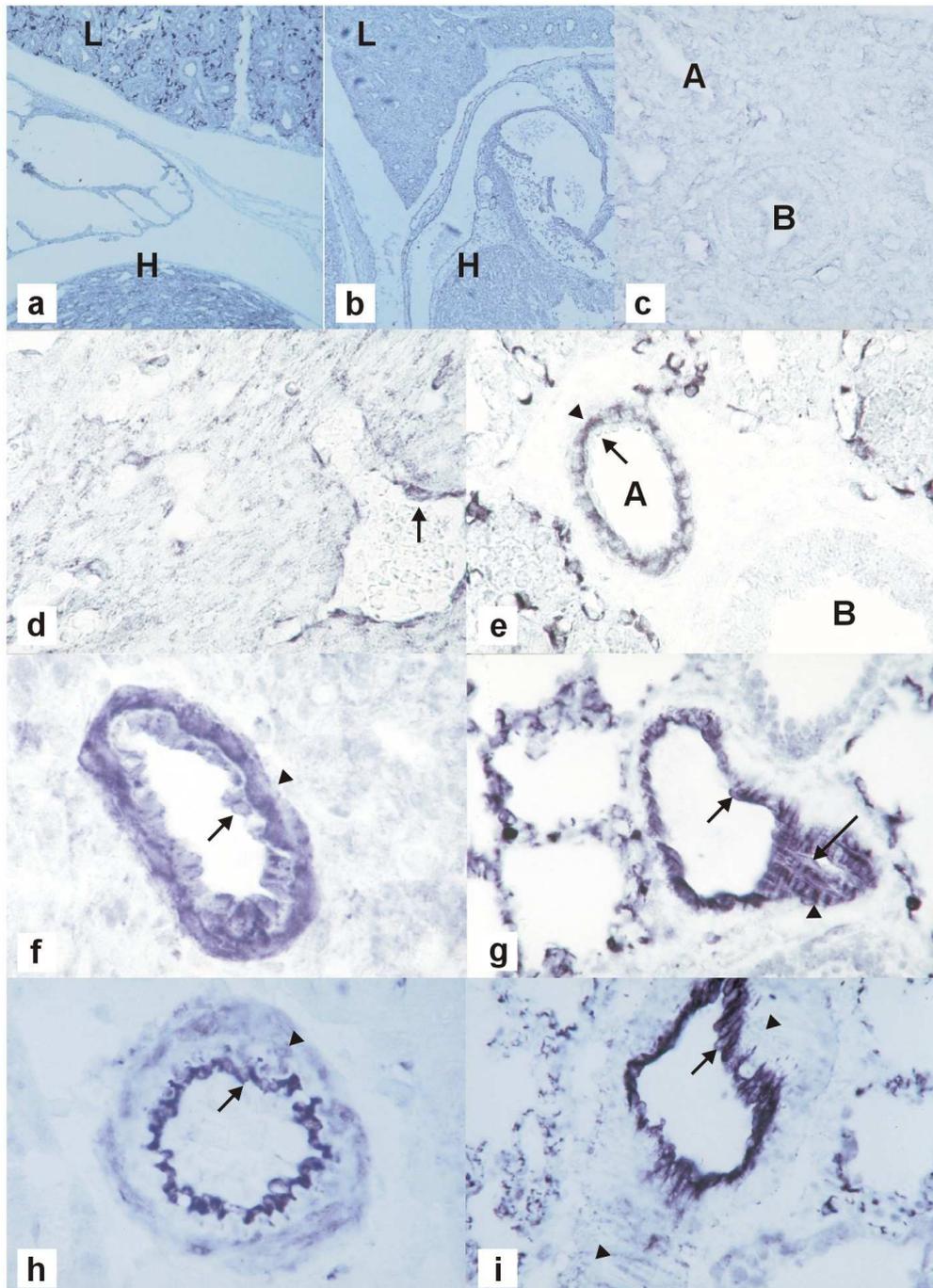


Abbildung 8 Immunhistochemische Untersuchung von Herz und Lungengeweben während der prä- und postnatalen Entwicklung mit dem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit der Ratte. Bild a: fetale Ratte, Sagittalschnitt von Brustorganen, Lunge (L), Herz (H), Vergrößerung x90. Bild b: fetale Maus, Sagittalschnitt von Brustorganen, Lunge (L), Herz (H), Vergrößerung x90. Bild c: fetale Maus, Lunge, Vergrößerung x900, Arterie (A), Bronchiole (B). Bild d: fetales Rattenherz, Vergrößerung x900, endotheliale Zellen von kardialen Gefäßen (Pfeil). Bild e: fetale Rattenlunge, Vergrößerung x900, arterielle (A) glatte Gefäßmuskulzelle (Pfeilspitze), arterielle endotheliale Zellen (Pfeil), Bronchiolus (B). Bild f: Rattenherz Tag 10. Bild g: Rattenlunge Tag 10. Bild h: Herz von geschlechtsreifer Ratte. Bild i: Lunge von geschlechtsreifer Ratten. Bild f-i: Vergrößerung x900, arterielle glatte Gefäßmuskulzelle (Pfeilspitzen), arterielle endotheliale Zellen (Pfeile).

In allen untersuchten Altersstufen war eine sehr schwache Immunreaktivität der Kardiomyozyten vorhanden, wobei mit immunhistochemischen Methoden nicht zu entscheiden war, ob es sich dabei um eine spezifische Färbung oder um Hintergrund handelte. Um der Frage nachzugehen, ob Kardiomyozyten Guanylyl-Cyclase-Aktivität aufweisen, wurden diese Herzmuskelzellen präpariert und Enzymaktivitätsbestimmungen an Cytosol aus diesen Zellen im Vergleich zu Gesamtherzcytosol gemessen. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt, die deutlich nachweisbare, aber im Vergleich zum Gesamtherzen niedrigere Guanylyl-Cyclase-Aktivität aufwiesen. Dies steht in Übereinstimmung mit Western-blot Untersuchungen an Cytosol aus isolierten Kardiomyozyten, an denen eine im Vergleich zu Gesamtherzcytosol sehr schwache Bande für die β_1 -Untereinheit nur unter optimalen Versuchsbedingungen nachweisbar war. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kardiomyozytenpräparation und immuncytochemische Untersuchungen der Zellpräparation stellten sicher, dass die Guanylyl-Cyclase-Aktivität tatsächlich auf Kardiomyozyten und nicht auf andere kontaminierende Zelltypen zurückzuführen ist.

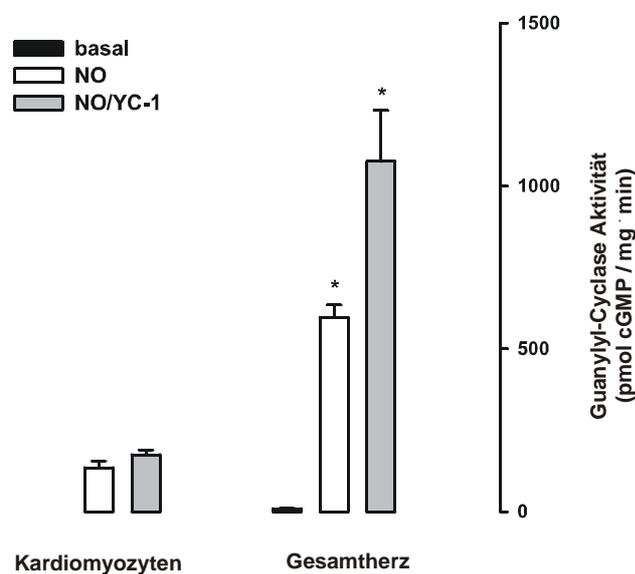


Abbildung 9 Vergleich der Guanylyl-Cyclase Enzymaktivität im Cytosol aus Kardiomyozyten und Gesamtherz unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (weiße Säulen) und NO/YC-1 stimulierten Bedingungen (graue Säulen). Die Unterschiede in der Guanylyl-Cyclase-Aktivität zwischen Kardiomyozyten und Gesamtherz waren zwischen Kardiomyozyten und Gesamtherz unter NO-stimulierten und NO/YC-1-stimulierten Bedingungen signifikant unterschiedlich. Mittelwerte \pm SEM sind angegeben (n=4, *p<0,0005 NO-stimuliert, *p<0,005 NO/YC-1-stimuliert).

3.2 Expression und Regulation der β_1 -Untereinheit in der Dura mater Glyceroltrinitrat-behandelter Ratten gegenüber Kontroll-Tieren

Die Expression der β_1 -Untereinheit wurde in der Dura mater von Glyceroltrinitrat-behandelten und nicht-behandelten Ratten mit Hilfe von Western-blots untersucht. Abbildung 10 zeigt repräsentative Immunoblots. Es ist eine einzelne Bande in Höhe von 70 kDa zu erkennen. Dies stimmt gut mit dem Molekulargewicht der β_1 -Untereinheit der Ratte überein. In Übereinstimmung mit der cytoplasmatischen Lokalisation des Enzyms zeigte sich dieses Signal im Cytosol, nicht aber in Membranen. 30 Minuten nach Behandlung mit Glyceroltrinitrat war eine Verstärkung dieses Signals in der cytosolischen Fraktion gegenüber nicht-behandelten Tieren sichtbar. 60 Minuten nach Behandlung ergab sich kein Unterschied mehr in der Expressionsstärke der β_1 -Untereinheit im Cytosol der Dura mater von behandelten gegenüber nicht-behandelten Ratten.

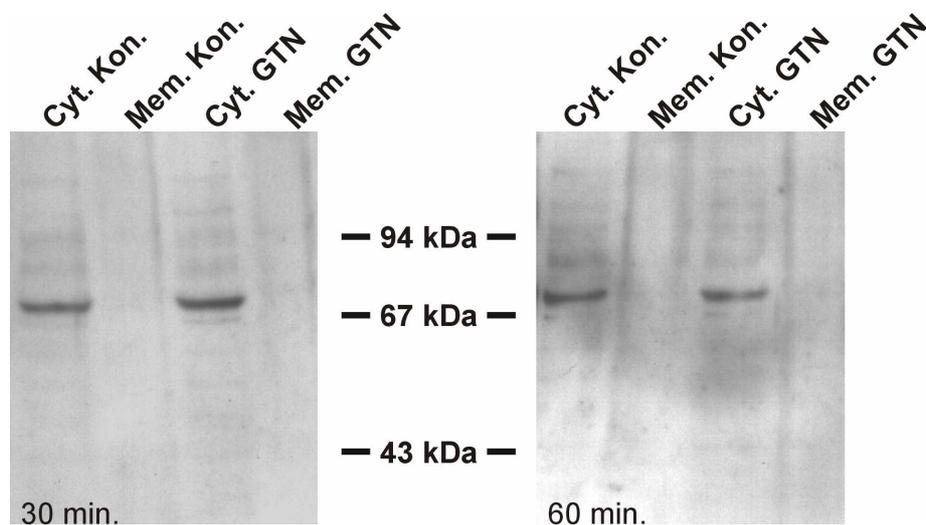


Abbildung 10 Untersuchungen an Cytosolen (Cyt.) und Membranen (Mem.) der Dura mater von Glyceroltrinitrat-behandelten (GTN) Ratten nach 30 (links) und 60 (rechts) Minuten im Vergleich mit Kontrolltieren (Kon.). Dargestellt ist ein belichteter Röntgenfilm eines Immunoblots mit dem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit.

Um dies weitergehend zu untersuchen, wurden Aktivitätsmessungen der löslichen Guanylyl-Cyclase im Cytosol der Dura mater von Glyceroltrinitrat-behandelten Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zu nicht-behandelten Ratten durchgeführt (Abbildung 11). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität nach 30 Minuten Glyceroltrinitrat-Behandlung sowohl unter basalen als auch unter NO-stimulierten bzw. NO/YC-1-stimulierten Bedingungen verglichen mit den Kontrolltieren. Diese Aktivitätszunahme 30 Minuten nach Glyceroltrinitrat-Behandlung war nach 60 Minuten nicht mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt ergaben sich wieder mit denen der Kontrolltieren vergleichbare Werte.

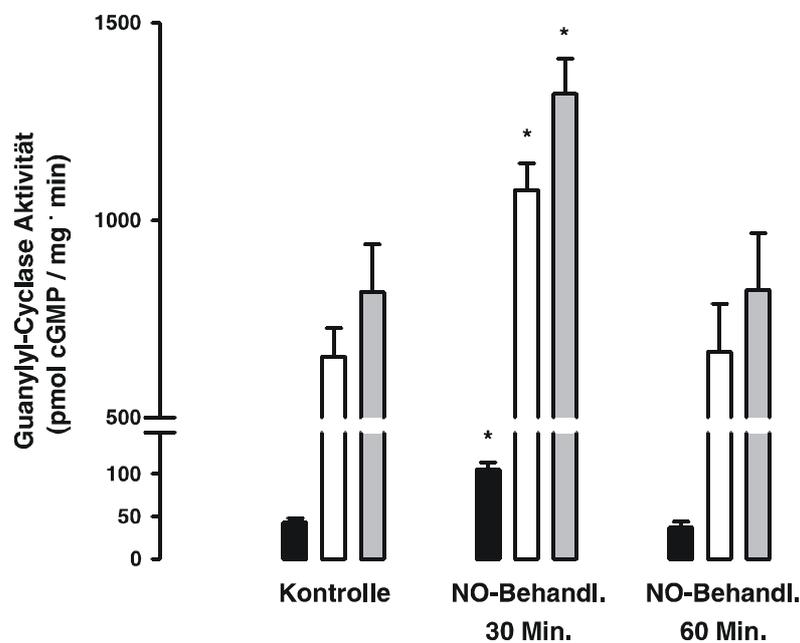


Abbildung 11 Messungen der Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Cytosol der Dura mater von Glyceroltrinitrat-behandelten Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich mit Kontrolltieren unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (weiße Säulen) und NO/YC-1 stimulierten Bedingungen (graue Säulen). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=5, *p<0,05 nach 30 Minuten Glyceroltrinitrat-Behandlung gegenüber Kontrolltiere).

Um die zelluläre Lokalisation der löslichen Guanylyl-Cyclase an der Dura mater zu bestimmen wurden immunhistochemische Untersuchungen mit einem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit in der Dura mater Glyceroltrinitrat-behandelter und nicht-behandelter Ratten durchgeführt. Es zeigte sich eine Immunreaktion im Cytosol der Pericyten duraler Gefäße

von nicht-behandelten Ratten (Abbildung 12-1a). 30 Minuten nach Beginn der Glyceroltrinitrat-Behandlung war dieses Signal in den Pericyten deutlich stärker, verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 12-1b). Auch bei elektronenmikroskopischer Vergrößerung zeigte sich eine deutlich verstärkte Immunreaktion im Cytosol der Pericyten nach Glyceroltrinitrat-Behandlung (Abbildung 12-1c,d).

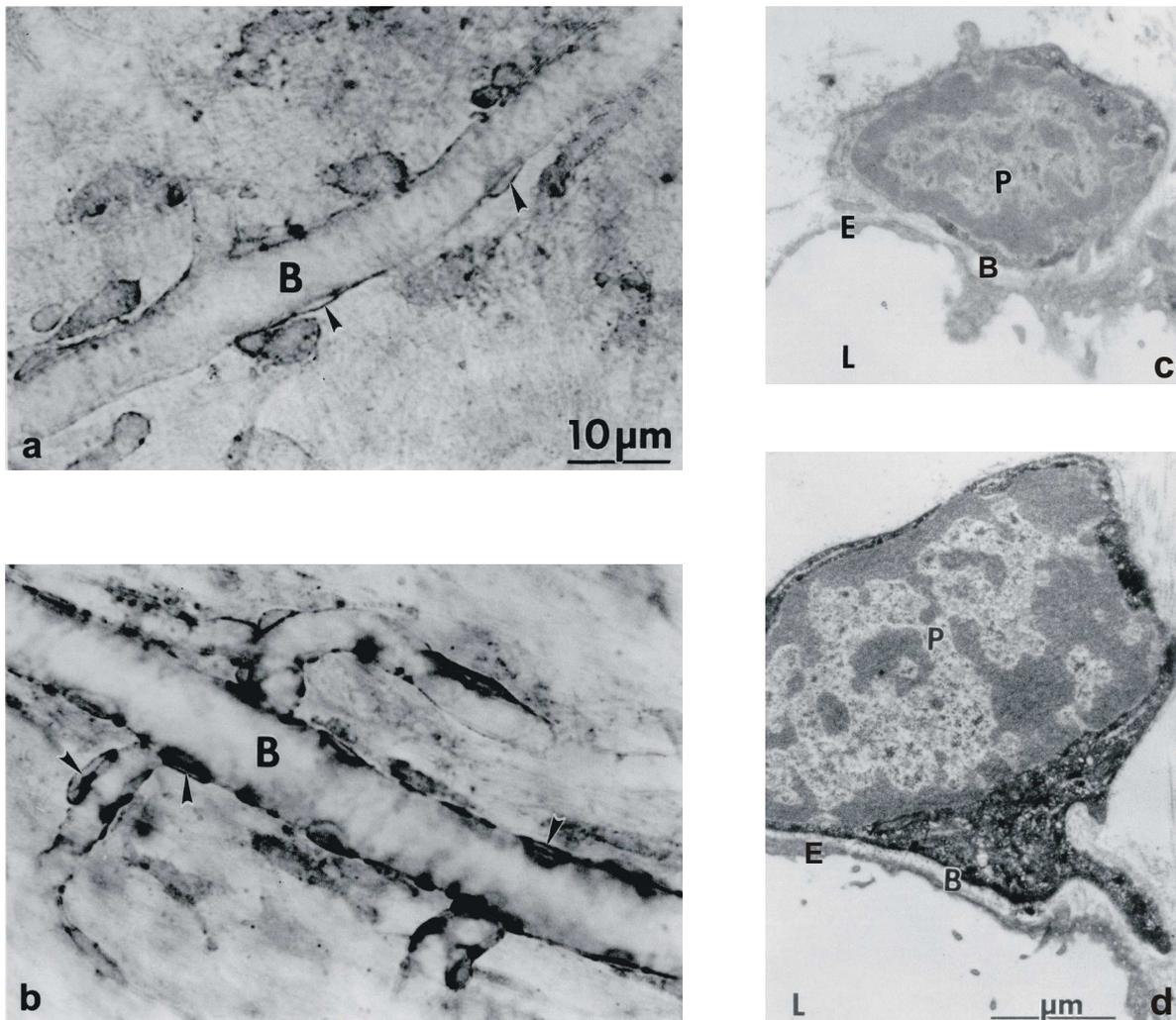


Abbildung 12-1 Immunhistochemische Untersuchung der Guanylyl-Cyclase in der Dura mater. Bild a: Pfeilspitzen weisen auf Pericyten, B: Blutgefäß, Kontrolle. Bild b: 30 min nach Glyceroltrinitrat-Behandlung. Bild c: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Pericyten, P: Nucleus, E: Endothelzelle, L: Lumen eines Blutgefäßes, B: Basalmembran, Kontrolle. Bild d: 30 min nach Glyceroltrinitrat-Behandlung.

Weitere immunhistochemische Untersuchungen zeigten auch in Mastzellen und Histiocyten in der Dura mater unbehandelter Tiere eine schwache Reaktion (Abbildung 12-2a). 30 min nach Glyceroltrinitrat-Behandlung war auch hier eine deutlich stärkere Immunoreaktion zu sehen (Abbildung 12-2b).

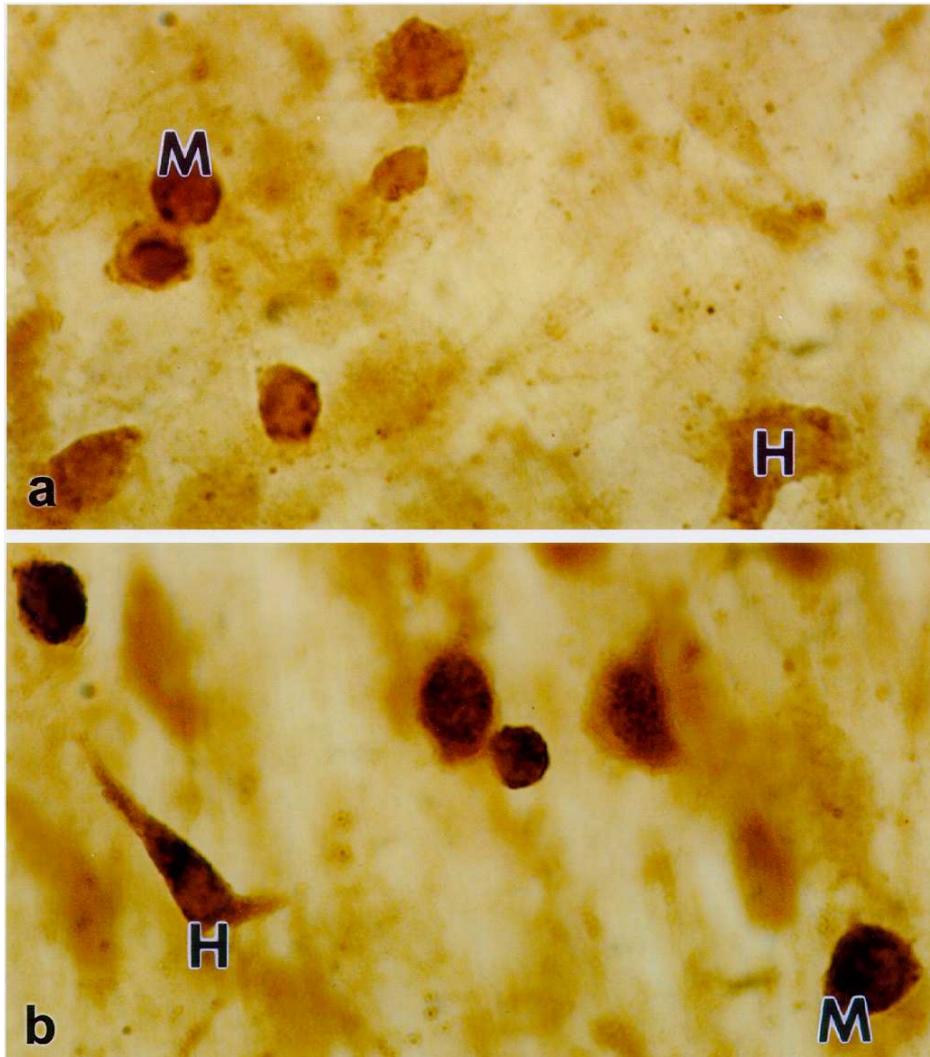


Abbildung 12-2 Immunhistochemische Untersuchung der Guanylyl-Cyclase in der Dura mater. Bild a: M: Mastzelle, H: Histiocyt, Kontrolle. Bild b: 30 min nach Glyceroltrinitrat-Behandlung.

3.3 Untersuchungen der Eigenschaften sowie der subzellulären Lokalisation der β_1 -Untereinheit in humanen Thrombozyten nach Aggregation

Die Aktivität der Guanylyl-Cyclase wurde in Cytosol, in Membranen niedriger Dichte, Membranen hoher Dichte und in Material sehr hoher Dichte menschlicher Thrombozyten bestimmt. Nicht-aggregierte (Kontrolle) und aggregierte Thrombozyten wurden unter identischen Bedingungen unter Verwendung von Mg^{2+} als Kofaktor verglichen. Die Enzymaktivität wurde unter basalen, NO-stimulierten und NO/YC-1-stimulierten Bedingungen bestimmt.

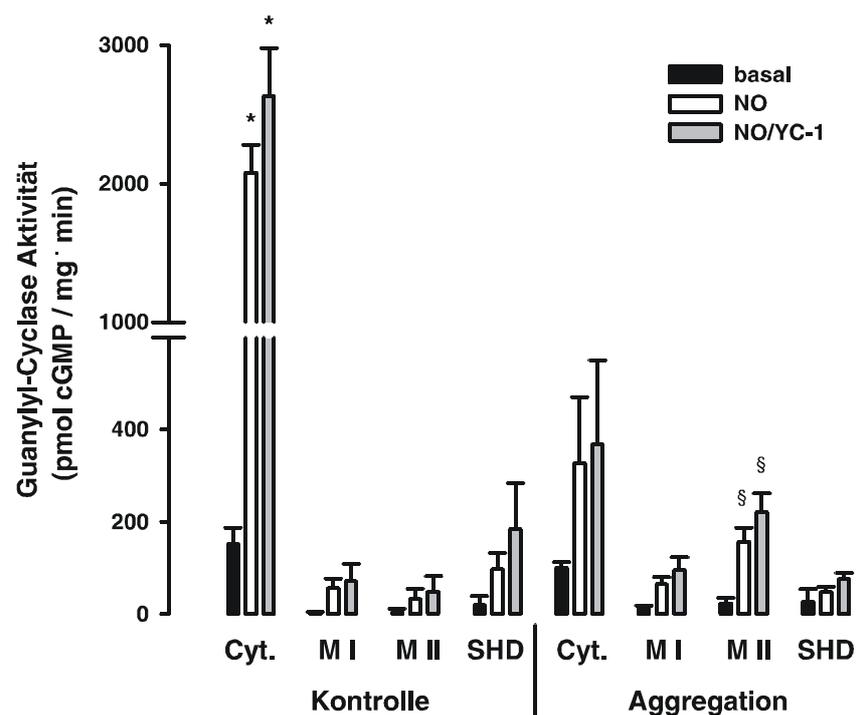


Abbildung 13 Messungen der Guanylyl-Cyclase-Aktivität mit Mg^{2+} als Kofaktor in Cytosol (Cyt.), Membranen niedriger Dichte (M I), Membranen hoher Dichte (M II) und Material sehr hoher Dichte (SHD) aus Kontroll- (links) und aggregierten (rechts) Thrombozyten unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (weiße Säulen) und NO/YC-1 stimulierten Bedingungen (graue Säulen). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=3, *p<0,005 NO-stimuliert und NO/YC-1-stimuliert, Cytosol Kontrolle gegenüber Aggregation; §p<0,025 NO-stimuliert und NO/YC-1-stimuliert, hoch dichte Membranen Kontrolle gegenüber Aggregation).

Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, führte die durch ADP induzierte Thrombozytenaggregation zu einer signifikanten Erniedrigung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität in der cytosolischen Fraktion, wohingegen die Enzymaktivität in der Membranfraktion M II signifikant anstieg. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Translokation des Enzyms von der cytosolischen zur Membranfraktion M II während des Aggregationsvorganges.

Um die Lokalisation der Guanylyl-Cyclase in den verschiedenen Fraktionen aggregierter und nicht-aggregierter Thrombozyten weitergehend zu untersuchen, wurden Western-blots mit einem Antikörper, der gegen die β_1 Untereinheit gerichtet war, durchgeführt. Wie in Abbildung 14 (oben) gezeigt, ist das Guanylyl-Cyclase- β_1 -spezifische Signal in der cytosolischen Fraktion aggregierter Thrombozyten schwächer und in der Fraktion hoch dichter Membranen stärker als in der entsprechenden Fraktion nicht-aggregierter Thrombozyten.

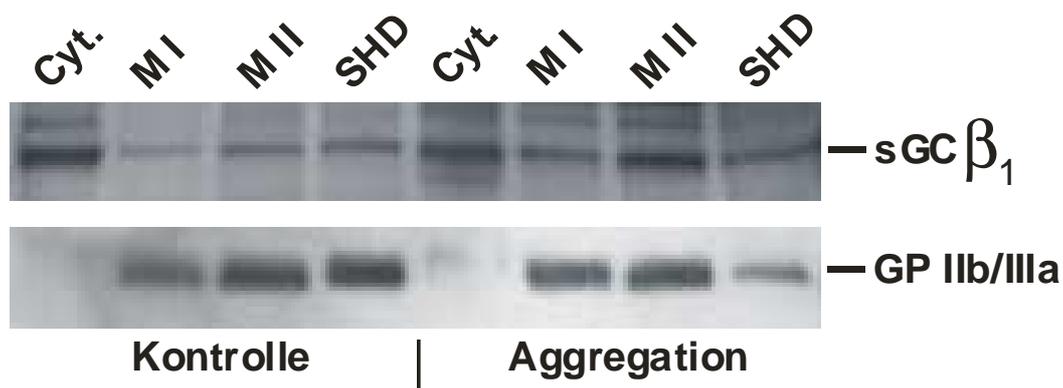


Abbildung 14 Vergleich der Guanylyl-Cyclase- β_1 (oben) und GP IIb / IIIa (unten) Expression mittels Western-blot Untersuchungen an Cytosol (Cyt.), Membranen niedriger Dichte (M I), Membranen hoher Dichte (M II) und Material sehr hoher Dichte (SHD) aus Kontroll- (links) und aggregierten (rechts) Thrombozyten. Die erwarteten spezifischen Signale sind für Guanylyl-Cyclase- β_1 (sGC) bei 70 kDa und für GP IIb / IIIa bei 135 kDa sichtbar.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Western-blots stimmen mit den weiter oben beschriebenen Ergebnissen der Guanylyl-Cyclase-Aktivitätsmessungen überein und deuten daraufhin, dass die Guanylyl-Cyclase durch die ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten von der cytosolischen zur Membranfraktion M II transloziert. Western-blot Untersuchungen des transmembranösen GP IIb / IIIa Rezeptors (Abbildung 14, unten) zeigen Signale in allen Fraktionen mit Ausnahme der cytosolischen Fraktion. In der Fraktion des sehr hoch dichten Materials aus Kontroll-Thrombozyten, welche am wahrscheinlichsten aus cytoskele-

talen Elementen und nicht aufgeschlossenen Thrombozyten besteht, war das Signal stärker als in den aggregierten Thrombozyten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer höheren Guanylyl-Cyclase-Aktivität in der Fraktion sehr hoch dichten Materials aus Kontroll-Thrombozyten im Vergleich mit aggregierten und deutet auf einen höheren Anteil nicht aufgebrochener Thrombozyten bei Kontrollthrombozyten hin. Um die Veränderungen der Enzymaktivität nach ADP-induzierter Aggregation weitergehend zu untersuchen, wurden die Guanylyl-Cyclase-Aktivitätsmessungen mit Mn^{2+} als Kofaktor wiederholt (Abbildung 15). Übereinstimmend mit den Ergebnissen bei Verwendung von Mg^{2+} als Kofaktor zeigte sich eine signifikant erhöhte Guanylyl-Cyclase-Aktivität in der Fraktion hoch dichter Membranen aggregierter Thrombozyten im Vergleich mit nicht-aggregierten Thrombozyten auch bei Verwendung von Mn^{2+} als Kofaktor.

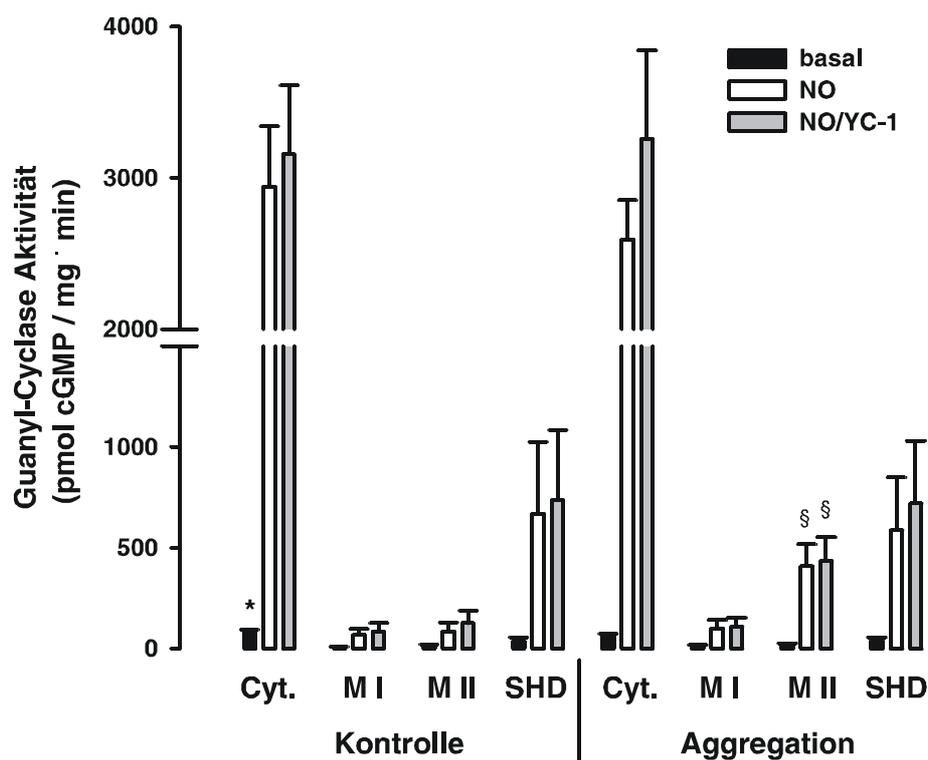


Abbildung 15 Messungen der Guanylyl-Cyclase-Aktivität mit Mn^{2+} als Kofaktor in Cytosol (Cyt.), Membranen niedriger Dichte (M I), Membranen hoher Dichte (M II) und Material sehr hoher Dichte (SHD) aus Kontroll- (links) und aggregierten (rechts) Thrombozyten unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (weiße Säulen) und NO/YC-1 stimulierten Bedingungen (graue Säulen). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=3, *p<0,05 basal, Cytosol Kontrolle gegenüber Aggregation; §§p<0,05 NO-stimuliert und NO/YC-1-stimuliert, hoch dichte Membranen Kontrolle gegenüber Aggregation).

Zusammengenommen mit einer Erniedrigung der Aktivität im Cytosol unter basalen Bedingungen mit Mn^{2+} als Kofaktor steht dies im Einklang mit einer Translokation der Guanylyl-Cyclase vom Cytosol in die Fraktion hoch dichter Membranen während des Aggregationsvorganges. Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen mit Mg^{2+} als Kofaktor zeigte sich aber kein Unterschied zwischen aggregiertem und nicht-aggregiertem Thrombozytencytosol unter stimulierten Bedingungen. Diese unterschiedlichen Eigenschaften des Enzyms in aggregiertem und nicht-aggregiertem Thrombozytencytosol gegenüber den Kofaktoren Mg^{2+} und Mn^{2+} deuten auf eine mögliche Modifikation der Guanylyl-Cyclase während des ADP-induzierten Aggregationsvorganges in menschlichen Thrombozyten hin.

Um festzustellen, ob sich die NO-Sensitivität der Guanylyl-Cyclase durch die ADP-induzierte Aggregation in Thrombozyten verändert, wurden mit dem NO-Donor DEA/NO Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt. Im Cytosol aggregierter und Kontroll-Thrombozyten wurde parallel unter Verwendung verschiedener NO-Konzentrationen ($0,1 \mu M - 100 \mu M$) mit Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor gemessen. Repräsentative Kurven sind in Abbildung 16 (Mg^{2+} als Kofaktor) und Abbildung 17 (Mn^{2+} als Kofaktor) gezeigt.

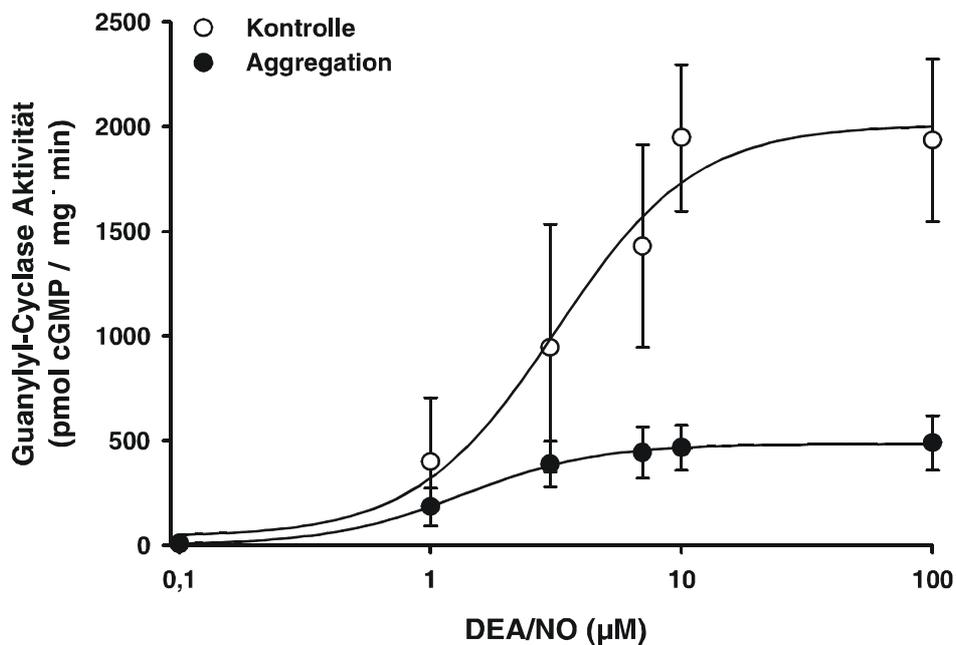


Abbildung 16 DEA/NO-Dosis-Wirkungs-Kurve mit Mg^{2+} als Kofaktor im Cytosol aggregierter und nicht-aggregierter Thrombozyten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus fünf eigenständigen Experimenten.

Bei Verwendung von Mg^{2+} als Kofaktor führte die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation zu einer signifikanten Erniedrigung der EC_{50} -Werte im Cytosol aggregierter gegenüber nicht-aggregierten Thrombozyten (Kontrolle $1,40 \mu M \pm 0,42$; Aggregation $0,62 \mu M \pm 0,20$; $p < 0,05$; $n = 5$). Im Gegensatz hierzu zeigte sich kein signifikanter Unterschied der EC_{50} -Werte im Cytosol von aggregierten und nicht-aggregierten Thrombozyten bei Verwendung von Mn^{2+} (Kontrolle $1,92 \mu M \pm 0,74$; Aggregation $1,25 \mu M \pm 0,53$; $p < 0,25$; $n = 5$).

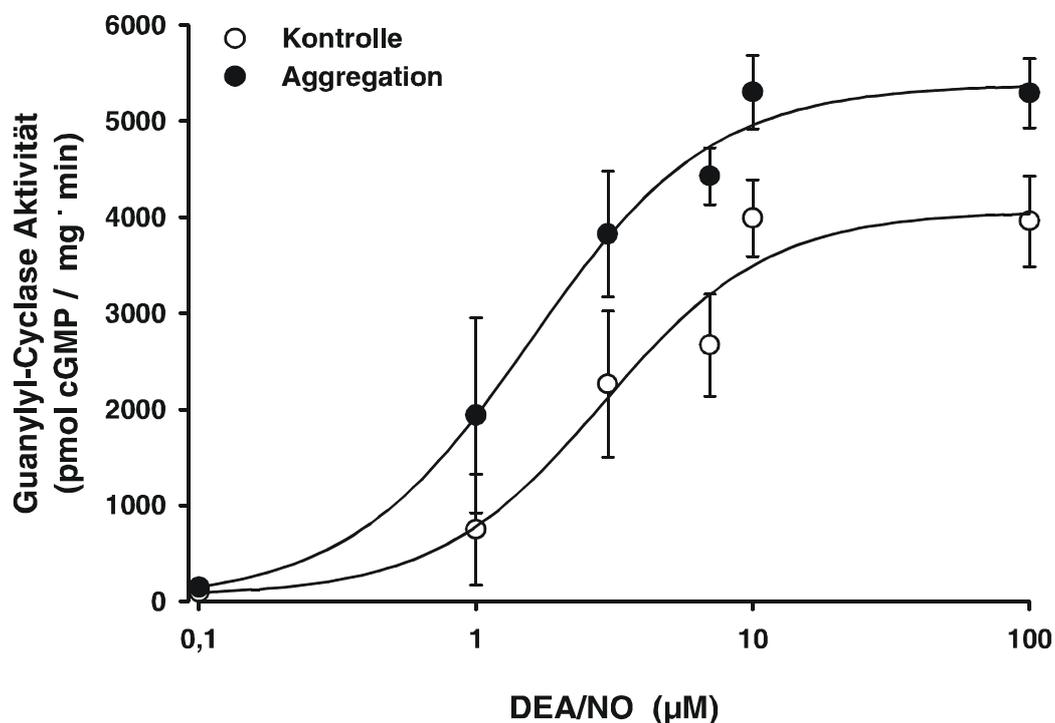


Abbildung 17 DEA/NO-Dosis-Wirkungs-Kurve mit Mn^{2+} als Kofaktor im Cytosol aggregierter und nicht-aggregierter Thrombozyten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus fünf eigenständigen Experimenten.

Um die Veränderungen der Enzymeigenschaften während der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation zu untersuchen, wurde die Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Gegenwart von Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor bestimmt.

Die Mittelwerte der V_{\max} - und K_m -Werte aus drei eigenständigen Experimenten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 K_m - und V_{\max} -Werte in aggregierten gegenüber Kontroll-Thrombozyten unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen mit Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor.

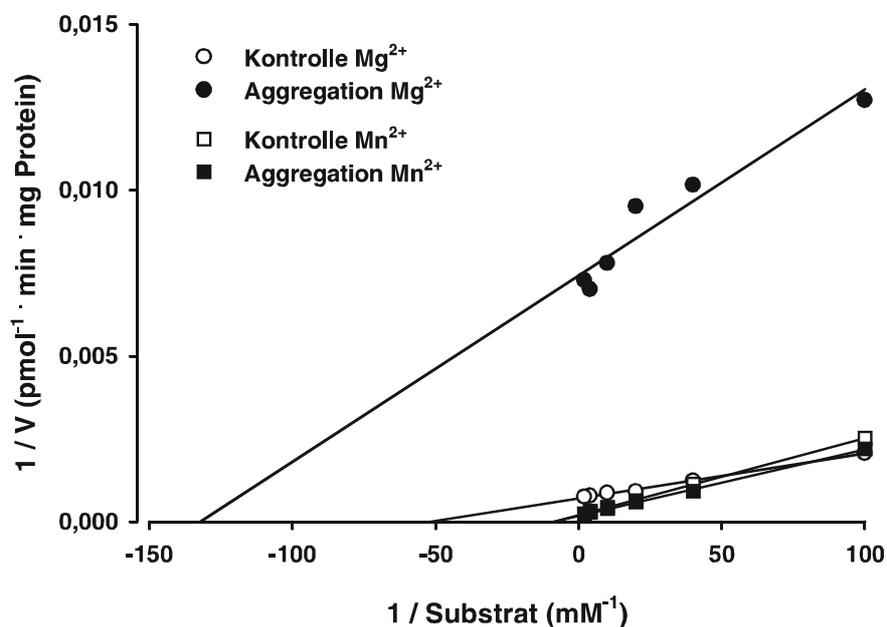
basal [pmol cGMP / mg · min]	$V_{\max} Mg^{2+}$	$K_m Mg^{2+}$	$V_{\max} Mn^{2+}$	$K_m Mn^{2+}$
Kontrolle ± SEM	5 ± 3	59 ± 16	208 ± 52	130 ± 14
Aggregation ± SEM	2 ± 0.3	55 ± 17	119 ± 4	51 ± 2 *
NO-stimuliert [pmol cGMP / mg · min]	$V_{\max} Mg^{2+}$	$K_m Mg^{2+}$	$V_{\max} Mn^{2+}$	$K_m Mn^{2+}$
Kontrolle ± SEM	1900 ± 260	22 ± 3	4222 ± 416	101 ± 9
Aggregation ± SEM	262 ± 78 §	12 ± 6	4634 ± 401	120 ± 31

* $p < 0.005$; § $p < 0.005$.

In Abbildung 18 A sind die Daten bei NO-stimulierten Bedingungen als Lineweaver-Burk Diagramm dargestellt. Es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des V_{\max} -Wertes in aggregierten im Vergleich zu nicht-aggregiertem Thrombozytencytosol. Im Gegensatz hierzu war kein Unterschied bei Verwendung von Mn^{2+} als Kofaktor zu erkennen. Die diskreten Veränderungen der K_m -Werte sind nicht signifikant.

Abbildung 18 B zeigt die entsprechenden Daten der Untersuchungen unter basalen Bedingungen. Neben einer signifikanten Erniedrigung der K_m -Werte mit Mn^{2+} als Kofaktor, konnten keine weiteren signifikanten Veränderungen der Enzymkinetik unter basalen Bedingungen nach Aggregation festgestellt werden.

A



B

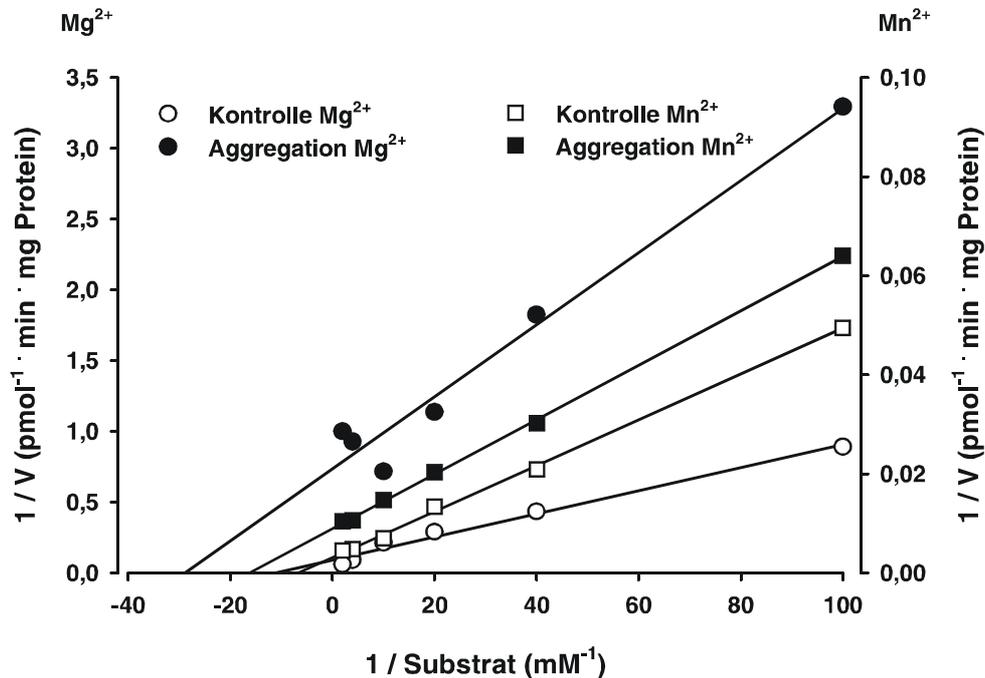


Abbildung 18 A Lineweaver-Burk Kurve bei basalen Bedingungen im Cytosol aggregierter gegenüber Kontroll-Thrombozyten mit Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor. Die Substratkonzentration reichte von 0,01 bis 0,5 mM, bei einer konstanten Konzentration des divalenten Kations von 2,5 mM. B Lineweaver-Burk Kurve unter NO-stimulierten Bedingungen.

Unter NO-stimulierten Bedingungen zeigten sich drastische Unterschiede hinsichtlich des Verhaltens der Guanylyl-Cyclase gegenüber den Kofaktoren Mg^{2+} und Mn^{2+} , in einer Konzentration von 3 mM, im Cytosol von aggregierten gegenüber nicht-aggregierten Thrombozyten. Um dieses Phänomen weitergehend zu untersuchen, wurden Konzentrationswirkungsexperimente für Mg^{2+} und Mn^{2+} unter NO-stimulierten Bedingungen (100 μ M DEA/NO) durchgeführt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des EC_{50} -Wertes für Mg^{2+} nach ADP-induzierter Thrombozytenaggregation (Abbildung 19 A; Kontrolle 2,9 mM \pm 0,5; Aggregation 10,7 mM \pm 1,0; $p < 0,05$; $n = 3$). Im Gegensatz hierzu konnte kein signifikanter Unterschied der EC_{50} -Werte für Mn^{2+} festgestellt werden (Abbildung 19 B; Kontrolle 0,5 mM \pm 0,006; Aggregation 0,6 mM \pm 0,04; $p < 0,1$; $n = 3$). Beim Vergleich mit physiologisch auftretenden Mg^{2+} -Konzentrationen ist von entscheidender Bedeutung, dass 0,5 mM Mg^{2+} mit 0,5 mM GTP des Reaktionsmixes komplexieren.

A

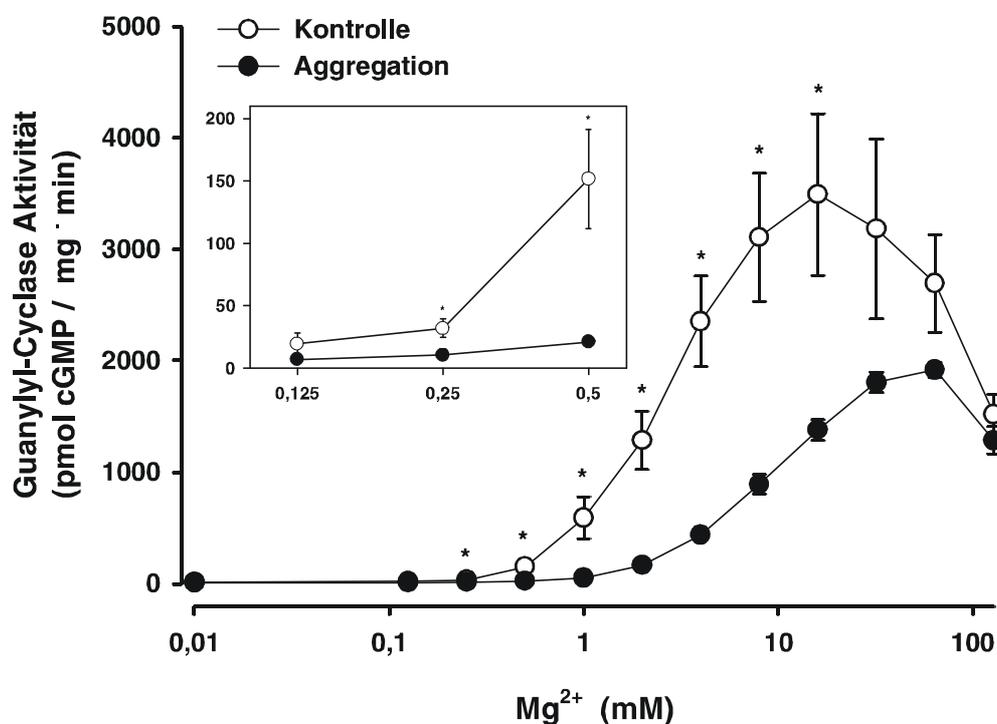


Abbildung 19 A Messungen der Guanylyl-Cyclase-Aktivität bei unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen, von 0 bis 128 mM, unter NO-stimulierten Bedingungen (100 μ M DEA/NO). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus drei eigenständigen Experimenten.

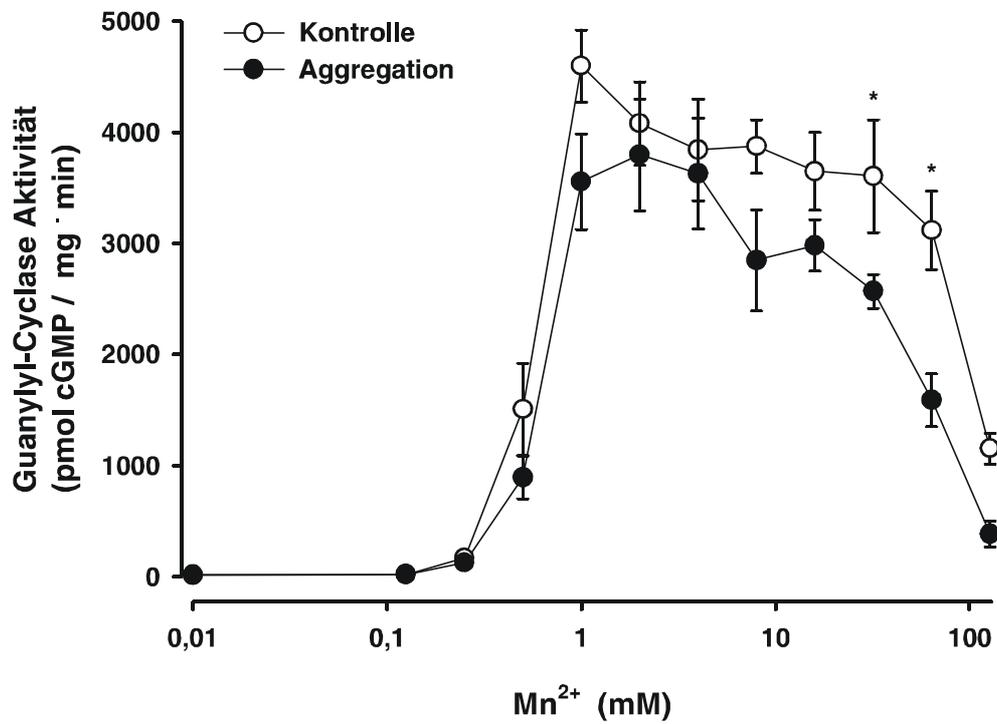
B

Abbildung 19 B Messungen der Guanylyl-Cyclase-Aktivität bei unterschiedlichen Mn²⁺-Konzentrationen, von 0 bis 128 mM, unter NO-stimulierten Bedingungen (100 µM DEA/NO). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus drei eigenständigen Experimenten.

4 Diskussion

Trotz der Bedeutung der löslichen Guanylyl Cyclase als Rezeptor für NO-freisetzende Pharmaka, ist über die Expression und Regulation des Enzyms in vivo noch relativ wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen das NO-sensitive Enzym am Herzkreislaufsystem näher zu charakterisieren. Nachfolgend sind zunächst die wesentlichen Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen aufgelistet, die anschließend im einzelnen diskutiert werden:

- Während der Perinatalzeit kommt es am Herzen und der Lunge der Ratte zu einer erhöhten Guanylyl-Cyclase Enzymaktivität. Dies korreliert mit einer verstärkten Expression der β_1 -Untereinheit.
- Im Rahmen der postnatalen Entwicklung kommt es bei der Ratte in kardialen und pulmonalen arteriellen Gefäßen zu einer Verschiebung der Expression von glatten Gefäßmuskelzellen zu Endothelzellen.
- Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase-Aktivität am Herzen geht zu einem großen Teil auf das Gefäßsystem zurück. Kardiomyozyten zeigen eine schwächere, aber deutliche nachweisbare Guanylyl-Cyclase-Aktivität und Expression.
- Experimentelle Behandlung von Ratten mit Glyceroltrinitrat führt zu einer reversiblen Expressions- und Aktivitätszunahme der Guanylyl-Cyclase an der Dura mater.
- Aggregation menschlicher Thrombozyten bewirkt einen deutlichen Aktivitätsverlust der Guanylyl-Cyclase und zu grundlegenden Veränderungen der kinetischen Eigenschaften des Enzyms.
- Durch den Aggregationsprozeß menschlicher Thrombozyten kommt es zur Translokation der Guanylyl-Cyclase vom Cytosol zur Plasmamembran.
- Das Verhalten der Guanylyl-Cyclase gegenüber den divalenten Kationen Mg^{2+} und Mn^{2+} in menschlichen Thrombozyten unterscheidet sich deutlich nach ADP-induzierter Thrombozytenaggregation.

Die lösliche Guanylyl-Cyclase ist der wichtigste Rezeptor für endogen synthetisiertes NO und für die bei der Therapie von Angina pectoris verwendeten NO-freisetzenden Pharmaka. Die Entwicklung von selektiven Substanzen für die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase in spezifischen Organen oder Zelltypen ist von großem pharmakologischem Interesse. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen die Rolle der löslichen Guanylyl-Cyclase als Rezeptor für die erwünschten und unerwünschten Wirkungen von NO-freisetzenden Substanzen wie Glyceroltrinitrat näher zu charakterisieren. Entsprechend wurden einerseits Untersuchungen am Herzen und an Thrombozyten durchgeführt, wo die lösliche Guanylyl-Cyclase an der Vermittlung des antianginösen bzw. antiaggregatorischen Effekts von Glyceroltrinitrat beteiligt ist. Andererseits wurden Untersuchungen an der schmerzempfindlichen Dura mater durchgeführt, wo Glyceroltrinitrat über bisher unbekannte Mechanismen Kopfschmerzen auslöst.

4.1 Aktivität und Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase während der postnatalen Entwicklung im Herzkreislaufsystem

In verschiedenen Studien wurde die Expression der einzelnen NO-Synthase-Isoformen (neuronal, induzierbare und endotheliale Form) in den verschiedensten Zelltypen des Myokards untersucht (Übersicht bei Balligand 1999 oder Canty 2000). Konstitutive Expression konnte für die NO-Synthase in Endothelzellen (endotheliale Form) und Kardiomyozyten (endotheliale und neuronale Form) gezeigt werden. Im Gegensatz hierzu ist über die Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase in den unterschiedlichen Zelltypen des Myokards noch relativ wenig bekannt. So ist unklar ob oder in welchem Ausmaß die lösliche Guanylyl-Cyclase in Kardiomyozyten exprimiert wird (Wegener et al. 1999). Dies ist von besonderem Interesse, da in einigen Studien die löslichen Guanylyl-Cyclase in Kardiomyozyten in Zusammenhang mit verschiedenen auf NO basierenden und cGMP-abhängigen Effekten am Myokard gebracht wird. Dazu zählt die Modulation der kardialen Kontraktilität (Vila-Petroff et al. 1999), kardioprotektive Effekte nach Ischämie und Reperfusion (Gandhi et al. 1999), Apoptose (Taimor et al. 2000) und die Regulation der kardialen Antwort auf β -adrenerge Stimulation (Balligand 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase in Kardiomyozyten. Die Expression ist dabei im Vergleich

zum kardialen Gefäßsystem - gemessen an der nachweisbaren Enzymaktivität - etwa um den Faktor 10 geringer.

In der Lunge der Ratte wurde ein signifikanter Anstieg der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Aktivität und Expression während der perinatalen Periode beschrieben (Bloch et al. 1997). Mit Hilfe eines neu entwickelten Antikörpers gegen die β_1 -Untereinheit, konnten in der vorliegenden Arbeit die Daten von Bloch und Mitarbeitern, die eine erhöhte Expression der α_1 -Untereinheit auf Proteinebene fanden, auch für die β_1 -Untereinheit bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die perinatale Erhöhung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität und Expression nicht nur auf die Lunge beschränkt ist, sondern auch am Herzen zu beobachten ist. Während der Perinatalzeit kommt es am Herzen zu einer ausgeprägten Angiogenese (Tomanek et al. 1996). In der frühen postnatalen Periode kommt es am Rattenherzen zu einem deutlichen Wachstum der Kapillaren. Die Kapillarovolumendichte nimmt von 6 % an Tag 1 auf 15 % am postnatalen Tag 11 zu, wobei in der folgenden Entwicklung wieder eine Abnahme der Kapillarovolumendichte zu beobachten ist (Anversa et al. 1978, Anversa et al. 1979, Olivetti et al. 1980). Da die endothelialen Zellen der kardialen Kapillaren in den immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine deutliche Immunoreaktivität zeigten, liegt es nahe anzunehmen, dass die ausgeprägten Veränderungen der Kapillarovolumendichte ein Grund für die ansteigende Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Herzcytosol während der frühen postnatalen Entwicklung sind. Für diese Hypothese spricht insbesondere die parallele zeitliche Entwicklung von Kapillarovolumendichte und Guanylyl-Cyclase-Aktivität mit Maximalwerten am Tag 10 bzw. Tag 11 der postnatalen Entwicklung. Die Einwanderung bzw. das erstmalige Auftreten von kardialen glatten Muskelzellen, die in der frühen Postnatalzeit ebenfalls Immunoreaktivität für lösliche Guanylyl-Cyclase aufwiesen, könnte ein weiterer Faktor sein, der einen Anstieg der Guanylyl-Cyclase-Aktivität in der frühen postnatalen Entwicklung erklärt. In der Fetalzeit kommen kardiale glatte Muskelzellen nicht vor (Hudlická und Tyler 1986a, b).

Die Immunoreaktivität für die Guanylyl-Cyclase an arteriellen glatten Muskelzellen nahm am Herzen von geschlechtsreifen gegenüber neonatalen Ratten stark ab. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die cGMP-abhängige vasodilatatorische Antwort der kardialen Mikrozirkulation gegenüber endogenem NO oder exogen verabreichtem Glyceroltrinitrat während der Entwicklung ebenfalls stark abnehmen sollte. Neben der Vasodilatation sollten auch andere

cGMP-abhängige Effekte von NO auf die Funktion von glatten Muskelzellen (zum Beispiel die Inhibition der Proliferation) durch die ausgeprägte Abnahme der Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase betroffen sein. Eine ausgeprägte Abnahme der Expression der β_1 -Untereinheit der löslichen Guanylyl-Cyclase in glatten Muskelzellen der Intima ist nach Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis von alten Ratten beschrieben worden (Chen et al. 2000). Diese Abnahme der Expression war begleitet von einem Verlust eines antiproliferativen Effekts von NO auf die glatten Muskelzellen und einer verstärkten Proliferation von glatten Muskelzellen der Intima (Chen et al. 2000). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine ausgeprägte Abnahme der Guanylyl-Cyclase Expression in kardialen und pulmonalen Arterien von normalen, geschlechtsreifen Ratten. Dies zeigt, dass die Guanylyl-Cyclase in glatten Muskelzellen nicht nur unter pathologischen Bedingungen herunterreguliert wird (Chen et al. 2000), sondern Teil des normalen Entwicklungsprozesses ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhalation von gasförmigem NO die verstärkte Proliferation von glatten Muskelzellen in pulmonalen Arterien nach einer Lungenschädigung inhibiert. Dieser Effekt war nur in neonatalen, nicht aber in geschlechtsreifen Ratten nachweisbar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen in pulmonalen Arterien von neonatalen Ratten NO-sensitive Guanylyl-Cyclase exprimieren, während diese Expression in geschlechtsreifen Tieren überraschend nicht nachweisbar ist. Dieser Befund bietet eine wahrscheinliche Erklärung für die Altersunterschiede in Bezug auf die Wirkung von inhaliertem gasförmigem NO. In Analogie zu den Befunden von Chen et al. 2000 könnte es durch die Abnahme der Expression des Enzyms in glatten Muskelzellen von geschlechtsreifen Tieren zu einem Verlust des antiproliferativen Effekts von NO kommen.

Der Verlust der Expression von löslicher Guanylyl-Cyclase in glatten Muskelzellen während der normalen Entwicklung war in den Untersuchungen dieser Arbeit von einem deutlichen Anstieg der Expression in benachbarten Endothelzellen begleitet. Dieser Befund war in arteriellen Gefäßen der Lunge besonders eindrucksvoll, da hier ein sequenzielles Auftreten der Expression in glatten Muskelzellen bei fetalen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen bei neonatalen und nur Endothelzellen bei geschlechtsreifen Tieren nachgewiesen werden konnten. Aufgrund des Fehlens von glatten Muskelzellen am fetalen Herzen (Hudlická und Tyler 1986a, b), ließ sich am Herzen diese Abfolge nur an neonatalen und geschlechtsreifen Tieren nachweisen. Auch an kardialen arteriellen Gefäßen kam es aber zu einem Wechsel der Expression von glatten Muskelzellen und Endothelzellen bei fetalen Tieren hin zu einer

nahezu ausschließlichen Expression in Endothelzellen bei geschlechtsreifen Tieren. Diese Daten unterstreichen die funktionelle Bedeutung der NO / cGMP-Signaltransduktionskaskade in Endothelzellen, die im Vergleich zu der klassischen vasodilatatorischen Funktion in glatten Muskelzellen vermutlich trotz wichtiger Publikationen zu diesem Thema noch unterschätzt wird. In isolierten koronaren Venulen konnte gezeigt werden, dass die NO / cGMP-Signaltransduktionskaskade die Veränderungen der endothelialen Permeabilität durch VEGF vermittelt (Wu et al. 1996). Untersuchungen in anderen Organen bestätigen diese Ergebnisse (Mayhan 1999) und unterstreichen die wichtige Bedeutung der NO / cGMP-Signaltransduktionskaskade bei der Steuerung der vaskulären Permeabilität (Morbideilli et al. 1996, He et al. 1998, Russell et al. 2000). Untersuchungen des Effektes von NO auf die Proliferation von Endothelzellen haben widersprüchliche Ergebnisse geliefert. In Analogie zu einem inhibitorischen Effekt von NO auf die Proliferation von glatten Muskelzellen, wurde ein antiproliferativer Effekt von NO vorgeschlagen (Yang et al. 1994, Sarkar et al. 1995, RayChaudhury et al. 1996, Lopez-Farre et al. 1997, Cartwright et al. 2000). Das Gegenteil, ein proliferativer Effekt von NO wurde für endotheliale Zellen aus postkapillären Venulen gezeigt (Ziche et al. 1993, Ziche et al. 1994, Morbidelli et al. 1996, Ziche et al. 1997). Darüber hinaus existieren eindeutige Daten, dass der proliferative Effekt von VEGF auf endotheliale Zellen über eine Stimulation des NO / cGMP-Weges vermittelt wird (Parenti et al. 1998). Alle Studien, die einen proliferativen Effekt von NO auf endotheliale Zellen nahe legen, zeigen, dass dieser Effekt cGMP-abhängig ist. Die Mehrheit der Studien die einen antiproliferativen Effekt von NO auf Endothelzellen demonstrieren, zeigen keine cGMP-Abhängigkeit. Die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass die Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in endothelialen Zellen von arteriellen Gefäßen einer entwicklungsabhängigen Regulation unterliegt, könnten diese entgegengesetzten Effekte von NO wie folgt erklären: In Abhängigkeit einer Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in Endothelzellen überwiegen die cGMP-abhängigen bzw. nicht cGMP-abhängigen Effekte von NO.

4.2 Induktion der löslichen Guanylyl-Cyclase-Expression in der Dura mater bei Glyceroltrinitratbehandlung

Von der Dura mater als Gewebe und dem NO als Signalmolekül wird angenommen, dass es eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Kopfschmerzen und Migräne spielt (Olesen et al. 1995). Bei Infusion von Glyceroltrinitrat kommt es zum Auftreten von Kopfschmerzen mit Maxima 20-30 Minuten und 8 Stunden nach Behandlungsbeginn (Ashina et al. 2000). Das Auftreten von Kopfschmerzen nach 8 Stunden wird nur bei Migränepatienten beobachtet (Ashina et al. 2000). Zur Pathogenese der durch Glyceroltrinitrat nach etwa 8 Stunden ausgelösten Migränesymptomatik gibt es einige interessante Erklärungsansätze. Es gibt mehrere Hinweise für Änderungen der Expression bestimmter Gene nach Glyceroltrinitrat-Behandlung. So wurde berichtet, dass sich die Expression von Fos (Tassorelli et al. 1995) und der neuronalen NO-Synthase (Pardutz et al. 2000) im Zentralnervensystem 4 Stunden nach Glyceroltrinitrat-Behandlung verändert. Es ist gut vorstellbar, dass diese Expressionsänderungen im Zusammenhang mit dem verzögerten Auftreten von Kopfschmerzen bei Migränepatienten stehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen Veränderungen der Genexpression zu einem deutlich früheren Zeitpunkt nach Beginn der Glyceroltrinitrat-Behandlung. Es ist denkbar, dass diese frühen Expressionsänderungen im Zusammenhang mit dem relativ frühen Auftreten von Kopfschmerzen stehen. In den immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass die lösliche Guanylyl-Cyclase im Cytosol von Pericyten duraler Gefäße exprimiert wird. Durch die Behandlung mit Glyceroltrinitrat kommt es auch zur Expression des NO-sensitiven Enzyms in Zellen der glatten Muskulatur. Diese erhöhte Expression der löslichen Guanylyl-Cyclase in der glatten Muskulatur duraler Gefäße nach Glyceroltrinitrat-Behandlung könnte eine erhöhte Sensibilität gegenüber NO-induzierter Vasodilatation verursachen. Es wurde berichtet, dass die Behandlung mit Glyceroltrinitrat zur erhöhten Expression der neuronalen NO-Synthase in der Dura mater führt (Csillik et al. 1999). Zusammengenommen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deutet dies auf eine vermehrte Expression des gesamten NO / cGMP-Signaltransduktionsweges nach Glyceroltrinitrat-Behandlung hin. Dies könnte erklären warum die Behandlung mit Glyceroltrinitrat in der Mehrzahl der Fälle Kopfschmerzen erst nach einer Latenz von ungefähr 20 Minuten hervorruft.

4.3 Subzelluläre Lokalisation und Aktivität der löslichen Guanylyl-Cyclase in menschlichen Thrombozyten während des Aggregationsvorganges

Aufgrund von Immunfluoreszenzexperimenten wurde in einem Kongressbeitrag berichtet, dass die Guanylyl-Cyclase mit der Zellmembran in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen assoziiert ist, und dass diese Assoziation mit der Zellmembran menschlicher Thrombozyten durch deren Aktivierungszustand beeinflusst wird (Zabel et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die thrombozytäre Plasmamembran über einen Saccharosegradienten in Fraktionen niedriger und hoher Dichte aufgetrennt. Beide Fraktionen enthielten den transmembranösen Rezeptor GP IIb / IIIa. Beide Fraktionen zeigten auch durch Forskolin stimulierbare Adenylyl-Cyclase-Aktivität. Die Western-blot Untersuchungen und Messungen der Guanylyl-Cyclase-Aktivität in den verschiedenen Fraktionen aggregierter und nicht-aggregierter Thrombozyten unterstützen die von Zabel et al. 2000 berichteten Befunde und weisen auf eine Translokation der Guanylyl-Cyclase vom Cytosol zur Membranfraktion M II hin. Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Untersuchungen deutliche Veränderungen der biochemischen Eigenschaften des Enzyms im Cytosol von aggregierten gegenüber nicht-aggregierten menschlichen Thrombozyten. Die ausgeprägte Affinitätsabnahme der Guanylyl-Cyclase gegenüber dem Kofaktor Mg^{2+} nach ADP-induzierter Aggregation legte Untersuchungen der Mg^{2+} -Abhängigkeit des Enzyms nahe. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die cytosolische Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter NO-stimulierten Bedingungen in normalen menschlichen Thrombozyten durch Mg^{2+} beeinflusst oder reguliert wird. Die Daten bezüglich der physiologisch freien intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration variieren in der Literatur von $276 \pm 23 \mu M$ (Hwang et al. 1993) bis $614 \pm 18 \mu M$ (Takaya et al. 1998) oder $353 \pm 85 \mu M$ (Hiraga et al. 1998) in menschlichen Thrombozyten gesunder Probanden. Es konnte gezeigt werden, dass Insulin den intrazellulären Mg^{2+} -Transport in menschlichen Thrombozyten erhöht (Hwang et al. 1993, Takaya et al. 1998). Eine Erniedrigung der freien intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration scheint im Zusammenhang mit einer erhöhten Sensitivität der Thrombozyten gegenüber Aggregation durch ADP bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II zu stehen (Nadler et al. 1992). Bei Patienten mit essentieller Hypertension wurden signifikant unterschiedliche freie intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentrationen berichtet (Hiraga et al. 1998). Niedrige intrazelluläre Mg^{2+} -Spiegel scheinen thrombotische Gefäßokklusionen bei Patienten mit koro-

narer Herzkrankheit zu fördern (Schechter et al. 2000). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen den Einfluss der Mg^{2+} -Konzentration im physiologischen Bereich auf die cytosolische NO-stimulierte Guanylyl-Cyclase-Aktivität in nicht-aggregierten und aggregierten Thrombozyten. Dies könnte zur erhöhten Aggregationsneigung der Thrombozyten mit niedriger intrazellulärer Mg^{2+} -Konzentration bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II oder koronarer Herzkrankheit beitragen.

Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation führt zu einer deutlichen Reduktion der Affinität der cytosolischen Guanylyl-Cyclase gegenüber Mg^{2+} nicht aber gegenüber Mn^{2+} . Dabei wird die Bindung des Substrates MgGTP nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass Modifikationen der Guanylyl-Cyclase nach Aggregation nicht die Bindungsstelle des GTP-gebundenen Mg^{2+} , sondern die Bindungsstelle des zweiten Mg^{2+} -Ion betreffen, welches zwar für die Katalyse essentiell, nicht aber an GTP gebunden ist (Tesmer et al. 1999). Eine weitere Besonderheit des Enzyms im Cytosol von aggregierten Thrombozyten ist, dass der Austausch des physiologischen Mg^{2+} durch Mn^{2+} die Aktivitätsabnahme des NO-stimulierten Enzyms nach Aggregation aufhebt. Die katalytische Domäne der Adenylyl-Cyclase und Guanylyl-Cyclase sind eng verwandt und beide Enzyme verhalten sich ähnlich gegenüber den divalenten Kationen Mg^{2+} und Mn^{2+} (Tesmer et al. 1999). Die Eigenschaften der Guanylyl-Cyclase im Cytosol aggregierter Thrombozyten zeigt ausgeprägte Ähnlichkeiten mit den Eigenschaften zweier Adenylyl-Cyclasemutanten (C441R und Y442H; Zimmermann et al. 1998). Diese Mutationen erniedrigen die Affinität der Adenylyl-Cyclase gegenüber Mg^{2+} , nicht aber gegenüber Mn^{2+} , während sie die Bindung des Substrates MgATP unbeeinflusst lassen. In Gegenwart von Mn^{2+} anstatt Mg^{2+} wurde die Aktivitätsabnahme unter Forskolin und $G_s\alpha$ -stimulierten Bedingungen wieder aufgehoben. Die Mutationen der Adenylyl-Cyclase grenzen direkt an ein Aspartat (D440), das eines der beiden divalenten Kationen bindet, die für die Katalyse bei Adenylyl- und Guanylyl-Cyclasen essentiell sind (Zimmermann et al. 1998, Tesmer et al. 1999). Dieses D440 (Nummerierung nach der Adenylyl-Cyclase Typ V des Hundes) entspricht dem Aspartat 477 der menschlichen β_1 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase. Eine denkbare Hypothese wäre, dass Phosphorylierung oder Dephosphorylierung einer Aminosäure in der Nähe dieses Aspartates für die Änderungen der Enzymeigenschaften der Guanylyl-Cyclase nach ADP-induzierter Thrombozytenaggregation verantwortlich sind.

Besteht die Möglichkeit die beobachtete Aktivitätsabnahme der Guanylyl-Cyclase im Cytosol aggregierter menschlicher Thrombozyten durch Modifikationen anderer Proteine als der Guanylyl-Cyclase zu erklären? Eine erhöhte Produktion von O_2^- durch Aktivierung der NADH-Oxidase oder durch Hemmung der Superoxiddismutase würde zu einer Abnahme der NO-stimulierten Guanylyl-Cyclase-Aktivität führen, da O_2^- mit NO zu $ONOO^-$ reagieren würde (Tajima und Sakagami, 2000). Eine derartige Möglichkeit muss jedoch verworfen werden, da die durchgeführten Dosiswirkungskurven mit dem NO-Donor DEA/NO im Cytosol aggregierter Thrombozyten sogar eine erhöhte Affinität gegenüber NO, trotz einer Abnahme der maximalen Wirkung zeigten. Eine mögliche Aktivitätszunahme der Phosphodiesterase nach Thrombozytenaggregation ist ebenfalls keine überzeugende Erklärungsmöglichkeit, da der nicht-selektive Phosphodiesterasehemmstoff IBMX bei Durchführung der Enzymmessungen zugesetzt wurde. Eine effektive Hemmung der Phosphodiesterase in Thrombozyten bei der verwendeten Konzentration ist in der Literatur beschrieben (Friebe et al. 1998). Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die Modifikation eines bisher unbekanntes Proteins im Cytosol aggregierter Thrombozyten, welches dann eine hemmende Wirkung auf die Guanylyl-Cyclase ausübt. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass die Änderungen der biochemischen Eigenschaften auf die cytosolische Fraktion beschränkt sind und nicht nach Translokation an die Plasmamembran gefunden werden können. Auf der anderen Seite ist es schwer vorstellbar, wie Änderungen der kinetischen Eigenschaften der Guanylyl-Cyclase und ihre Reversibilität durch die Verwendung von Mn^{2+} anstatt Mg^{2+} als Kofaktor indirekt hervorgerufen werden könnten. Die direkte Modifikation der Guanylyl-Cyclase ist eine wahrscheinlichere Erklärung für die beobachteten Phänomene, vor allem unter Berücksichtigung der Analogie zu den oben genannten Adenylyl-Cyclase-Mutanten. Bis jetzt sind Versuche die Guanylyl-Cyclase aus Thrombozyten aufzureinigen, in verschiedenen Laboratorien gescheitert, obwohl Thrombozyten eine reiche Quelle für das Enzym bieten. Um die Veränderungen der Enzymeigenschaften weitergehend untersuchen zu können wäre es notwendig, ein Protokoll für die Aufreinigung der Guanylyl-Cyclase aus aggregierten und nicht-aggregierten Thrombozyten zu erarbeiten.

Was könnte die physiologische Bedeutung der Translokation und Veränderung der Enzymeigenschaften der Guanylyl-Cyclase nach Thrombozytenaggregation sein? Es wurde gezeigt, dass die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit einer Zunahme der thrombozytären NO-Produktion 1 bis 2 min nach Induktion der Aggregation durch ADP vergesellschaftet ist.

Diese autokrine NO-Freisetzung beeinflusst die primäre Aggregation nach Induktion durch ADP nur gering, während die Rekrutierung weiterer Thrombozyten durch einen parakrinen Mechanismus deutlich gehemmt wird (Freedmann et al. 1997). Diese Beobachtung könnte durch eine unterschiedliche NO-Aktivierbarkeit aggregierender gegenüber nativen Thrombozyten erklärt werden. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Veränderungen der Mg^{2+} -Abhängigkeit könnten hierbei eine Rolle spielen. Die Zunahme von Guanylyl-Cyclase mit unveränderter Mg^{2+} -Abhängigkeit in der Plasmamembran aggregierter Thrombozyten deutet auf eine spezielle Rolle der Guanylyl-Cyclase an der Plasmamembran hin. Der membrangebundenen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in Thrombozytenaggregaten könnte eine wichtige Rolle im Disaggregationsprozess zukommen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnten sowohl für den Guanylyl-Cyclase-Aktivator YC-1 (Ko et al. 1994), als auch für NO-Donatoren (Stamler et al. 1989, Salas et al. 1994) thrombolytische Eigenschaften gezeigt werden.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung von selektiven Substanzen für die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase in spezifischen Organen oder Zelltypen ist von großem pharmakologischem Interesse. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Rolle der löslichen Guanylyl-Cyclase als Rezeptor für die erwünschten und unerwünschten Wirkungen von NO-freisetzenden Substanzen wie Glyceroltrinitrat näher zu charakterisieren. Entsprechend wurden einerseits Untersuchungen am Herzen und an Thrombozyten durchgeführt, wo die lösliche Guanylyl-Cyclase an der Vermittlung des antianginösen bzw. schwächer ausgeprägten antiaggregatorischen Effekt von Glyceroltrinitrat beteiligt ist. Andererseits wurden Untersuchungen an der schmerzempfindlichen Dura mater durchgeführt, wo Glyceroltrinitrat über bisher unbekannte Mechanismen Kopfschmerzen auslöst. Es ergaben sich folgende Hauptbefunde: 1. Die lösliche Guanylyl-Cyclase wird am Herzen vorwiegend im kardialen Gefäßsystem exprimiert, in geringerer Ausprägung aber auch in Kardiomyozyten. Es zeigte sich ein Wechsel der Expression von glatten Muskelzellen zu Endothelzellen im Koronarsystem und den Pulmonalarterien während der Entwicklung nach der Geburt. Dies unterstreicht die funktionelle Bedeutung der NO/cGMP-Signaltransduktionskaskade in Endothelzellen von geschlechtsreifen Tieren. 2. Experimentelle Behandlung von Ratten mit Glyceroltrinitrat führt zu einer reversiblen Expressions- und Aktivitätszunahme der Guanylyl-Cyclase an der Dura mater. Dies könnte erklären, warum die Behandlung mit Glyceroltrinitrat in der Mehrzahl der Fälle Kopfschmerzen mit einer Latenzzeit hervorruft. 3. ADP-induzierte Aggregation menschlicher Thrombozyten führt zu einem deutlichen Aktivitätsverlust der Guanylyl-Cyclase und zu grundlegenden Veränderungen der kinetischen Eigenschaften des Enzyms. Darüber hinaus kommt es zur Translokation der Guanylyl-Cyclase vom Cytosol zur Plasmamembran. Die Translokation und Veränderungen der Enzymeigenschaften der löslichen Guanylyl-Cyclase nach Thrombozytenaggregation weist auf eine wichtige Rolle des Enzyms während des Aggregationsprozesses hin.

6 Literaturverzeichnis

Anversa P, Loud AV, Giacomelli F, Wiener J (1978) Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. II. Ultrastructure of myocytes and interstitium. *Lab Invest* 38: 597-609

Anversa P, Olivetti G, Melissari M, Loud AV (1979) Morphometric study of myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic stenosis. *Lab Invest* 40: 341-349

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 USA* 74: 3203-3207

Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Olesen J (2000) Nitric oxide-induced headache in patients with chronic tension-type headache. *Brain* 123: 1830-1837

Bache RJ, Ball RM, Cobb FR, Rembert JC, Greenfield JC Jr. (1975) Effects of nitroglycerin on transmural myocardial blood flow in the unanesthetized dog. *J Clin Invest.* 55: 1219-1228.

Balligand JL (1999) Regulation of cardiac beta-adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 43: 607-620

Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schroeder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, Stasch JP (2000) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: 390-397

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* 29: 64-69

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

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

Brown BG, Bolson E, Petersen RB, Pierce CD, Dodge HT (1981) The mechanisms of nitroglycerin action: stenosis vasodilatation as a major component of drug response. *Circulation* 64: 1089-1097

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

Canty JM Jr. (2000) Nitric oxide and short-term hibernation: friend or foe? *Circ Res* 87: 85-87

Cartwright JE, Johnstone AP, Whitley GS (2000) Endogenously produced nitric oxide inhibits endothelial cell growth as demonstrated using novel antisense cell lines. *Br J Pharmacol* 131: 131-137

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

Chen L, Daum G, Fischer JW, Hawkins S, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Clowes AW (2000) Loss of expression of the beta subunit of soluble guanylyl cyclase prevents nitric oxide-mediated inhibition of DNA synthesis in smooth muscle cells of old rats. *Circ Res* 86: 520-525

Cohn PF, Maddox D, Holman BL, Markis JE, Adams DF, See JR, Idoine J (1977) Effect of sublingually administered nitroglycerin on regional myocardial blood flow in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 39: 672-678

Csillik E, Vecsei L (1999) Effect of a nitric oxide donor on nitroergic nerve fibers in the rat dura mater. *Neurosci Lett* 260: 97-100

Denninger JW, Marletta MA (1999) Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411: 334-50

Diodati J, Theroux P, Latour JG, Lacoste L, Lam JY, Waters D (1990) Effects of nitroglycerin at therapeutic doses on platelet aggregation in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 66: 683-688

Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD (1997) Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 100: 350-356

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

Friebe A, Müllershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G, Koesling D (1998) YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol* 54: 962-967

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

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

Gandhi A, Yan L, Scholz PM, Huang MW, Weiss HR (1999) Cyclic GMP reduces ventricular myocyte stunning after simulated ischemia-reperfusion. *Nitric Oxide*. 3: 473-480

Garbers DL (1999) The Guanylyl Cyclase Receptors. *Methods* 19: 477-484

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

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

Goldstein RE, Stinson EB, Scherer JL, Seningen RP, Grehl TM, Epstein SE (1974) Intraoperative coronary collateral function in patients with coronary occlusive disease: nitroglycerin responsiveness and angiographic correlations. *Circulation* 49: 298-308

Gupta G, Azam M, Yang L, Danziger RS (1997) The β_2 subunit inhibits stimulation of the α_1/β_1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *J Clin Invest* 100: 1488-1492

Guthmann F, Mayer B, Koesling D, Kukovetz WR, Böhme E (1992) Characterization of soluble platelet guanylyl cyclase with peptide antibodies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346: 537-541

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

He P, Zeng M, Curry FE (1998) cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol* 274: H1865-1874

Hering C (1849) Glonoine, a new medicine for headache. *Am J Homeopathy* 4: 3

Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266: 22789- 22791

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94

Hiraga H, Oshima T, Yoshimura M, Matsuura H, Kajiyama G (1999) Abnormal platelet Ca^{2+} handling accompanied by increased cytosolic free Mg^{2+} in essential hypertension. *Am J Physiol* 275: R574-579

Hudlická O, Tyler KR (1986a) Comparative aspects of differentiation and growth of microcirculation in different species. In: Hudlická O, Tyler KR (Hrsg.) *Angiogenesis: The Growth of the vascular System*. London, Academic Press Inc, pp. 71-73

Hudlická O, Tyler KR (1986b) Growth of vessels during pre- and postnatal development. In: Hudlická O, Tyler KR (Hrsg.) *Angiogenesis: The Growth of the vascular System*. London, Academic Press Inc, pp. 49-52

Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Böhme E (1990) Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* 190: 273-278

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

Hwang DL, Yen CF, Nadler JL (1993) Insulin increases intracellular magnesium transport in human platelets. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 549-553

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269

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

Johnstone MT, Lam JY, Lacoste L, Baribeau J, Theroux P, Waters D (1993) Methylene blue inhibits the antithrombotic effect of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 21: 255-259

Karlberg KE, Torfgard K, Ahlner J, Sylven C (1992) Dose-dependent effect of intravenous nitroglycerin on platelet aggregation, and correlation with plasma glyceryl dinitrate concentration in healthy men. *Am J Cardiol* 69: 802-805

Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 3: 23-35

Kerwin J, Lancaster J, Feldman P (1995) Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38: 4343-4362

Kishimoto I, Garbers DL (1997) Physiological regulation of blood pressure and kidney function by guanylyl cyclase isoforms. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6: 58-63

Klassen CL, Traverse JH, Bache RJ (1999) Nitroglycerin dilates coronary collateral vessels during exercise after blockade of endogenous NO production. *Am J Physiol* 277: H918-923

Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM (1994) YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84: 4226-4233

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

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

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

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

Kojda G, Kottenberg K, Noack E (1997) Inhibition of nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. *Eur J Pharmacol* 334: 181-190

Kots AY, Grafov MA, Khropov YV, Betin VL, Belushkina NN, Busygina OG, Yazykova MY, Ovchinnikov IV, Kulikov AS, Makhova NN, Medvedev NA, Bulargina TV, Severina IS (2000) Vasorelaxant and antiplatelet activity of 4,7-dimethyl-1,2, 5-oxadiazolo[3,4-d]pyridazine 1,5,6-trioxide: role of soluble guanylate cyclase, nitric oxide and thiols. *Br J Pharmacol* 129: 1163-1177

Kurtz A, Wagner C (1998) Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275: F849-862

Lacoste LL, Theroux P, Lidon RM, Colucci R, Lam JY (1994) Antithrombotic properties of transdermal nitroglycerin in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 73: 1058-1062

Lam JY, Chesebro JH, Fuster V (1988) Platelets, vasoconstriction, and nitroglycerin during arterial wall injury. A new antithrombotic role for an old drug. *Circulation* 78: 712-716

Lees C, Campbell S, Jauniaux E, Brown R, Ramsay B, Gibb D, Moncada S, Martin JF (1994) Arrest of preterm labour and prolongation of gestation with glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor. *Lancet* 343: 1325-1326

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

Lopez-Farre A, Sanchez de Miguel L, Caramelo C, Gomez-Macias J, Garcia R, Mosquera JR, de Frutos T, Millas I, Rivas F, Echezarreta G, Casado S (1997) Role of nitric oxide in autocrine control of growth and apoptosis of endothelial cells. *Am J Physiol* 272: H760-768

Marletta MA (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1: 249-257

Marsh N, Marsh A (2000) A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 313-319

Mayhan WG (1999) VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol* 276: C1148-1153

Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 125: 370-377

Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 75: 851-856

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12: 365-372

Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M (1996) Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 270: H411-H415

Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S (1999) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1480-1485

Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch JP, Kast R, Busse R (1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 120: 681-689

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

Nadler JL, Malayan S, Luong H, Shaw S, Natarajan RD, Rude RK (1992) Intracellular free magnesium deficiency plays a key role in increased platelet reactivity in type II diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15: 835-841

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

Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F (1988) Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1139-1147

Olesen J, Thomsen LL, Lassen LH, Olesen IJ (1995) The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalgia* 15: 94-100

Olivetti G, Anversa P, Loud AV (1980) Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ Res* 46: 503-512

Owen JA, Saunders F, Harris C (1989) Topical nitroglycerin: a potential treatment for impotence. *J Urol* 141: 546-548

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526

Pardutz A, Krizbai I, Multon S, Vescei L, Schoenen J (2000) Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neuroreport* 11: 3071-3075

Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M (1998) Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 273: 4220-4226

Peire MA, Puig-Parellada P (1998) Oxygen-free radicals and nitric oxide are involved in the thrombus growth produced by iontophoresis of ADP. *Pharmacol Res* 38: 353-356

Porst H (1993) Prostaglandin E1 and the nitric oxide donor linsidomine for erectile failure: a diagnostic comparative study of 40 patients. *J Urol* 149: 1280-1283

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987a) Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92: 181-187

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987b) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-646

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5193-5197

RayChaudhury A, Frischer H, Malik AB (1996) Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. *J Cell Biochem* 63: 125-134

Rothermund L, Friebe A, Paul M, Koesling D, Kreutz R. (2000) Acute blood pressure effects of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase in normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 130: 205-208

Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR (2000) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5930-5935

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

Sadoff JD, Scholz PM, Tse J, Weiss HR (1996) Increased guanylate cyclase activity is associated with an increase in cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 98: 838-845

Salas E, Moro MA, Askew S, Hodson HF, Butler AR, Radomski MW, Moncada S (1994) Comparative pharmacology of analogues of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine on human platelets. *Br J Pharmacol* 112: 1071-1076

Sarkar R, Webb RC, Stanley JC (1995) Nitric oxide inhibition of endothelial cell mitogenesis and proliferation. *Surgery* 118: 274-279

Schechter M, Merz CN, Rude RK, Paul Labrador MJ, Meisel SR, Shah PK, Kaul S (2000) Low intracellular magnesium levels promote platelet-dependent thrombosis in patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 140: 212-218

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

Schultz G, Böhme E (1984) In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M (Hrsg.) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3. Auflage, Band 4, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, pp. 379–389

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

Stammler JS, Vaughan DE, Loscalzo J (1989) Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E1, and nitroglycerin. *Circ Res* 65: 796-804

Stief CG, Holmquist F, Djamilian M, Krah H, Andersson KE, Jonas U (1992) Preliminary results with the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate in the treatment of human erectile dysfunction. *J Urol* 148: 1437-1440

Stone JR, Marletta MA (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33: 5636-5640

- Stone JR, Marletta MA (1995) Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 34: 14668-14674
- Straznicka M, Gong G, Tse J, Scholz PM, Weiss HR (1997) cGMP level that reduces cardiac myocyte O₂ consumption is altered in renal hypertension. *Am J Physiol* 273: H1949-955
- Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM (2000) Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res* 45: 588-594
- Tajima M, Sakagami H (2000) Tetrahydrobiopterin impairs the action of endothelial nitric oxide via superoxide derived from platelets. *Br J Pharmacol* 131: 958-964
- Takaya J, Higashino H, Miyazaki R, Kobayashi Y (1998) Effects of insulin and insulin-like growth factor-1 on intracellular magnesium of platelets. *Exp Mol Pathol* 65: 104-109
- Tassorelli C, Joseph SA (1995) Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res* 682: 167-181
- Teng CM, Wu CC, Ko FN, Lee FY, Kuo SC (1997) YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur J Pharmacol* 320: 161-166
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SG (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* 278: 1907-1916
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Johnson RA, Gosselin G, Gilman AG, Sprang SR (1999) Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* 285: 756-760
- Thadani U, Fung HL, Darke AC, Parker JO (1982) Oral isosorbide dinitrate in angina pectoris: comparison of duration of action and dose-response relation during acute and sustained therapy. *Am J Cardiol* 49: 411-419
- Thomsen LL, Olesen J (1998) Nitric oxide theory of migraine. *Clin Neurosci* 5: 28-33

Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS (1999) Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol* 277: F882-889

Tomanek RJ, Haung L, Suvarna PR, O'Brien LC, Ratajska A, Sandra A (1996) Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res* 31: E116-126

Truss MC, Becker AJ, Djamilian MH, Stief CG, Jonas U (1994) The role of the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate (SIN1) in the diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Urology* 44: 553-556

Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ (1999) Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84: 1020-1031

Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. (1999) Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res.* 84): 1020-1031

Wedel B, 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

Wegener JW, Closs EI, Forstermann U, Nawrath H (1999) Failure of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) to inhibit soluble guanylyl cyclase in rat ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 127:693-700

Weiss HR, Rodriguez E, Tse J (1995) Relationship between cGMP and myocardial O₂ consumption is altered in T4-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 268: H686-H691

Williams JF Jr, Glick G, Braunwald E (1965) Studies on cardiac dimensions in intact unanesthetized man. V. Effects of nitroglycerin. *Circulation.* 32: 767-771

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

Wu HM, Huang Q, Yuan Y, Granger HJ (1996) VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol* 271: H2735-2739

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 657-662

Xue L, Farrugia G, Miller SM, Ferris CD, Snyder SH, Szurszewski JH (2000) Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 97: 1851-1855

Yang W, Ando J, Korenaga R, Toyooka T, Kamiya A (1994) Exogenous nitric oxide inhibits proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1160-1167

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, Kleinschnitz M, Weeger M, Smolenski A, Kugler P, Drenckhahn D, Walter U, Schmidt HHHW (2000) Soluble guanylyl cyclase is associated with cellular membranes in various tissues and cell types. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361: (Suppl) R 44

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

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

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F (1994) Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 94: 2036-2044

Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, Presta M (1997) Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res* 80: 845-852

Ziche M, Zawieja D, Hester RK, Granger H (1993) Calcium entry, mobilization, and extrusion in postcapillary venular endothelium exposed to bradykinin. *Am J Physiol* 265: H569-580

Zimmermann G, Zhou D, Taussig R (1998) Mutations uncover a role for two magnesium ions in the catalytic mechanism of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 273: 19650-19655

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

7 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

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

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

Behrends S, Knyihar-Csillik E, Kempfert J, Scholz H, Csillik B, Vecsei L (2001) Glyceryl trinitrate treatment up-regulates soluble guanylyl cyclase in rat dura mater. *Neuroreport* 12: 3993-3996

Behrends S, Budaeus L, Kempfert J, Scholz H, Starbatty J, Vehse K (2001) The β_2 subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is developmentally regulated in rat kidney. *Naunyn Schmiedebergers Arch Pharmacol* 364: 573-576

Behrends S, Mietens A, Kempfert J, Koglin M, Scholz H, Middendorff R (2002) The expression pattern of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in the rat heart changes during postnatal development. *J Histochem Cytochem* 50 (in print)

Abstracts

Mietens A, Behrends S, Kempfert J, Middendorf R (2001) The NO-binding soluble guanylate cyclase in rat heart: localization, activity and developmental regulation. *Ann Anat* 183 (Suppl.): 124-125

Behrends S, Kempfert J, Koglin M, Middendorf R, Mietens A, Scholz H (2002) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in rat heart is pre-dominantly localized in the vasculature and is regulated during development. *Zeitschrift für Kardiologie* 91 (Suppl.): I 312

8 Lebenslauf

geboren am 22.02.1976 in Berlin

1982 – 1986	Waldorfschule Augsburg
1986 – 1988	Rudolf-Diesel Gymnasium Augsburg
1988 – 1995	Alexander von Humboldt Gymnasium Konstanz
1995 – 1996	Zivildienst im Krankenhaus Konstanz
seit WS 1996/97	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Herbst 1998	Ärztliche Vorprüfung
Herbst 1999	Erstes Staatsexamen
seit Ende 1999	Beginn der Promotion im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Scholz
Frühjahr 2002	Zweites Staatsexamen
seit Frühjahr 2002	Praktisches Jahr an der Universität Leipzig

Leipzig, den 20.08.2002

9 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hasso Scholz möchte ich mich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie prägende Einblicke in die wissenschaftliche Arbeit bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei PD Dr. med. Ralf Middendorff und Frau Andrea Mietens, Anatomisches Institut des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und Frau Prof. Dr. Elizabeth Knyihar-Csillik, Department of Neurology University of Szeged Hungary.

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

Darüberhinaus gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Markus Koglin, für die gute Zusammenarbeit und viele hilfreiche Anregungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Sönke Behrends für seine engagierte und motivierende Unterstützung während der gesamten Dissertation, sowie für die kompetente Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten bedanken.

Erklärung:

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

Untersuchungen zur Regulation und Expression der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase am Herzkreislaufsystem und an menschlichen Thrombozyten

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 PD Dr. med. Sönke Behrends ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen Hilfsmittel benutzt habe.

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

Hamburg, den 20.08.2002

Jörg Kempfert

