

Die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktion in der glatten Muskulatur

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie an der
Ruhr-Universität Bochum

angefertigt am
Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie
der Fakultät für Medizin

Vorgelegt von
Diplom-Biologe Alexander Lange
aus Halle a.d. Saale

Bochum, 2006

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	1
1.	Einleitung	3
1.1	Die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade	3
1.1.1	NO-Synthasen und wichtige von ihnen vermittelte Effekte	3
1.1.2	NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen	6
1.1.3	Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen.....	8
1.1.4	cGMP-abhängige Proteinkinasen	10
1.1.5	Phosphodiesterasen.....	11
1.1.5.1	PDE-Familien mit cGMP-Spezifität.....	12
1.1.5.2	PDE-Familien mit gemischter Spezifität	14
1.1.5.3	PDE-Familien mit cAMP-Spezifität.....	15
1.1.6	Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs	16
1.2	Die glatte Muskulatur	17
1.2.1	Molekulare Mechanismen der Kontraktion glatter Muskulatur	17
1.2.2	Molekulare Mechanismen der Relaxation glatter Muskulatur	20
1.2.3	Glatte Muskulatur: Rezeptorausstattung und Signalwege.....	21
1.2.4	Pathophysiologie und pharmakologische Ansatzpunkte der glatten Muskulatur.....	22
2.	Zielsetzung.....	24
3.	Materialien und Methoden.....	25
3.1	Routinemethoden	25
3.1.1	Proteinbestimmung, Gelelektrophorese und Western-Blot	25
3.1.2	Herstellung von radioaktiv-markiertem cyclischen Guanosinmonophosphat (Tracer).....	25
3.1.3	Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung von cyclischem 3',5'-Guanosinmonophosphat.....	26
3.1.4	Herstellung von ³² P-cGMP	27
3.1.5	Bestimmung der cGMP-abbauenden Phosphodiesteraseaktivität	28
3.1.6	Aktivitätsbestimmung der gereinigten Guanylyl-Cyclase.....	29
3.2	Gewinnung von HEK-GC-PDE2-Zellen-Zytosol.....	30
3.3	Organbad-Experimente.....	31
3.3.1	Tiere und Präparation.....	31
3.3.2	Experimenteller Ablauf der Organbad-Experimente.....	32
3.3.3	Aufnahme von Dosis-Wirkungs-Kurven.....	32
3.3.4	Nachweis der Zerstörung des Aorten-Endothels	33
3.3.5	Desensibilisierungsversuche mit Aorta und Bronchien der Ratte	33
3.3.6	Kreuzdesensibilisierungs-Experimente zur Aufklärung des Desensibilisierungsmechanismus	34
3.3.7	Charakterisierung und Nutzung der NO-GC-knock-out-Mäuse.....	35
3.4	Bestimmung der intrazellulären cGMP-Konzentration	35

3.4.1	Messung der cGMP-Antwort in Aorta, Bronchien und Vene der Ratte und Lunge der Maus und Messung der Desensibilisierung in Ratten-Aortenstreifen und Maus-Lungengewebe.....	35
3.4.2	Messung der cGMP-Antwort in HEK-GC-PDE2-Zellen	36
3.5	Gewebeinkubation und Aufarbeitung für die Proteinanalyse.....	36
3.5.1	Proteinfällung durch Trichloressigsäure und Aceton	37
3.5.2	Aktivierung der PDE5 in Aorten- und Bronchiengewebe	37
4.	Ergebnisse	39
4.1	Untersuchung der NO/cGMP-Signaltransduktion in der glatten Muskulatur	39
4.1.1	Nachweis der Komponenten des NO/cGMP-Signalwegs	39
4.1.2	Die NO-induzierte cGMP-Antwort in der glatten Muskulatur.....	41
4.1.3	Die NO-induzierte cGMP-Antwort im Zeitverlauf und der Einfluß der PDE5....	42
4.1.4	Dosis-Wirkungskurven für die NO- und die ANP-induzierte cGMP-Antwort....	44
4.1.5	Untersuchung zur funktionellen Relevanz in Organbadversuchen.....	46
4.1.6	Dosis-Wirkungskurven der kontrahierenden und relaxierenden Substanzen	46
4.1.7	Vergleich der GSNO-induzierten Relaxation zwischen Aorta und Bronchius.....	51
4.1.8	Vergleich der für die cGMP-Synthese und für die Relaxation notwendigen GSNO-Konzentrationen in der Aorta	51
4.1.9	Desensibilisierung der NO-induzierten cGMP-Antwort in der Ratten-Aorta	51
4.1.10	Desensibilisierung der cGMP-Antwort in der Maus-Lunge.....	54
4.1.11	Desensibilisierung der NO/cGMP-vermittelten Relaxation im Organbad	56
4.1.12	Nachweis der aktiven PDE5 im desensibilisierten NO/cGMP-Signalweg.....	59
4.1.13	Die Identifizierung des Mechanismus der NO-induzierten Desensibilisierung in der glatten Muskulatur (Kreuzdesensibilisierung).....	62
4.1.14	Einfluß der PDE3 auf die NO-induzierte Relaxation der glatten Muskulatur.....	66
4.1.15	Untersuchung der NO/cGMP-vermittelten Relaxation in β 1-GC-defizienten Mäusen.....	66
4.1.16	Wirkung von NO auf Aorten-Ringe von Wildtyp- und NO-GC-KO-Mäusen	68
4.2	Untersuchungen zum PDE2 Hemmstoff BAY60-7550.....	72
5.	Diskussion.....	78
5.1	Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs in der glatten Muskulatur.....	78
5.2	Zusammenhang von NO-GC- und PDE5-Expression, der NO-induzierten cGMP-Antwort und der resultierenden Relaxation in der glatten Muskulatur....	80
5.3	Die Wirkung von BAY60-7550 auf die PDE2 und die NO-GC.....	82
6.	Zusammenfassung	84
7.	Literatur	86
8.	Publikationen	102
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	103
10.	Danksagung	106
11.	Lebenslauf.....	107
12.	Erklärung	108

1. Einleitung

1.1 Die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade

Die Stickstoffmonoxid/cyclisches Guanosinmonophosphat (NO/cGMP)-vermittelte Signaltransduktionskaskade ist bei Säugetieren an verschiedenen physiologischen Regulationsprozessen beteiligt. Eine besonders wichtige Rolle spielt sie im kardiovaskulären System, wo sie eine Gefäßrelaxation (Diamond, 1978; Schultz *et al.*, 1978; Axelson *et al.*, 1979) und eine Hemmung der Thrombocytenaggregation und -adhäsion vermittelt (Böhme *et al.*, 1974; Haslam *et al.*, 1978; Mellion *et al.*, 1981).

Vor mehr als 25 Jahren wurde beobachtet, daß Substanzen wie Acetylcholin, Bradykinin oder Histamin nur gefäßrelaxierend wirken, wenn das benachbarte Gefäßendothel unverseht ist. Infolgedessen wurde die Existenz eines endothelial freigesetzten Faktors (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*; EDRF) postuliert (Furchgott und Zawadzki, 1980), der nach seiner Freisetzung aus dem Endothel eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt. EDRF wurde später als NO identifiziert (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Die Bildung von NO durch NO-Synthasen infolge unterschiedlicher physiologischer Reize wurde in verschiedenen Zelltypen und Geweben gezeigt (Knowles *et al.*, 1989; Wei *et al.*, 1995). Das NO diffundiert vom Endothel aus in die benachbarte glatte Muskelzelle (Abb. 1). Dort stimuliert das Signalmolekül die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC), den wichtigsten NO-Rezeptor im kardiovaskulären System (Friebe *et al.*, 2006). Von der NO-GC gebildetes cGMP stimuliert je nach Zelltyp unterschiedliche Effektoren: cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-abhängige Phosphodiesterasen oder cGMP-regulierte Ionenkanäle. Über diese werden anschließend die wichtigen zellulären Funktionen wie die Vasorelaxation und die Hemmung der Thrombocytenaggregation und -adhäsion vermittelt.

1.1.1 NO-Synthasen und wichtige von ihnen vermittelte Effekte

NO-Synthasen katalysieren die Bildung von NO bei der Umwandlung des Arginin zu Citrullin (Iyengar *et al.*, 1987; Marletta *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1988). Zur Aktivierung der NO-Synthasen werden Arginin, O₂ und NADPH als Substrate,

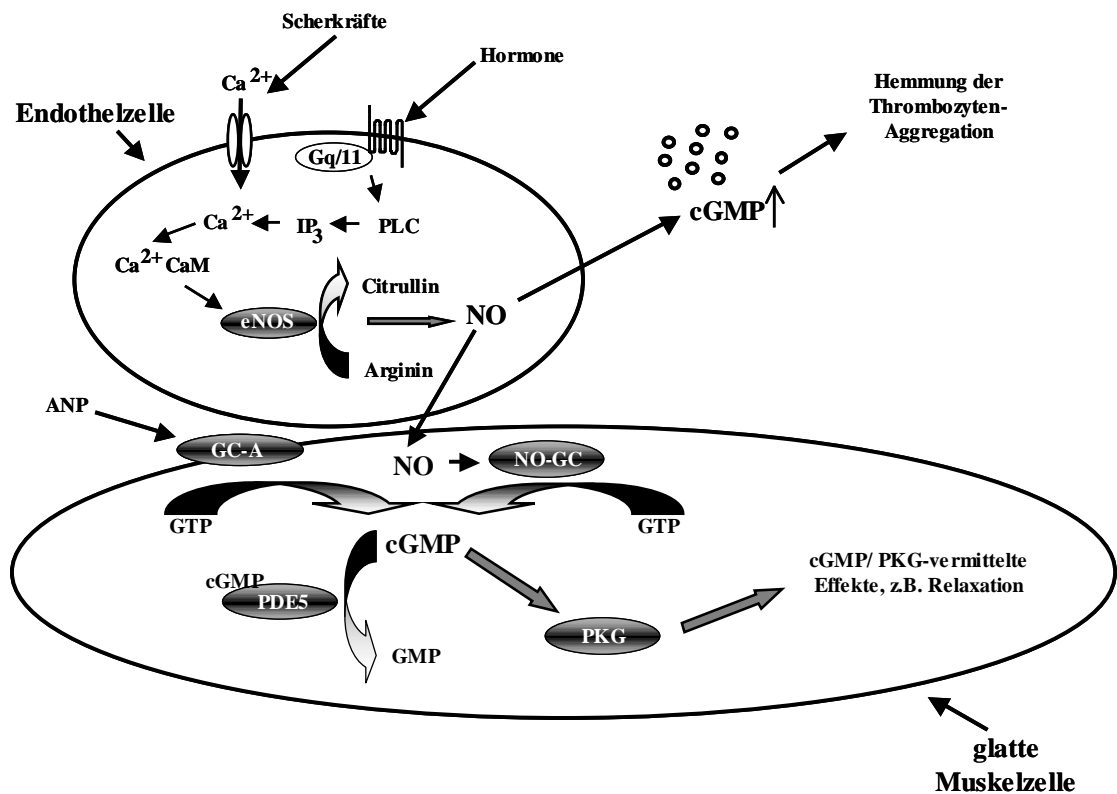


Abb. 1: Die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade im glatten Gefäßmuskel

Durch NO-Synthasen gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) diffundiert aus den Endothelzellen zu den Thrombocyten im Gefäßlumen und führt dort durch die Aktivierung der NO-GC zur Hemmung der Aggregation. In den glatten Muskelzellen stimuliert es die NO-GC, so daß es zur gesteigerten cGMP-Synthese kommt. Die GC-A wird durch das Peptidhormon ANP stimuliert und bildet dann vermehrt cGMP. Durch die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase kommt es zu den zellulären Effekten. Der Abbau von cGMP wird in der glatten Muskulatur hauptsächlich durch die PDE5 katalysiert.

sowie Tetrahydrobiopterin, FAD, FMN, Calmodulin und eine prosthetische Hämgruppe benötigt (Mayer *et al.*, 1990; Klatt *et al.*, 1992).

Es gibt drei bisher charakterisierte Isoformen der NO-Synthasen, die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS), die sich in ihrem Vorkommen, ihrer Regulation und anhand der NO-vermittelten Effekte voneinander unterscheiden (Förstermann *et al.*, 1991; Nathan, 1992; Murad *et al.*, 1993).

Die eNOS und die nNOS werden konstitutiv exprimiert und durch Calcium/Calmodulin (Ca/CaM) reguliert (Bredt und Snyder, 1990). Ihre Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Ca/CaM-Komplexes an das Enzym infolge einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, z.B. durch eine Rezeptor-vermittelte Öffnung intrazellulärer Speicher. In Zellen mit niedriger Ca^{2+} -Konzentration zeigen eNOS und nNOS eine geringe Affinität zu CaM und sind nicht katalytisch aktiv. Die eNOS kann jedoch auch Ca^{2+} -unabhängig aktiviert werden. Diese Aktivierung wird durch die Proteinkinase Akt vermittelt, die infolge ihrer Stimulation die eNOS phosphoryliert und sie dadurch in einen aktiven Zustand versetzt (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999). Die iNOS wird hauptsächlich im Rahmen der unspezifischen inflammatorischen Immunabwehr in Makrophagen exprimiert (DiRosa *et al.*, 1990, Radomski *et al.*, 1990, Liew *et al.*, 1990, Xie und Nathan, 1994; Mac Micking *et al.*, 1997; Kiemer und Vollmar, 1998). Unter physiologischen Bedingungen hat sie CaM gebunden und ist infolgedessen daueraktiv (Groß *et al.*, 1990). Im Vergleich zu den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen produziert die iNOS außerordentlich hohe NO-Mengen, die direkt zytotoxisch wirken. Die iNOS spielt jedoch keine physiologische Rolle innerhalb der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion. Trotz aller Unterschiede bezüglich ihres Vorkommens, ihrer Regulation und der NO-induzierten Effekte besteht zwischen den einzelnen Isoformen der NO-Synthasen eine hohe Sequenzhomologie. Alle Isoformen liegen jeweils als Homodimere vor.

NO wird an verschiedenen Stellen des menschlichen Organismus gebildet. Es wird, wie bereits beschrieben (s. 1.1), in Gefäß-Endothelzellen z.B. infolge einer Aktivierung von Acetylcholin-, Bradykinin- oder Histamin-Rezeptoren synthetisiert. Wichtigster Stimulus für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Endothelzelle ist die durch den Blutfluß ausgeübte Scherkraft auf die Gefäßwand. Das daraufhin gebildete NO diffundiert in die benachbarten Gefäßmuskelzellen. Dort stimuliert es die NO-sensitive GC und vermittelt über den intrazellulären cGMP-Anstieg eine Vasorelaxation. Das NO diffundiert außerdem in die Thrombocyten, die sich im Gefäßlumen befinden. In den Thrombocyten wirkt NO über die Aktivierung der dort vorliegenden NO-sensitiven GC hemmend auf die Thrombocyten-

aggregation und -adhäsion. NO fungiert ebenfalls als synaptischer Transmitter im zentralen und im peripheren Nervensystem. Im Hippocampus fungiert NO als retrograder Transmitter bei einigen Formen der Verstärkung der synaptischen Signalübertragung (*long-term potentiation*) (Bohme *et al.*, 1991; O' Dell *et al.*, 1991; Schuman und Madison, 1991). Im Cerebellum fungiert NO als orthograder und/oder als retrograder Neurotransmitter, und es bewirkt dort eine Abschwächung der Signalübertragung (*long-term depression*) (Shibuki und Okada, 1991; Lev-Ram *et al.*, 1997). Im peripheren Nervensystem fungiert NO als Neurotransmitter an nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC-) Neuronen. NANC-Neuronen innervieren die glatte Muskulatur des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts sowie einige Blutgefäße, und vermitteln dort eine Relaxation (Bult *et al.*, 1990; Sanders und Ward, 1992). So werden der Rhythmus der Kontraktionen und der Muskeltonus des Gastrointestinaltrakts durch Bildung und Freisetzung von NO durch inhibitorische NANC-Neuronen des Darmnervensystems kontrolliert. Eine wichtige Funktion übernimmt NO zudem im Corpus cavernosum, wo es zu einer Dilatation der glatten Muskulatur führt, die für die Erektion des Penis notwendig ist (Ignarro *et al.*, 1990; Knispel *et al.*, 1992; Hedlund *et al.*, 2000).

1.1.2 NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen

Die NO-sensitiven Guanylyl-Cyclasen sind Effektorproteine des membrangängigen NO. Sie vermitteln die NO-induzierten Effekte über eine erhöhte cGMP-Synthese. Zu diesen Effekten gehören neben der Relaxation glatter Gefäßmuskulatur und der Hemmung der Thrombocytenaggregation und -adhäsion auch die Vermittlung neuronaler Transduktionsprozesse (Stryer *et al.*, 1981; Fesenko *et al.*, 1985).

Die NO-GC wird in nahezu allen Säugetierzellen exprimiert (Mergia *et al.*, 2003), und sie wurde erstmalig 1981 aus der Rinderlunge isoliert (Gerzer *et al.*, 1981). Später wurden die DNA-Sequenzen der α_1 - und der β_1 -Untereinheit der NO-GC ermittelt (Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1988; Koesling *et al.*, 1990; Nakane *et al.*, 1990). Mit Hilfe von Homologiescreenings wurden anschließend mit α_2 und β_2 zwei weitere Untereinheiten identifiziert (Yuen *et al.*, 1990; Harteneck *et al.*, 1991).

Durch NO aktivierbare und katalytisch aktive Enzyme bestehen aus der Kombination einer α - mit einer β_1 -Untereinheit (Harteneck *et al.*, 1990; Buecheler *et al.*, 1991), sie liegen als $\alpha_1\beta_1$ - oder als $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere vor. Die β_2 -Untereinheit kann mit keiner der anderen Un-

tereinheiten ein katalytisch aktives Enzym generieren; ihre physiologische Funktion konnte bis dato nicht vollständig geklärt werden.

Die $\alpha_1\beta_1$ - und die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform besitzen vergleichbare katalytische Aktivitäten, Stimulierbarkeiten durch NO, sowie Substrataffinitäten. Der wichtigste Unterschied zwischen beiden Heterodimeren liegt in ihrer subzellulären Lokalisation: die α_2 -Untereinheit ermöglicht die Membranassoziation der $\alpha_2\beta_1$ -Isoform (Rußwurm *et al.*, 2001), während die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform zytosolisch vorliegt.

Nach ihren Primärstrukturen kann man die verschiedenen Untereinheiten in jeweils drei Bereiche einteilen. Die C-terminalen Regionen weisen ausgeprägte Homologien zueinander auf. In diesem Bereich befindet sich die katalytische Domäne (Wedel *et al.*, 1995), die nicht nur in membrangebundenen GCs, sondern auch in Adenylyl-Cyclasen konserviert ist (Koesling *et al.*, 1990; Tesmer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Auch die zentralen Regionen enthalten konservierte Abschnitte. Die N-terminalen Regionen beinhalten die regulatorische Domäne und weisen vergleichsweise geringe Homologien auf. Daher kann von einer unterschiedlichen Regulation der beiden Isoformen ausgegangen werden. Das Histidin-105 der β_1 -Untereinheit spielt eine entscheidende Rolle bei der Stimulierung der NO-GC durch NO, denn es fungiert als proximaler Ligand der prosthetischen Hämgruppe (Wedel *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1998).

Die katalytische Aktivität der NO-GC kann durch NO und NO-freisetzende Substanzen um den Faktor 200 stimuliert werden (Gerzer *et al.*, 1981; Humbert *et al.*, 1990; Stone und Marletta, 1995). Zur Untersuchung des Mechanismus der NO-Stimulation wurden die optischen Eigenschaften der prosthetischen Hämgruppe (Gerzer *et al.*, 1981) ausgenutzt (Stone und Marletta, 1994). Das Absorptionsspektrum der NO-GC zeigt ein Maximum bei 430 nm, das als Soret-Bande bezeichnet wird. Dies spricht für ein fünffach koordiniertes Häm-Eisen mit einem Histidin als axialem Liganden. Bindet NO an die sechste Koordinationsstelle, bricht die proximale Histidin-Eisen-Bindung auf. Dadurch entsteht ein fünffach koordinierter Nitrosyl-Eisen-Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 398 nm aufweist. Für die Aktivierung des Enzyms ist das Aufbrechen der Histidin-Eisen-Bindung notwendig, alleine jedoch nicht hinreichend. So wurde beispielsweise durch die Mutation des Histidin-105 der NO-GC- β_1 -Untereinheit zu Phenylalanin ein Häm-defizientes und nicht NO-sensitives Enzym mit unveränderter Basalaktivität gewonnen (Wedel *et al.*, 1994). Dieses Enzym konnte mit Häm rekonstituiert werden (Foerster *et al.*, 1996), es konnte aber nicht durch NO stimuliert werden. Das Histidin-105 scheint infolgedessen nicht nur für die Häm-Bindung durch die Koordination des zentralen Eisenatoms notwendig, sondern offen-

bar auch an der intramolekularen Signalweiterleitung in einer bislang unbekanntem Weise beteiligt zu sein.

Abgesehen von NO wurden weitere Substanzen identifiziert, die die Aktivität der NO-GC beeinflussen. YC-1 ist ein Aktivator des Enzyms, der bei physiologisch vorkommenden NO-Konzentrationen eine Potenzierung der NO-vermittelten Stimulierung der NO-GC verursacht. (Wu *et al.*, 1995; Friebe *et al.*, 1996; Mülsch *et al.*, 1997). Durch YC-1 wird die Dosis-Wirkungs-Beziehung für NO um eine Größenordnung in Richtung einer niedrigeren Konzentration verschoben. Die Stimulation der NO-GC durch NO wird durch YC-1 also bereits bei einer 10-fach niedrigeren NO-Konzentration möglich. Neben diesem stimulatorischen Effekt auf die NO-GC zeigt YC-1 einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphodiesterase 5 (PDE5). Dadurch wird zusätzlich der Abbau des zellulären cGMPs vermindert (Friebe *et al.*, 1998; Galle *et al.*, 1999). Mit BAY41-2272 wurde ein weiterer Aktivator der NO-GC entwickelt. BAY41-2272 kann die NO-GC um den Faktor 30 stimulieren und führt ebenfalls zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber NO. Es ist dabei etwa 100fach potenter als YC-1 (Stasch *et al.*, 2001). Auch BAY41-2272 hemmt die PDE5 (Müllershausen *et al.*, 2004). Ein weiterer NO-GC-Aktivator, BAY58-2667, stimuliert die NO-GC Häm-unabhängig. BAY58-2667 interagiert mit bestimmten Aminosäuren der NO-GC, die im Häm-bindenden Bereich liegen. *In vivo* führte BAY58-2667 zu einer Inhibition der Thrombocytenaggregation und zur Vasorelaxation. Diese Wirkung unterlag nicht der Nitrat-Toleranz, weshalb BAY58-2667 eine Alternative zur Behandlung kardiovaskulärer Krankheiten darstellen könnte (Stasch *et al.*, 2002).

Auch ein selektiver Hemmstoff für die NO-GC wurde beschrieben, das 1H-[1,2,4]-Oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-on (ODQ) (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996). ODQ oxidiert die Häm-Gruppe der NO-GC, was zu einem Verlust der NO-Stimulierbarkeit des Enzyms führt.

1.1.3 Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen

Neben der NO-GC gibt es auch membranständige GCs, die nicht durch NO aktiviert werden. Diese partikulären Guanylyl-Cyclasen werden durch die Bindung natriuretischer Peptide stimuliert, sind also Rezeptor-gekoppelt. Als Homodimere oder Homotetramere bilden sie katalytisch aktive Rezeptoren (Iwata *et al.*, 1991; Chinkers und Wilson, 1992; Lowe, 1992). Ihre Primärstruktur weist eine N-terminale extrazelluläre Ligandenbindungsstelle auf, die die Spezifität für den Liganden bestimmt. Es folgen eine die Zellmembran

durchspannende Domäne und ein intrazellulärer terminaler Bereich, der für die Katalyse verantwortlich ist. Er beinhaltet eine Kinase-Homologie-Domäne, eine amphipathische Gelenkregion und eine katalytische Domäne. Die ATP-bindende Kinase-Homologie-Domäne zeigt einen negativen regulativen Einfluß auf die Katalyse; ihre Deletion resultiert in einer daueraktiven GC (Chinkers und Gabers, 1989). Die amphipathische Gelenkregion vermittelt bei der Dimerisierung den Kontakt beider Untereinheiten miteinander (Wilson und Chinkers, 1995).

Bislang wurden sieben Isoformen der membrangebundenen GC identifiziert. Man bezeichnet sie als GC-A bis GC-G (Drewett und Gabers, 1994). Sie unterscheiden sich besonders in ihren extrazellulären Ligandenbindungsdomänen. Bisher konnten nur für die GC-A, GC-B und GC-C physiologische Liganden identifiziert werden.

Die GC-A wird in vielen Geweben exprimiert (Lowe *et al.*, 1989; Wedel und Garbers, 2001) und durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) stimuliert. Das ANP wird in Vorhofmyocyten gebildet. Eine ANP-Ausschüttung führt u. a. zur Diurese und Natriurese und auch zu einer Vasodilatation; die hervorgerufenen Effekte wirken einem erhöhten Blutdruck und Blutvolumen entgegen. BNP wird in neuronalem Gewebe, aber auch in Myocyten gebildet.

Die GC-B wird durch das C-Typ-natriuretische Peptid (CNP) aktiviert (Koller *et al.*, 1991; Thompson und Garbers, 1995). CNP wird in Gehirnzellen (Sudoh *et al.*, 1990), in Endothelzellen (Suga *et al.*, 1993) und in Makrophagen (Vollmar und Schulz, 1995) synthetisiert. Die Aktivierung der GC-B resultiert in einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur.

Die GC-C wird vornehmlich im Intestinaltrakt exprimiert, aber auch in Niere, Hoden, Plazenta und Leber. Sie fungiert als Rezeptor für Peptid-Hormone der Guanylin-Familie. Als erster Ligand wurde das hitzestabile Enterotoxin STa identifiziert, das von *E. coli*-Bakterien gebildet werden kann (Schulz *et al.*, 1990; de Sauvage *et al.*, 1991). Die STa-vermittelte Aktivierung der GC-C führt beim Menschen zu schweren sekretorischen Diarrhöen (Field *et al.*, 1978; Rao *et al.*, 1979; Thorne *et al.*, 1979; Schulz *et al.*, 1989, 1990). Die physiologische Rolle der beiden endogenen Liganden Guanylin und Uroguanylin ist bislang nicht vollständig geklärt (Klodt *et al.*, 1997).

Die GC-D wird im Riechepithel exprimiert (Meyer *et al.*, 2000), in einer Subpopulation von Geruchssinneszellen, die an der Detektion von Pheromonen beteiligt sein könnten (Juilfs *et al.*, 1997). Sie fungiert möglicherweise als Geruchsrezeptor (Fülle *et al.*, 1995),

ihre Aktivierung und ihre physiologische Funktion konnte bisher jedoch nicht geklärt werden.

GC-E und GC-F werden in der Retina exprimiert (Lowe *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995). Ihre Liganden sind bislang unbekannt (Yang *et al.*, 1995; Wedel und Garbers, 2001).

Die GC-G wird in Lunge, Interstitium und Skelettmuskulatur exprimiert (Schulz *et al.*, 1998), auch ihre Liganden und Funktionen konnten noch nicht geklärt werden.

1.1.4 cGMP-abhängige Proteinkinasen

cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) stellen den wahrscheinlich wichtigsten Effektor für cGMP im kardiovaskulären System dar. Über die Proteinkinase-vermittelte Phosphorylierungen unterschiedlicher Substrate wird die Mehrheit der bisher identifizierten NO/cGMP-Effekte vermittelt. PKGs gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und werden durch die Bindung von cGMP aktiviert. PKGs liegen in der Zelle als Homodimere vor, ihre Dimerisierung ist jedoch keine Voraussetzung für eine katalytische Aktivität (Pfeifer *et al.*, 1999).

Es gibt zwei Isoformen der PKGs, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Deren Produkte werden als PKGI (Wernet *et al.*, 1989) bzw. PKGII (Jarchau *et al.*, 1994) bezeichnet. Aus dem PKGI-Gen entstehen durch alternatives Spleißen zwei unterschiedliche Protein-Produkte, PKGI α oder PKGI β . Diese beiden Spleißvarianten unterscheiden sich in den N-terminalen 100 Aminosäuren, was in unterschiedlichen cGMP-Affinitäten resultiert. Die beiden cGMP-Bindungsstellen der PKGI α zeigen jeweils eine hohe und eine niedrige Affinität gegenüber cGMP. Die hohe Affinität ist auf eine positive Kooperativität zwischen beiden Bindungsstellen zurückzuführen. Die PKGI β besitzt zwei gleichwertige Bindungsstellen.

Die PKGI wird hauptsächlich in Thrombocyten und in glatter Gefäßmuskulatur exprimiert (Keilbach *et al.*, 1992). Sie vermittelt die Hemmung der Thrombocytenaggregation und die Relaxation glatter Muskelzellen, und übernimmt damit die Regulation wichtiger physiologischer Effekte (Diamond *et al.*, 1978; Haslam *et al.*, 1978; Axelson *et al.*, 1979; Mellion *et al.*, 1981). Als Substrate der PKGI fungieren Proteine, die an der Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beteiligt sind, wie beispielsweise der IP₃-Rezeptor (Komalavilas und Lincoln, 1996; Haug *et al.*, 1999) und Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle (BK_{Ca}-Kanäle) (Alioua *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 1999). Auch die Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (MLCP) wird von der PKGI phosphoryliert (Nakamura *et al.*, 1999; Surks *et*

al., 1999), ebenso das Protein IRAG (Schlossmann *et al.*, 2000). Letzteres liegt in glatten Muskelzellen mit dem IP₃-Rezeptor assoziiert vor. Die Phosphorylierung von IRAG durch die PKGI führt zu einer Hemmung der IP₃-stimulierten Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Ammendola *et al.*, 2001). In den Thrombocyten und der glatten Muskulatur fungiert das zytoskelettal vorliegende Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) auch als Substrat der PKGI (Walter *et al.*, 1993; Markert *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2004).

Die PKGII wird vornehmlich im Gehirn, im Gastrointestinalgewebe, in der Niere, in Chondrozyten und in der Lunge exprimiert (Uhler, 1993; Jarchau *et al.*, 1994; Lohmann *et al.*, 1997) und ist über eine N-Myristoylierung membranassoziiert (Hofmann *et al.*, 2000). Das einzige bisher bekannte physiologische Substrat der PKGII ist der CFTR-Kanal (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Dessen Phosphorylierung führt zu einer verstärkten Sekretion von Chlorid-Ionen und Wasser (Vaandrager *et al.*, 1998).

PKGs können strukturell in drei Domänen unterteilt werden, eine N-terminale Domäne, eine regulatorische Domäne und eine katalytische Domäne. Die regulatorische Domäne beinhaltet zwei aufeinanderfolgende cGMP-Bindungsstellen, die zur Familie der im Laufe der Evolution hoch konservierten sogenannten CAP-Domänen (*catabolite activator protein*) gehören (Li und Lester, 1999). In der katalytischen Domäne sind eine Substratbindungsstelle und eine Mg-ATP-Bindungsstelle lokalisiert. Die N-terminale Domäne enthält ein Leucin-Zipper-Motiv aus 5 bis 6 heptad-repeats (Atkinson *et al.*, 1991), das die Dimerisierung der PKGI und deren Interaktionen mit Substratproteinen, wie z.B. IRAG, ermöglicht. Diese Domäne beinhaltet zudem eine neun Aminosäuren umfassende autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz, deren hemmender Einfluß auf die katalytische Domäne durch Bindung von cGMP aufgehoben wird. Vor der Phosphorylierung von Substratproteinen wird die PKGI in der Nähe der Pseudosubstratsequenz am N-Terminus autophosphoryliert, wodurch die Affinität der PKGI gegenüber cGMP erhöht wird (Hofmann *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1996; Vaandrager *et al.*, 1997).

1.1.5 Phosphodiesterasen

cGMP-bildende Guanylyl-Cyclasen werden entweder durch Bindung natriuretischer Peptide oder durch NO stimuliert (membranständige GCs und NO-sensitive GCs, s. 1.1.2 und 1.1.3). Eine Aktivierung der cAMP-bildenden Adenylyl-Cyclasen (AC) erfolgt z.B. durch Bindung bestimmter Hormone an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), wie bei-

spielsweise durch Bindung von Adrenalin an den β -adrenergen Rezeptor. Der Abbau der cyclischen Nukleotide wird durch Phosphodiesterasen katalysiert. Innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade übernehmen die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen eine wichtige Rolle. Sie bauen das Signalmolekül cGMP ab und definieren damit die Intensität und den zeitlichen Rahmen eines cGMP-Signals (Müllershausen *et al.*, 2004).

Bisher wurden in Säugerzellen elf verschiedene PDE-Familien (PDE1-11) identifiziert. Unterschiede liegen in der Gewebeverteilung, der subzellulären Lokalisation, der Regulation sowie der Substrat- und Inhibitorspezifität (Francis *et al.*, 2001). Diese elf PDE-Familien können aufgrund ihrer Substratspezifität in 3 Gruppen unterteilt werden, die cGMP-spezifischen PDEs, PDEs mit gemischter Spezifität, und cAMP-spezifische PDEs. Allen PDEs gemeinsam ist der Aufbau aus C-terminaler katalytischer Domäne und N-terminaler regulatorischer Domäne. Die katalytischen Domänen aller PDE-Familien sind hochkonserviert, während sich die regulatorischen Domänen voneinander unterscheiden. Mit Ausnahme der PDE6 liegen alle PDEs als Homodimere in der Zelle vor.

1.1.5.1 PDE-Familien mit cGMP-Spezifität

Drei der elf bekannten Familien, PDE5, PDE6 und PDE9, weisen eine hohe Spezifität für cGMP auf. Die PDE5 stellt die cGMP-bindenden, cGMP-hydrolysierenden PDEs dar. In Säugetieren gibt es drei verschiedene Spleißvarianten der PDE5, PDE5A1-PDE5A3, die funktionell nicht voneinander unterschieden werden können (Lin *et al.*, 2000). Die PDE5 liegt als Homodimer im Zytosol vor. Sie wird in Lunge, glatter Gefäßmuskulatur, Thrombocyten, Corpus cavernosum und Niere exprimiert (Loughney *et al.*, 1998; Haslam *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). In der N-terminalen Region der PDE5 sind zwei GAF-Domänen lokalisiert (GAF-A und GAF-B), von denen mindestens eine für die cGMP-Bindung verantwortlich ist (Rybalkin *et al.*, 2003). Der Name „GAF-Domäne“ wurde abgeleitet von den Namen der Proteine, in denen dieses Sequenzmotiv zuerst gefunden wurde (cGMP-abhängige Phosphodiesterasen, Adenylyl-Cyclasen, und FhIA [*E. coli formate hydrogen lyase transcriptional activator*]). Spezifisches Merkmal der GAF-Domänen ist das evolutionär hochkonservierte Motiv [N(K/R)X_nFX₃DE], das bisher in mehr als 1000 Proteinen in verschiedenen Organismen identifiziert werden konnte (Aravind und Ponting, 1997; Anantharaman *et al.*, 2001; Kanacher *et al.*, 2002). Die Bindung von cGMP an die GAF-Domäne führt zu einer gesteigerten katalytischen Aktivität der PDE5 (Corbin *et al.*, 2000; Müllershausen *et al.*, 2003). Am N-Terminus des Enzyms befindet sich neben den beiden

GAF-Domänen eine Phosphorylierungsstelle, das Ser-102. Voraussetzung für eine PKA- oder PKG-vermittelte Phosphorylierung ist die Bindung von cGMP an die GAF-Domäne (Turko *et al.*, 1998). *In vitro* konnte nach der Phosphorylierung eine Erhöhung der katalytischen Aktivität der PDE5 aufgezeigt werden (Corbin *et al.*, 2000; Müllershausen *et al.*, 2001, 2005). Folglich ist bei der PDE5 eine intramolekulare Kommunikation zwischen der katalytischen und der regulatorischen Domäne anzunehmen. So führte die Bindung von Inhibitoren und nicht-hydrolysierbaren cGMP-Analoga an die katalytische Domäne zu einer Verstärkung der Bindung von cGMP an die regulatorischen GAF-Domänen (Thomas *et al.*, 1990; Turko *et al.*, 1999). Die PDE5 kann durch den Wirkstoff Sildenafil spezifisch gehemmt werden (Ballard *et al.*, 1998; Corbin und Francis, 1999). Dieser Wirkstoff wird unter dem Namen ViagraTM zur medikamentösen Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt (Bollet *et al.*, 1996; Burnett *et al.*, 2005). Dabei beeinflusst das Sildenafil die NO/cGMP-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur des Corpus cavernosum und der zuführenden Arterien. Der Einsatz von Sildenafil bei der pulmonalen Hypertonie befindet sich zur Zeit in der klinischen Prüfung (Toward *et al.*, 2004; Fan Chung *et al.*, 2006).

Die PDE6, die in Stäbchen- und Zapfenzellen der Vertebratenretina exprimiert wird, fungiert als Schlüsselenzym im Sehprozeß (Gillespie und Beavo, 1988). Sie ist ein Heterodimer, bestehend aus zwei verschiedenen katalytischen Untereinheiten, α und β . Ein solches PDE6-Dimer liegt gewöhnlich in einem Komplex mit zwei inhibitorischen P γ -Untereinheiten vor (Hurley und Stryer, 1982; Artemyev *et al.*, 1998). Die PDE6 besitzt pro Monomer zwei cGMP-bindende GAF-Domänen, die homolog zu den GAF-Domänen der PDE2, PDE5 und PDE10 sind. An die GAF-Domäne gebundenes cGMP verursacht eine herabgesetzte Affinität der PDE6 für die inhibitorischen Untereinheiten. Die Aktivität der PDE6 wird ebenfalls durch das heterotrimere G-Protein Transducin reguliert. Bei der Licht-vermittelten Aktivierung bewirkt das G-Protein-gekoppelte Rhodopsin einen Austausch von gebundenem GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des Transducins (Pellicone *et al.*, 1985). Diese dissoziierte α -Untereinheit interagiert mit dem PDE6-P γ -Komplex, wodurch die inhibitorische Wirkung der P γ -Untereinheiten aufgehoben wird. Die katalytische Aktivität der PDE6 nimmt dementsprechend zu, und es kommt zu einer Herabsetzung der intrazellulären cGMP-Konzentration. Diese führt zu einer Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit cGMP-regulierter Ionenkanäle. Es kommt zu einer Hyperpolarisation in den Photorezeptorzellen und damit zur Reizweiterleitung (Gillespie und Beavo, 1988).

Mitglieder der PDE9-Familie werden in der glatten Muskulatur des Dünndarms, in der Niere, in Leber, Lunge, Gehirn, Skelettmuskel, Thymus und Milz exprimiert. Ihre physiologische Relevanz ist bisher nicht geklärt (Soderling und Beavo, 2000).

1.1.5.2 PDE-Familien mit gemischter Spezifität

Mitglieder der PDE-Familien mit gemischter Spezifität bauen cAMP und cGMP ab. Zu ihnen gehören die PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 und PDE11.

Die Mitglieder der PDE1-Familie werden durch die Bindung von Ca/CaM aktiviert. Sie werden von drei verschiedenen Genen codiert, deren Produkte (PDE1A, 1B und 1C) sich in ihrer Expression und in ihren katalytischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Die PDE1A wird in Hoden, Aorta, Lunge und Herz am stärksten exprimiert (Juilfs *et al.*, 1999), die PDE1B in verschiedenen Regionen des ZNS (Yu *et al.*, 1997) und die PDE1C im olfaktorischen Epithel und in proliferierenden humanen Gefäßmuskelzellen (Yan *et al.*, 1996; Rybalkin *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001; Rybalkin *et al.*, 2002). Vincapocetin ist ein potenter Inhibitor der PDE1 (Hagiwara *et al.*, 1984).

Mitglieder der PDE2-Familie werden im ZNS, im Herzen, in olfaktorischen Neuronen, in Thrombocyten, in vaskulären Endothelzellen und in der Nebenniere exprimiert, womit sie eine weitreichende Gewebeverteilung aufweisen (Sonnenburg *et al.*, 1991; Juilfs *et al.*, 1997; Rivet-Bastide *et al.*, 1997; Juilfs *et al.*, 1999; Sadhu *et al.*, 1999; Seybold *et al.*, 2005). In Thrombocyten spielt die PDE2 eine Rolle innerhalb der cAMP-vermittelten Aggregationshemmung. Im ZNS reguliert sie wahrscheinlich kognitive Prozesse und in der Nebenniere die Aldosteronsekretion. Die Kontraktilität von Herzmuskelzellen wird durch die PDE2-vermittelte Begrenzung des cAMP-stimulierten Ca²⁺-Einstroms herabgesetzt (Rivet-Bastide *et al.*, 1997). Mitglieder der PDE2-Familie besitzen zwei GAF-Domänen, die bei cGMP-Bindung einen stimulierenden Effekt auf die cAMP-Hydrolyse-Aktivität des Enzyms haben (Martinez *et al.*, 2002). Die PDE2 ist daher auch bekannt als cGMP-stimulierte PDE. Sie übernimmt somit eine wichtige Rolle im *cross talk* zwischen den cAMP- und cGMP-Signalwegen.

Die PDE3 spielt ebenso wie die PDE2 eine wichtige Rolle bei der Begrenzung der cAMP-vermittelten Zunahme der Kontraktilität von Herzmuskelzellen. Bei geringen cGMP-Konzentrationen baut sie auch cGMP ab, bis sie mit zunehmender Konzentration durch cGMP gehemmt wird (Juilfs *et al.*, 1999). Therapeutisch werden die spezifischen PDE3-Inhibitoren Milrinon und Amrinon zur Behandlung der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt. Die

PDE3 wird im Herzmuskel sowie im Fettgewebe, Gefäßmuskel, Leber und Thrombocyten exprimiert. Sie kann Hormon-bedingt phosphoryliert werden, was ihre Aktivierung zur Folge hat (MacPhee *et al.*, 1988; Degermann *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 2001).

Die PDE10 wird in Gehirn und Hoden exprimiert und enthält zwei GAF-Domänen (Soderling *et al.*, 1999). Sie wird unter physiologischen Bedingungen durch cAMP inhibiert und hydrolysiert cGMP (Soderling *et al.*, 1999). Im Gehirn konnte der PDE10 eine wichtige Rolle im Rahmen der synaptischen Plastizität zugeordnet werden (O'Connor *et al.*, 2004).

Die PDE11 wird in Prostata, Skelettmuskel, Niere, Leber, Hypophyse, Speicheldrüse, Hoden und in Spermatozoen exprimiert, sie zeigt also eine weitreichende Gewebeverteilung (Loughney *et al.*, 2005). Unter physiologischen Bedingungen hydrolysiert die PDE11 sowohl cAMP als auch cGMP (Fawcett *et al.*, 2000). Für die PDE11 wurde eine Rolle bei der Spermatogenese und auch bei der Fertilisierung von Samenzellen beschrieben (Wayman *et al.*, 2005).

1.1.5.3 PDE-Familien mit cAMP-Spezifität

Die PDE4-, PDE7- und die PDE8-Familie hydrolysieren cAMP mit hoher Spezifität. Die PDE4-Familie wird von vier verschiedenen Genen codiert (PDE4A-PDE4D), die wiederum in jeweils bis zu 5 Spleißvarianten vorkommen. Die PDE4-Familie spielt eine wichtige Rolle in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen und Bronchien, in neuronalen und endokrinen Geweben und bei inflammatorischen Prozessen (Conti, 2000; Hansen *et al.*, 2000; Houslay und Adams, 2003). Die Mitglieder der PDE4-Familie stellen in den meisten Geweben die wahrscheinlich wichtigste PDE für den cAMP-Abbau dar.

Die PDE7-Familie übernimmt eine wichtige Funktion bei der Rezeptor-vermittelten Aktivierung von T-Lymphocyten (Li *et al.*, 1999; Li und Lester, 1999).

Die PDE8 wird vorwiegend in Hoden, Ovarien, Colon und Dünndarm exprimiert (Fisher *et al.*, 1998). Die PDE8 spielt eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis-vermittelten Migration aktivierter Lymphocyten. Ein spezifischer Inhibitor könnte bei inflammatorischen Krankheiten therapeutisch eingesetzt werden (Dong *et al.*, 2006).

1.1.6 Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs

Die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade übernimmt wichtige Aufgaben im kardiovaskulären System, wie beispielsweise die Senkung des Blutdrucks durch die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Seit circa 130 Jahren werden NO-freisetzende Substanzen (NO-Donatoren), meist Nitroglycerin, bei kardiovaskulären Krankheiten therapeutisch eingesetzt. Das NO bewirkt eine Vasodilatation in den Koronararterien und im venösen System. Dadurch sinkt die Vorlast am rechten Vorhof, und der Füllungsdruck der Ventrikel und die systolische Wandspannung nehmen ab. Insgesamt sinkt also der myokardiale Sauerstoffverbrauch bei möglicherweise verbesserter Sauerstoffversorgung. Die häufige Applikation von NO-Donatoren führt jedoch zu einer Abschwächung seiner gefäßrelaxierenden Wirksamkeit, was als Nitrat-Toleranz bezeichnet wird. Die Ursachen dieser Nitrat-Toleranz konnten noch nicht eindeutig geklärt werden, wahrscheinlich sind jedoch mehrere Faktoren daran beteiligt und es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Findet im Gefäßmuskel eine erhöhte Superoxidproduktion statt, reagiert dieses mit NO zu Peroxynitrit, wodurch die NO-Konzentration abnimmt, und nicht mehr für die Aktivierung der NO-sensitiven GC zur Verfügung steht (Münzel *et al.*, 1995, 1999; Pagano *et al.*, 1995; Parker und Gori, 2001). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bietet eine verminderte Biokonversion der verabreichten organischen Nitratverbindungen, was in einer verringerten Freisetzung von NO resultiert (Kowaluk *et al.*, 1987; Mülsch *et al.*, 1988). Mögliche Gründe der Nitrat-Toleranz sind eine neurohumorale Gegenregulation sowohl durch das Renin-Angiotensin-System als auch durch Sympathikus-Aktivierung, sowie eine verringerte Aktivität der NO-sensitiven GC (Bellamy *et al.*, 2000). Auch die cGMP-abbauende Phosphodiesterase 5 könnte eine Rolle bei der Nitrat-Toleranz spielen, denn sie bestimmt die Länge und die Intensität eines cGMP-Signals entscheidend mit (Müllershausen *et al.*, 2003). So konnte in Untersuchungen zur cGMP-vermittelten Hemmung der Thrombocytenaggregation nach einer kurzen NO-Stimulation eine zunehmende PKGI-vermittelte Phosphorylierung der PDE5 detektiert werden, die mit einer gesteigerten Aktivität der PDE5 einherging und über eine Stunde andauerte. Innerhalb dieses Zeitraums war die Empfindlichkeit des NO/cGMP-vermittelten Signalwegs gegenüber nachfolgenden NO-Stimulationen herabgesetzt. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus kann an der Nitrat-Toleranz beteiligt sein.

1.2 Die glatte Muskulatur

Glatte Muskelzellen sind meist spindelförmig und haben eine Vielzahl elektrischer und mechanischer Verbindungen miteinander. Im Vergleich zu quergestreiften Muskelzellen besitzen glatte Muskelzellen die Regulatorproteine Kalponin und Kaldesmon anstelle des Troponins, sowie CaM als Ca^{2+} -Schalter. Daraus resultieren sowohl eine 100- bis 1000fach niedrigere Myosin-ATPase-Aktivität als auch ein geringerer Sauerstoffverbrauch als in der quergestreiften Muskulatur. Glatte Muskeln spielen dementsprechend eine wichtige Rolle z.B. bei energiesparenden Haltefunktionen. Man unterscheidet tonische Muskeln, welche zu einer langanhaltenden Dauerkontraktion befähigt sind, von phasischen Muskeln, die oft rhythmisch tätig sind. Entsprechende Beispiele stellen die Muskelzellen von Arterien bzw. die Darmmuskulatur dar.

Funktionell werden die glatten Muskeln unterteilt in den *single-unit*-Typ und den *multi-unit*-Typ. Zellen vom *single-unit*-Typ sind über *gap junctions* niederohmig miteinander gekoppelt, so daß sie eine funktionelle Einheit bilden. Sie besitzen eine spontane myogene, rhythmische Aktivität und werden vegetativ durch einen losen Kontakt mit der Nervenzelle moduliert. Wichtig für die Erregungsweiterleitung ist der Dehnungszustand des Muskels. Dehnung depolarisiert die Zellmembran und führt zu einer erhöhten *Spike*-Frequenz. Eine Zunahme der elektrischen Aktivität resultiert in einer Zunahme der mechanischen Aktivität. Zum *single-unit*-Typ zählen z.B. die Darmmuskulatur, Muskeln von Uterus und Ureter sowie einige Gefäßmuskeln. Zum *multi-unit*-Typ gehören beispielsweise der Iris-muskel, die Ziliarmuskulatur und der Samenleiter. Muskelzellen vom *multi-unit*-Typ werden über ihre zahlreich vorhandenen vegetativen Nervenfasern in kleinen Einheiten lokal erregt. Jede Einheit kann aber auch von vegetativen Nervenfasern separat erregt werden. Die Einheiten selber sind kaum oder wenig spontan aktiv, der Muskeltonus ist also neurogen.

1.2.1 Molekulare Mechanismen der Kontraktion glatter Muskulatur

Die Kontraktion glatter Muskulatur wird herbeigeführt durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels entweder durch elektrische oder durch hormonale Reize. Eine Depolarisation der Zellmembran kann beispielsweise eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ bewirken. Binden Hormone wie Noradrenalin, Angiotensin II, Vasopressin, Endothelin-1, Serotonin oder Thromboxan A_2 an ihre

Rezeptoren, wird ein G-Protein der G_q -Familie aktiviert. Dies wiederum stimuliert die Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-bis-Phosphat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) spaltet. IP_3 vermittelt eine Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, woraufhin die Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK) Ca/CaM -abhängig aktiviert wird. Die MLCK phosphoryliert die leichte Kette des Myosins (MLC). Durch diese Phosphorylierung der MLC wird die Interaktion mit Aktinfilamenten ermöglicht, woraufhin es zu einer Kontraktion (Filamentverschiebung und ATP-Spaltung) kommt. Neben dieser beschriebenen Phosphorylierung der MLC, die über einen erhöhten Ca^{2+} -Spiegel reguliert wird, kann der Phosphorylierungszustand der MLC auch Ca^{2+} -unabhängig beeinflusst werden (Klages *et al.*, 1999). So aktivieren verschiedene Hormone (z.B. TXA_2) auch G-Proteine der $G_{12/13}$ -Familie. Diese stimulieren die kleine GTPase RhoA, die daraufhin die Rho-Kinase (ROK) aktiviert, eine Serin/Threonin-Kinase. Die ROK phosphoryliert die MLCP und inaktiviert sie dadurch (Abb. 2). Daraufhin kommt es zu einer Anreicherung an phosphoryliertem Myosin, und eine Kontraktion kann bei einer wesentlich geringeren Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst werden als bei ungehemmter Phosphatase. Diese Hemmung der MLCP über den Ca^{2+} -unabhängigen Signalweg wird daher auch als Ca^{2+} -Sensitisierung bezeichnet. Dagegen wird bei einer Hemmung der MLCK, z.B. durch cAMP, die Myosin-Phosphorylierung und gleichzeitig die Kontraktion auch bei gleichbleibendem Ca^{2+} -Spiegel verringert. Dieser Fall wird als Ca^{2+} -Desensitisierung bezeichnet. Der Tonus, also der Kontraktionszustand der glatten Muskulatur, hängt vom Phosphorylierungszustand der MLC ab. Dieser wird bestimmt durch die Aktivitäten der MLCK und der MLCP, die über Ca^{2+} -abhängige oder Ca^{2+} -unabhängige Signale Kontraktionen auslösen können, und die auch die Ansprechbarkeit der kontraktile Proteine regulieren.

Die Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion übernimmt eine wichtige Funktion bei der tonischen Kontraktion (Somlyo *et al.*, 1994; Uehata *et al.*, 1997), während der Ca^{2+} -abhängige Signalweg eher bei der phasischen Kontraktion eine Rolle spielt. Das bei der Ca^{2+} -abhängigen Kontraktion gebildete DAG kann auch die Proteinkinase C aktivieren, was eine langanhaltende, tonische Kontraktion zur Folge hat. Ein besonderer Fall ist die als „Latch“ bezeichnete Dauerkontraktion, bei der die Querbrücken protrahiert verankert sind. Der genaue Mechanismus dieser energiesparenden Kontraktion konnte bisher nicht geklärt werden.

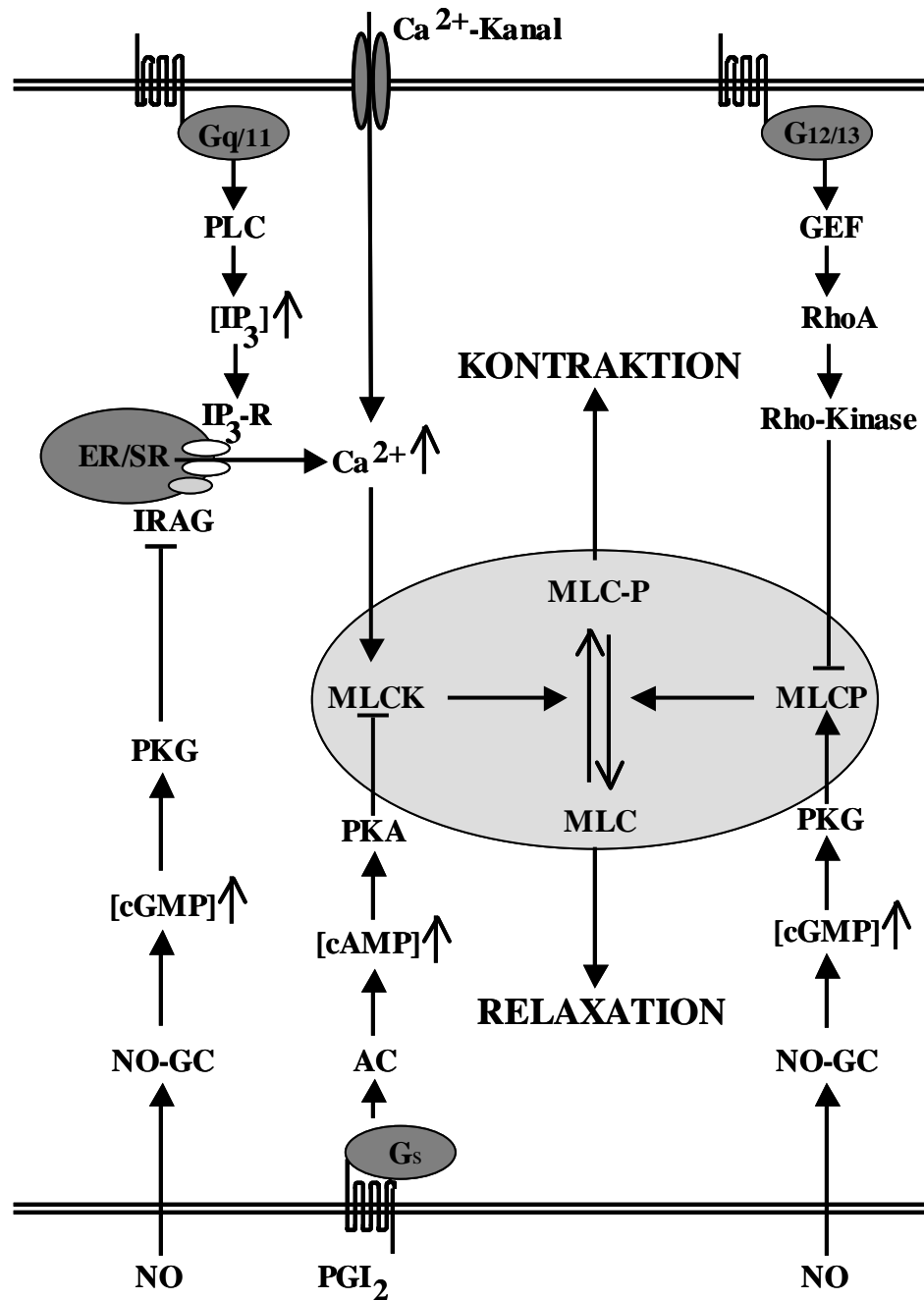


Abb. 2: Signalkaskaden der Kontraktion und Relaxation in der glatten Muskulatur

Signalwege, die zur Kontraktion der glatten Muskulatur führen, sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Signalkaskaden, die zu einer cGMP- bzw. cAMP-vermittelten Relaxation der glatten Muskulatur führen, befinden sich im unteren Teil. Die Muskelproteine wurden hervorgehoben.

1.2.2 Molekulare Mechanismen der Relaxation glatter Muskulatur

Die Relaxation glatter Muskelzellen wird herbeigeführt durch Bildung der Signalmoleküle cGMP bzw. cAMP, die auf verschiedenen Wegen den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel senken. Durch die Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration in der glatten Muskelzelle nimmt die Aktivität der Ca/CaM-abhängigen MLCK ab, und eine Relaxation wird eingeleitet. Die NO/cGMP-Signaltransduktionskaskade spielt eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System, in dem sie die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt. Die auf die Wand eines Blutgefäßes wirkende Scherkraft des fließenden Blutes führt direkt oder indirekt zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit unspezifischer Ca^{2+} -permeabler Kationenkanäle (Nilius und Droogmans, 2001). Auch die Bindung bestimmter Neurotransmitter, wie z.B. Acetylcholin, an ihre Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Endothelzellen. Durch die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird die eNOS aktiviert, die NO bildet. Auch eine Ca^{2+} -unabhängige Phosphorylierung des Enzyms aktiviert die eNOS (siehe 1.1.1; Abb. 1). Das NO führt zur Aktivierung der NO-sensitiven GC in der angrenzenden Gefäßmuskulatur und auch in den Thrombocyten, die sich im Gefäßlumen befinden. Das Signalmolekül cGMP stimuliert den beim Vorgang der Relaxation wichtigsten cGMP-Effektor, die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKGI) (Lincoln *et al.*, 1994). In Gefäßmuskelzellen kann auch die Aktivierung einer membrangebundenen GC infolge Bindung natriuretischer Peptide in einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration resultieren (s. Abb. 1).

Bisher wurden drei verschiedene Mechanismen der cGMP-vermittelten Relaxation beschrieben. Zum einen kann die MLCP von der PKGI phosphoryliert und damit aktiviert werden. Sie dephosphoryliert dann die MLC, wodurch die Aktin-Myosin-Interaktion reduziert wird. Es kommt direkt zu einer Relaxation. Das Protein IRAG (*IP₃-receptor-associated cGMP-dependent kinase-substrate*) und BK_{Ca} -Kanäle sind weitere Substrate, die von der PKGI phosphoryliert werden können. Beiden Substraten gemeinsam ist die Fähigkeit zur Auslösung einer Relaxation infolge der Senkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, wodurch die Aktivität der MLCK abnimmt. Die Reduktion des Ca^{2+} -Spiegels spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Relaxation (Abb. 2). Das Protein IRAG liegt mit dem IP_3 -Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums assoziiert vor. Die PKGI-vermittelte Phosphorylierung von IRAG bewirkt eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit des assoziierten Kanals, was in einer Hemmung der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR resultiert (Schlossmann *et al.*, 2000; Ammendola *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von

BK_{Ca}-Kanälen führt zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle. Entsprechend dem Konzentrationsgradienten kommt es zu einem Kalium-Ausstrom, der eine Hyperpolarisation der Zelle hervorruft. Das Membranpotential sinkt, womit auch die Offenwahrscheinlichkeit spannungskontrollierter L-Typ Ca²⁺-Kanäle und damit der Ca²⁺-Einstrom abnimmt (Alioua *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus ist maßgeblich an der cGMP-vermittelten Vasorelaxation beteiligt (Sausbier *et al.*, 2000).

1.2.3 Glatte Muskulatur: Rezeptorausstattung und Signalwege

Nach ihrer jeweiligen Rezeptorausstattung unterscheidet man drei verschiedene Typen glatter Muskulatur, den intestinalen Typ, den vaskulären Typ und das Bronchialsystem. Glatte Muskulatur vom intestinalen Typ weist Histamin-, Serotonin-, Acetylcholin-, Prostaglandin E- und F- sowie Oxytocin-Rezeptoren auf, die eine Kontraktion vermitteln können. Eine Besonderheit dieses Muskeltyps ist die Anwesenheit von α_2 -Rezeptoren, die eine Relaxation der Längsmuskulatur des Darms vermitteln können. Bei Muskeln vom vaskulären Typ wird eine Kontraktion durch α_1 - oder α_2 -, Angiotensin-, Serotonin-, Endothelin- und Vasopressin-Rezeptoren vermittelt. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 10⁻⁷ mol/l auf 10⁻⁶ bis 10⁻⁵ mol/l. Das Ca²⁺ kann dabei aus intrazellulären Speichern, beispielsweise dem sarkoplasmatischen Retikulum, stammen, und es wird schnell, jedoch zeitlich begrenzt freigesetzt. Eine nachfolgend eintretende und langandauernde Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels dagegen erfolgt durch einen Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Bereich über nicht-selektive Kationenkanäle (Trp-Kanäle). Die glatte Muskulatur vom Bronchialsystem stellt eine Mischform aus dem intestinalen und dem vaskulären Typ dar.

Der Tonus unterschiedlicher glattmuskulärer Organe wird entsprechend der jeweiligen Rezeptorausstattung auf verschiedene Weisen reguliert. So werden drei verschiedene Rezeptoren unterschieden, deren Stimulation eine Kontraktion herbeiführen kann, der adrenerge Weg über α_1 -Rezeptor-Stimulation, der cholinerge Weg über Stimulation nikotinischer oder muskarinischer Rezeptoren, oder über Stimulation von Serotonin-Rezeptoren. Die Aktivierung von α_1 -Rezeptoren z.B. durch das α -Sympathomimetikum Phenylephrin (PE) führt über die Stimulation von PLC und IP₃ zu einer Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, die über die MLCK-Aktivierung eine Kontraktion auslöst.

In glatten Muskelzellen führt die Aktivierung muskarinischer M₁- oder M₃-Rezeptoren über die Aktivierung eines G-Proteins der G_{q/11}-Familie zu einer Aktivierung von PLC und

IP₃. Es kommt zu einer Ca²⁺-Ausschüttung, durch die eine Kontraktion eingeleitet wird. In Endothelzellen wird über die Stimulation des muskarinischen M₃-Rezeptors die NO-Synthase aktiviert, was über die Aktivierung der NO-GC, und die cGMP-vermittelte Aktivierung der PKGI zu einer Relaxation führt. Da Acetylcholin sehr instabil ist, werden hauptsächlich Cholinester, wie zum Beispiel Carbachol eingesetzt. Es wirkt im Endothel vorwiegend über Aktivierung muskarinischer M₃-Rezeptoren relaxierend, während es in anderen Geweben über Stimulation von M₃-Rezeptoren eine Kontraktion auslöst.

Eine Kontraktion kann auch ausgelöst werden durch die Aktivierung von 5-HT₂-Rezeptoren, die über eine PLC-Aktivierung IP₃-vermittelt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöhen.

1.2.4 Pathophysiologie und pharmakologische Ansatzpunkte der glatten Muskulatur

Menschen, die kardiovaskulären Risikofaktoren ausgesetzt sind (z.B. arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinkonsum oder Diabetes mellitus), erkranken häufig an der endothelialen Dysfunktion, d.h. an einer verminderten Relaxationsfähigkeit der glatten Muskulatur. Diese kann durch eine Verengung von Herzkranzgefäßen oder von Arterien im ZNS zunächst zu einer Ischämie, d.h. einer Sauerstoffunterversorgung, oder auch bei entsprechender Dauer zur Nekrose von Zellen bzw. Gewebearealen (Infarkt) führen. Bei der endothelialen Dysfunktion werden Substanzen mit vasodilatatorischer Wirkung, wie z.B. NO, vermindert produziert. Auch die Produktion antiaggregatorischer Wirkstoffe (z.B. PGI₂) nimmt ab. Nach einer Schädigung des Endothels, z.B. infolge einer Entzündung, werden vermehrt LDL, Makrophagen und Thrombocyten in die Gefäßwand eingelagert (Atherosklerose). Bereits zu diesem Zeitpunkt ist eine verminderte NO-Produktion im Endothel feststellbar. Die Makrophagen nehmen vermehrt LDL auf und werden infolgedessen zu Schaumzellen, die vermehrt Wachstumshormone ausschütten. Durch die Wachstumshormone kommt es zu einer Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen, die lokale Ausbildungen von Gefäßwandverdickungen (Plaques) verursachen. Durch die Plaques kommt es zu Verwirbelungen des strömenden Bluts, die schließlich das mechanische Aufbrechen der Gefäßwand verursachen. An dieser Stelle werden Thrombocyten aktiviert und rekrutiert, gleichzeitig werden Hormone wie TXA₂ und Serotonin sezerniert, was zu einer Vasokonstriktion führt. Der Effekt der Vasokonstriktion wird durch die infolge der endothelialen Dysfunktion herabgesetzte Produktion von vasorelaxierenden und an-

tithrombotisch wirksamen Substanzen wie NO oder PGI₂ zusätzlich verstärkt. Dadurch wird die Bildung eines Thrombus begünstigt, der das Blutgefäß vollständig verschließt und einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall zur Folge haben kann. Eine myokardiale Ischämie äußert sich meist durch ausstrahlende Schmerzen im Brustbereich, der Angina pectoris. Therapeutisch werden antithrombotische Substanzen wie ASS und Heparin eingesetzt. Seit circa 130 Jahren werden zudem Nitrat- oder Nitrit-haltige organische Verbindungen, wie Nitroglycerin, verwendet. Deren Wirkprinzip beruht auf der Freisetzung von NO, was zu einer Vasodilatation im venösen System und in den Koronararterien führt. Die Dilatation der Venen senkt die Vorlast am rechten Herzvorhof, der Füllungsdruck der Ventrikel und die systolische Wandspannung sinken, und der Sauerstoffbedarf des Herzens ist reduziert. In die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade kann an verschiedenen Stellen pharmakologisch eingegriffen werden. Der Einsatz von NO-Pharmaka geht einher mit einer schnell eintretenden NO-Toleranz (s.1.1.6). NO-Donatoren setzen NO entweder spontan frei oder nach Metabolisierung. Weitere Möglichkeiten bieten NO-Sensitizer, wie beispielsweise YC-1, durch die die Wirkung von endogenem NO verstärkt wird. Die Wirkung des NOs wird über die NO-GC vermittelt, die dann vermehrt cGMP synthetisiert. Die Erhöhung der cGMP-Konzentration führt über die Aktivierung der cGMP-abhängigen PKGI zur Relaxation. Man kann den cGMP-Gehalt einer Zelle aber nicht nur durch die Stimulation der cGMP-Bildung, sondern auch durch die Hemmung des cGMP-Abbaus erhöhen. Sildenafil beispielsweise ist ein PDE5-spezifischer Hemmstoff (s.1.1.5.1). PDE-Inhibitoren hemmen den Abbau intrazellulären cGMPs, was zu einer verlängerten und verstärkten Relaxation führt. Den PDEs wird eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle des intrazellulären cGMP-Spiegels zugeschrieben, was sich auch an dem erfolgreichen therapeutischen Einsatz des PDE5-Hemmstoffs Sildenafil (ViagraTM) bei der erektilen Dysfunktion zeigt.

2. Zielsetzung

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade trägt entscheidend zur Regulation des Blutdrucks und zur Hemmung der Thrombocytenaggregation bei und übernimmt somit eine bedeutende Rolle innerhalb der kardiovaskulären Homöostase. Seit über 130 Jahren werden NO-freisetzende Substanzen zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt. Bei einer häufigen Applikation der NO-Pharmaka kommt es zur Abschwächung des gewünschten Effekts. Die dieser Nitrat-Toleranz zugrundeliegenden Mechanismen werden bis heute kontrovers diskutiert. In Thrombocyten konnte der Mechanismus einer schnellen und langanhaltenden Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs aufgeklärt werden (Müllershausen *et al.*, 2003). Hier konnte die durch wiederholte NO-Stimuli induzierte Abnahme der Responsivität des NO/cGMP-Signalwegs auf eine cGMP-abhängige Aktivierung und Phosphorylierung der cGMP-abbauenden Phosphodiesterase 5 zurückgeführt werden. In dieser Arbeit sollte die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade und deren Desensibilisierung in der glatten Muskulatur verschiedener Gewebe untersucht werden. Im Einzelnen sollten dazu folgende Themen bearbeitet werden:

1. In verschiedenen glattmuskulären Geweben, wie z.B. Aorta und Bronchus, sollte zunächst die NO-induzierte cGMP-Antwort im Zeitverlauf mittels RIA aufgelöst werden. Weiterhin sollte die Rolle der PDE5 innerhalb der cGMP-Antwort ermittelt werden.
2. Der physiologische Effekt der NO-induzierten cGMP-Antwort sollte in verschiedenen glattmuskulären Geweben in Organbadexperimenten verglichen werden.
3. Die bisher nur in Thrombocyten nachgewiesene NO-induzierte Desensibilisierung der cGMP-Antwort sollte in der glatten Muskulatur aufgezeigt werden. Darüberhinaus sollte die physiologische Relevanz dieser NO-induzierten Desensibilisierung in Organbadexperimenten untersucht werden.
4. Um zu klären, ob NO seine Effekte ausschließlich über die NO-GC vermittelt, oder ob weitere NO-Rezeptoren existieren, sollten Versuche mit Organen einer NO-GC-defizienten Maus durchgeführt werden.
5. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein neuer Hemmstoff der PDE2 eingesetzt, der unerwartete Ergebnisse lieferte. Es war daher ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluß der Substanz BAY60-7550 auf die NO-GC abzuklären.

3. Materialien und Methoden

3.1 Routinemethoden

3.1.1 Proteinbestimmung, Gelelektrophorese und Western-Blot

Die Proteinbestimmungen wurden mit Hilfe der BCA-Methode ('*b*icinchoninic *a*cid', Smith *et al.*, 1985) gemäß den Herstellerangaben (Pierce) durchgeführt.

Der Probenpuffer für die Gelelektrophorese nach Laemmli enthielt 10 % (v/v) Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau und 62,5 mM Tris, pH 6,6 (Laemmli, 1970). Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurde in Gelkammern (Mini-Protean II Cell, Bio-Rad) durchgeführt.

Die nach der Größe aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot, also durch den elektrischen Transfer der Proteine (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad), auf einer Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) fixiert. Nach Inkubation mit den jeweiligen proteinspezifischen, primären Antikörpern erfolgte eine weitere Inkubation mit einem sekundären, immunglobulin-spezifischen Antikörper, an den die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Zur Detektion der Antikörper wurde das 'BiowestTM extended duration bioluminescence detection kit' (UVP) verwendet, und die Chemolumineszenz wurde mit einer 16-bits CCD-Kamera in einer lichtisolierten Kammer (BiochemiTM GDS 8000 System, UVP) verfolgt.

3.1.2 Herstellung von radioaktiv-markiertem cyclischen Guanosinmonophosphat (Tracer)

Die Herstellung von radioaktiv-markierten cyclischen Nukleotiden erfolgte nach der Chloramin T (N-Chlor-Toluol-Sulfonamid Natrium)-Methode (Hunter und Greenwood, 1964; Steiner, 1972). Hierbei wird der Tyrosinmethylester von 2'-Succinyl-cGMP (Sc-cGMP-TME) am aromatischen Ring des Tyrosylrests durch eine elektrophile Substitution mit ¹²⁵I markiert. Der Reaktionsansatz (100 μ l Gesamtvolumen) enthielt 35,5 μ l Phosphatpuffer (500 mM, pH 7,4), 5 μ l 160 μ M Sc-cGMP-TME (800 pmol) und 9,5 μ l Na¹²⁵I (37 MBq bzw. 400 pmol). Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 μ l 1,8 μ M Chloramin T (90 nmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4). Durch die Zugabe von

100 μ l 2,6 μ M Na-Metabisulfit (260 nmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) wurde die Reaktion nach 50 Sekunden gestoppt.

Chloramin T oxidiert Jodid zu molekularem Jod (I_2), welches an mehreren Positionen des aromatischen Rings (bevorzugt in ortho-Position zur OH-Gruppe) Reaktionen eingehen kann (elektrophile Substitution). Die Zugabe von Na-Metabisulfit stoppt die Reaktion durch Reduktion des molekularen Jods zu Jodid.

Die Reinigung des jodierten Nukleotids (Tracer) erfolgte über eine Anionenaustauschersäule (QAE-25 Sepharose/ 0,9 x 10 cm), die mit 50 mM Ammoniumformiat äquilibriert wurde. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde dem Reaktionsgemisch 100 μ l Wasser zugegeben, um die Ionenstärke zu verringern. Die Elution erfolgte mit 250 mM Ammoniumformiat (pH 6) bei einer Durchflußrate von ca. 2 ml/min. Es wurden 30 Fraktionen von je 5 ml gesammelt, von denen je 5 μ l abgenommen und im γ -Zählgerät gemessen wurden. Die Fraktionen, die eine spezifische Aktivität von mehr als 8×10^5 cpm aufwiesen, wurden vereinigt, im Verhältnis 1:1 mit n-Propanol verschnitten (Verlangsamung der Autoradiolyse) und bei -20°C bis zum Einsatz gelagert.

3.1.3 Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung von cyclischem 3',5'-Guanosinmonophosphat

Diese Methode dient der Bestimmung geringer cGMP-Mengen durch die immunologische Präzipitation des radioaktiv-markierten cGMP-Analogons ^{125}I -Sc-cGMP-TME (Tracer) mittels eines spezifischen Antiserums. Durch Inkubation des Tracers mit dem Antiserum stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form des Tracers ein. Dieses Gleichgewicht kann durch nicht-markiertes cGMP in Richtung des freien Tracers verschoben werden, wodurch der präzipitierbare, gebundene Anteil abnimmt. Nach einer Proteinfällung und Dekantieren des Überstandes kann nun die im Präzipitat befindliche, gebundene Tracermenge durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden. Die Verteilung des Tracers auf die freie und die gebundene Fraktion wird bei verschiedenen Konzentrationen von nicht-markiertem cGMP ermittelt. Bei steigenden Konzentrationen wird die gebundene Fraktion des Tracers kleiner, die im Präzipitat gemessene Aktivität nimmt also ab. Über eine Standardkurve, die mit definierten Mengen an unmarkiertem cGMP und den gemessenen Zerfällen erstellt wird, kann der cGMP-Gehalt einer unbekannt Probe ermittelt werden. Bei der Bestimmung des cGMP-Gehalts war der ermittelte Wert in unterschiedlichen Verdünnungen konsistent.

Die gewählten Bedingungen zur Durchführung des RIAs, die Behandlung der Proben und die Antikörperinkubation wurden wie folgt durchgeführt (Steiner *et al.*, 1972). Die getrockneten Überstände der Gewebeinkubationen (Aorta, Bronchus, Vene, Lunge; siehe 3.4.1) wurden in 100 μ l Reaktionspuffer (100 mM Natriumacetat, pH 6) aufgenommen und mit 3 μ l eines Gemisches aus Triethylamin und Acetanhydrid (2:1) acetyliert. Durch die Acetylierung des in den Proben enthaltenen cGMPs an der 2'-OH-Position wird die Sensitivität des RIAs um den Faktor 40 vergrößert (Harper und Brooker, 1975). 10 μ l einer acetylierten Probe wurde in Polypropylenröhrchen mit 100 μ l des in Schweine- γ -Globulin (0,5 mg/ml) verdünnten Antiserums (final 1:200.000) versetzt und 50 μ l Reaktionspuffer zugegeben. Anschließend wurden 40 μ l des verdünnten Tracers (in Reaktionspuffer) hinzugefügt und der Ansatz gemischt. Das γ -Globulin verhindert die Adsorption des Antikörpers an die Wände der Polypropylenröhrchen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 16 bis 20 Stunden. Zur Trennung von freiem und gebundenem cGMP wurde das im Reaktionsgemisch befindliche Protein durch Zugabe von 3 ml Polyethylenglycol-Puffer (16 % PEG 6000 in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) ausgefällt. Hierzu wurden zunächst 50 μ l einer 0,8 %igen Schweine- γ -Globulin-Lösung (in Reaktionspuffer) zugegeben, um eine ausreichende Proteinmenge für die möglichst quantitative Fällung des Antikörpers zu gewährleisten. Der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend 30 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände wurde die in den Sedimenten gebundene Radioaktivität im γ -Zähler gemessen. Das Verhältnis von Tracermenge (7000-10.000 cpm) und Antikörperverdünnung (1:200.000) wurde so gewählt, daß maximal 30-40 % der eingesetzten Aktivität präzipitiert wurden. Dieses Verhältnis wurde durch den Zusatz verschiedener Antikörperverdünnungen zu einer gegebenen Tracermenge bestimmt. Die Nachweisgrenze für cGMP lag bei 2 fmol, zur Erstellung der Standardreihe wurden insgesamt neun cGMP-Mengen (2-512 fmol) verwendet. Für den cGMP-Standard wurden Lösungen verwendet, deren Konzentration photometrisch bei 252 nm eingestellt wurde.

3.1.4 Herstellung von ^{32}P -cGMP

Die Herstellung von ^{32}P -cGMP erfolgte durch den enzymatischen Umsatz von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ zu ^{32}P -cGMP durch die gereinigte Guanylyl-Cyclase. Dazu wurden 50 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (9,25 MBq) mit 2,5 μg boviner NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase in einem Gesamtvolumen

von 100 μl für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 3 mM DTT, 3 mM MgCl_2 , 100 μM GSNO und 50 mM TEA/HCl, pH 7,4, durchgeführt und mit 450 μl 120 mM Zn-Acetat-Lösung gestoppt. Durch Zugabe von 450 μl 120 mM Na_2CO_3 wurden Nukleotide mit freien 5'-Phosphatgruppen (d.h. GTP, GDP, GMP) zusammen mit dem schwerlöslichen ZnCO_3 präzipitiert. Nach Zentrifugation (4 min, 12000 x g) wurde der Überstand über eine mit 0,1 M Perchlorsäure äquilibrierte Aluminiumoxid-Säule (Alumina N Akt.1, ICN Biomedicals) gegeben. Dabei bindet ^{32}P -cGMP an die Matrix, während freie Phosphate und Nukleotide mit freier 5'-Phosphatgruppe nicht gebunden werden. Nach Spülen mit demineralisiertem Wasser wurde das ^{32}P -cGMP mit 250 mM Na-Acetat-Lösung von der Säule eluiert und in 8 Fraktionen von je 300 μl gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 2 μl in Szintillationsgefäße gegeben und die Zerfälle pro min (cpm) des ^{32}P durch die Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die Fraktionen, die 0,5 bis $2,5 \times 10^5$ cpm/ μl enthielten, wurden bei -20°C gelagert und später als Substrat zur Bestimmung der Phosphodiesteraseaktivität verwendet. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 40 bis 50 % der als $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ eingesetzten Radioaktivität.

3.1.5 Bestimmung der cGMP-abbauenden Phosphodiesteraseaktivität

Die PDE-Aktivität wurde durch die Umwandlung von ^{32}P -cGMP zu Guanosin und ^{32}P -Phosphat bei 37°C für 5-10 min bestimmt. Das Reaktionsgemisch enthielt dabei 10-50 μl Probe (z.B. HEK-Zell-Zytosol), ^{32}P -cGMP (1,5-3 kBq), 1 μM nicht-radioaktives cGMP, 12 mM MgCl_2 , 3 mM DTT, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 2 Units alkalische Phosphatase (Sigma) und 50 mM TEA/HCl, pH 7,4, in einem Gesamtvolumen von 100 μl . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 900 μl Aktivkohlesuspension (30 % Aktivkohle in 50 mM KH_2PO_4 , pH 2,3, 4°C) gestoppt. Anschließend wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation für 4 min bei 12.000 x g pelletiert und von 600 μl des Überstandes wurde die Radioaktivität bestimmt.

Nach der Hydrolyse des cyclischen Nukleotids durch die PDE wandelt die alkalische Phosphatase das Hydrolyseprodukt 5'-GMP in Guanosin und freies Phosphat um. Letzteres wird nicht durch die Aktivkohle gebunden und kann im Überstand durch Detektion der Radioaktivität des ^{32}P -Phosphats bestimmt werden. Die Effizienz der Umwandlung von 5'-GMP zu Phosphat und Guanosin durch die alkalische Phosphatase wurde durch die Dephosphorylierung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bestimmt und betrug nahezu 100 %. Die Anwesenheit

von divalenten Kationen wie Magnesium ist Voraussetzung für die Katalyse. DTT wurde als Oxidationsschutz eingesetzt und Serumalbumin als Schutzprotein. Die Phosphodiesteraseaktivität wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$v(\text{PDE}) = \frac{C - C_0}{C_t} \times \frac{S}{V} \times t$$

$v(\text{PDE})$	spezifische Aktivität (pmol/min/ml)
C	Zählrate der Probe (cpm)
C_0	Zählrate des Leerwerts (cpm) (Ansatz ohne Probe)
C_t	Zählrate des eingesetzten ^{32}P -cGMP (cpm)
t	Inkubationsdauer (min)
S	eingesetzte Substratmenge (pmol cGMP)
V	Volumen der Probe pro Reaktionsansatz (ml)

Die Linearität der katalytischen Aktivität über die Zeit war gewährleistet. Die Nachweisgrenze wurde bei 1,5fachem Leerwert erreicht, und der Anteil des umgesetzten Substrats betrug höchstens 10 %.

3.1.6 Aktivitätsbestimmung der gereinigten Guanylyl-Cyclase

Die Aktivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase wurde nach der Methode von Schultz und Böhme (1984) bestimmt. Dabei wird $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ zu ^{32}P -cGMP umgesetzt, welches – nach Abtrennung der nicht umgesetzten Nukleotide – durch Detektion der radioaktiven Zerfälle quantifiziert wird.

In einem Gesamtvolumen von 100 μl wurden 10 μl der gereinigten Guanylyl-Cyclase im Reaktionspuffer (3 mM MgCl_2 , 3 mM DTT, 1 mM cGMP, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 300 μM GTP, ca. 5 kBq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ und 50 mM TEA/HCl, pH 7,4) mit 100 μM DEANO oder 100 μM BAY60-7550 für 10 min bei 37°C inkubiert.

Bei der Bestimmung der Enzymaktivität der NO-GC sind divalente Kationen wie Mg^{2+} einerseits als Kofaktoren des Enzyms essentiell, andererseits wird das als Substrat dienende GTP nur im Komplex mit divalenten Kationen umgesetzt. DTT verhindert die Inaktivierung des Enzyms durch Oxidation. Zugewetztes cGMP erhöht nicht nur die Wiederfindungsrate von ^{32}P -cGMP, sondern senkt auch den Anteil des durch eventuell vorhandene Phos-

phodiesterasen abgebaute ^{32}P -cGMP. Rinderserumalbumin dient als Schutzprotein. DEANO, als NO-freisetzende Substanz, wurde neben BAY60-7550 zur Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 450 μl 120 mM Zn-Acetat-Lösung gestoppt. Durch Zugabe von 450 μl 120 mM Na_2CO_3 -Lösung wurden P_i und PP_i sowie die Nukleotide mit freien 5'-Phosphat-Gruppen (d.h. GTP, GDP, GMP) zusammen mit dem entstehenden ZnCO_3 präzipitiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 12.000 x g wurde der Überstand über eine Aluminiumoxidsäule gegeben, die vorher mit 0,1 M Perchlorsäure äquilibriert wurde. Dabei wandern Phosphate und nicht präzipitierte Nukleotide mit einer freien 5'-Phosphat-Gruppe in den Durchlauf, während ^{32}P -cGMP an die Säule bindet. Nach Spülen mit demineralisiertem Wasser wurde das ^{32}P -cGMP mit 5 ml 250 mM Na-Acetat-Lösung von der Säule in Szintillationsgefäße eluiert, und die gezählten Zerfälle pro min (cpm) des ^{32}P durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$v(\text{GC}) = \frac{C - C_0}{C_t} \times \frac{S}{V} \times t$$

$v(\text{GC})$	spezifische Aktivität (pmol/min/ml)
C	Zählrate der Probe (cpm)
C_0	Zählrate des Leerwerts (cpm) (Ansatz ohne Probe)
C_t	Zählrate des eingesetzten ^{32}P -cGMP (cpm)
t	Inkubationsdauer (min)
S	eingesetzte Substratmenge (pmol cGMP)
V	Volumen der Probe pro Reaktionsansatz (ml)

3.2 Gewinnung von HEK-GC-PDE2-Zellen-Zytosol

HEK-Zellen, die die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase und die Phosphodiesterase 2 stabil exprimieren, wurden in DMEM-Nährmedium (4500 mg/l Glukose, 200 mM L-Glutamin, 110 mg/l Pyruvat, Gibco) mit 5 % FCS und 1 % Penicillin und Streptomycin (Invitrogen und Sigma) ausgesät und bis zu einer Dichte von 100.000 Zellen pro Inkubationsflasche (200 ml) bei 37°C kultiviert. Nach Absaugen des Nährmediums wurden die HEK-Zellen zunächst mit PBS (4°C) und dann mit Homogenisationspuffer (1 mM EDTA, 2 mM DTT, 50 mM NaCl, 50 mM Triethanolamin/HCl, pH 7,4, mit Proteaseinhibitor-Mix (1:100,

Sigma) gespült. Nach Abgießen des Puffers wurden die Zellen mit der Restflüssigkeit abgeschabt und die Suspension mit Ultraschall (5s) behandelt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C wurde der Überstand für die Inkubationsversuche eingesetzt.

3.3 Organbad-Experimente

Bei den durchgeführten Organbadstudien wurde die Kontraktion und die Relaxation verschiedener Gewebe (Aorta und Bronchus) von Ratten und Mäusen *ex vivo* untersucht. Die entnommenen Organe wurden sofort in physiologische Krebs-Henseleit-Lösung (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 7,5 mM Glukose, 25 mM NaHCO₃, pH 7,4, begast mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂)) überführt und in Anwesenheit von 200 µM L-NAME (N-Nitro-L-Arginin-Methylester) für 60 min bei 37°C äquilibriert. Danach wurden die Organe sofort für den Versuch eingesetzt. In allen Experimenten wurde der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME eingesetzt, um den Einfluß der endogenen NO-Produktion auszuschließen. In einigen Ansätzen wurde Diclofenac (3µM) zugegeben, um die Bildung von vasorelaxierendem Prostaglandin (PGI₂) zu hemmen.

3.3.1 Tiere und Präparation

Zur Organentnahme wurden Ratten verschiedener Stämme (Wistar, Wistar-Kyoto, Sprague-Dawley) im Alter zwischen 3 und 12 Monaten und beiderlei Geschlechts verwendet. Aufgrund der hohen Sterberate der knock-out-Mäuse wurden ca. 3 Wochen junge KO-Tiere bzw. Wildtyp-Tiere (auch beiderlei Geschlechts) verwendet. Die Tiere wurden durch CO₂-Inhalation betäubt und anschließend dekapitiert. Die Organe wurden entnommen, störendes Gewebe (Binde-, Muskel- und Lungengewebe) beseitigt und der Lumeninhalt (Blut) entfernt. Je nach Versuchsansatz wurden die Gefäße in möglichst gleich große Ringe (Organbad) oder Streifen (cGMP-Messung) geschnitten und verwendet. Bei Untersuchungen an der glatten Muskulatur der Aorta wurde zusätzlich das Endothel durch 10-minütige Carbogenbegasung zerstört (EIA-Methode), um eventuell auftretende Einflüsse des Endothels auszuschließen.

3.3.2 Experimenteller Ablauf der Organbad-Experimente

Nach der Präparation der Organe wurden die zugeschnittenen Gewebe-Ringe in den Organbadkammern (5 ml K-H-Puffer, Carbogen-begast) des 4-Kanal-Multi-Myographen (Modell 610M, Danish Myo Technology) fixiert und mit einer Vorspannung von 2-10 mN für ca. 1 Stunde äquilibriert. Die Ratten-Aorta wurde mit einer Kraft von 10 mN vorgespannt, die Ratten-Bronchien mit 5 mN und die Aorten der Mäuse wurden mit 2-5 mN vorgespannt. Da sich das Gewebe an die osmotischen Bedingungen des Puffers und die Umgebung zunächst anpassen muß, kommt es in der Äquilibrierungsphase zum spontanen Abfall des Tonus. Durch Nachjustieren der Kraft wird die Vorspannung in der ersten halben Stunde auf den gewünschten Wert eingestellt. Sobald die Vorspannung stabil war, wurde der Versuch gestartet. Gemessen wurde die Kraftentwicklung (in mN) bei isometrischer Kontraktion und der Kraftabbau bei der Relaxation der Gewebe-Ringe (Aufzeichnung über PC mit der Software Myodaq). Mit weiteren Programmen (Myodata und Excel) wurden die Daten ausgewertet und graphisch dargestellt. Alle Messungen wurden grundsätzlich als Mehrfachbestimmungen durchgeführt, pro Versuchsansatz wurden mindestens zwei Gewebe-Ringe eines Tieres parallel verwendet.

3.3.3 Aufnahme von Dosis-Wirkungs-Kurven

Alle hier eingesetzten Substanzen und deren Lösungsmittel wurden in Vorversuchen getestet, und deren Dosis-Wirkungskurven aufgezeichnet. Vor der Applikation der kontraktilen Agonisten (Phenylephrin und Carbachol) wurde die Basislinie (entspricht der Vorspannung) aufgezeichnet, und nach Zugabe der entsprechenden Verdünnungen in die K-H-Lösung der Organbad-Kammer wurde die ansteigende Kraft gemessen. Zur Auswertung wurde der Wert der maximal erreichten Kontraktion (abzüglich der Basislinie) als 100 % definiert. Die übrigen Werte wurden relativ dazu in Prozent der maximalen Kontraktion umgerechnet und im Diagramm gegen die logarithmische Konzentration des kontraktilen Agonisten aufgetragen.

Zur Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven für relaxierende Substanzen (NO-Donatoren, ANP, BAY60-7550 und 8pCPT-cGMP) wurden die Gewebe-Ringe mit einem kontraktilen Agonisten vorkontrahiert, und zwar mit einer Konzentration, die im Mittel eine ca. 95 %ige Kontraktion auslöst. Nach vollständiger Kontraktion begann die Applikation der Relaxantien, von gering bis hoch dosiert. Die maximal erreichte Kontraktion erhält in der

Auswertung den 100 %-Wert oder auch 0 % Relaxation. Die Werte der jeweiligen Dosen der Relaxantien wurden relativ dazu in % Relaxation ausgedrückt und graphisch dargestellt.

Bei dem Gebrauch von Hemmstoffen (EHNA, Sildenafil, Milrinon, ODQ) wurden maximal wirksame Konzentrationen (100 μM) 10 min vor dem Versuch appliziert. Die zugehörigen Lösungsmittel (DMSO, Ethanol oder Wasser) dienten als Kontrolle.

3.3.4 Nachweis der Zerstörung des Aorten-Endothels

Um sicherzustellen, daß das Endothel der Carbogen-begasteten Aorten zerstört ist, wurden Vorversuche mit Phenylephrin und Carbachol durchgeführt. Das stabile und nicht-hydrolysierbare Acetylcholin-Analogon Carbachol vermittelt nur über das intakte Endothel die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, bei zerstörtem Endothel bleibt die Relaxation aus. Hierzu wurden die Gefäße mit 1 μM Phenylephrin kontrahiert und nach Erreichen des Maximums mit 20 μM Carbachol inkubiert. Gefäße ohne Endothel zeigen aufgrund der CCh-vermittelten Ca^{2+} -Erhöhung in der glatten Muskulatur eine zusätzliche Erhöhung des Kontraktionsmaximums. Gefäße mit intaktem Endothel relaxieren nach Carbachol-Gabe sofort um bis zu 30 %. Nach diesem Test wurden die Agenzien ausgewaschen. Nach Erreichen der ursprünglichen Basislinie (nach ca. 1 Stunde) wurde die eigentliche Versuchsreihe gestartet. Der Nachweis von intaktem bzw. defektem Endothel war auch im Anschluß an einen Versuch möglich. Nach dem Auswaschen der getesteten Substanzen und Erreichen der Basislinie konnten die Gefäße ebenfalls mit Phenylephrin und Carbachol inkubiert werden.

3.3.5 Desensitierungsversuche mit Aorta und Bronchien der Ratte

Für die Desensitierungs-Experimente wurden die im Organbad aufgezogenen Gewebearinge zunächst mit den submaximal wirksamen Konzentrationen eines NO-Donators (GSNO, DETANO, DEANO, Prolino) für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurde das NO, durch mehrfaches Wechseln des K-H-Puffers, innerhalb von 10 min entfernt und die Gefäße mit 1 μM Phenylephrin kontrahiert, als Kontrolle dienten Gefäße ohne NO-Vorinkubation. Nachdem das Kontraktionsmaximum erreicht wurde (30 – 45 min), wurde erneut ein NO-Donator appliziert, um die Relaxation auszulösen. Um den Einfluß der Vorinkubation auf die Relaxation messen zu können, wurde die NO-Konzentration so gewählt, daß

sie im Mittel nur eine etwa 50 %ige Relaxation auslösen. Die Relaxation vorinkubierter Ringe wurde dann durch die Auswertung mit Myodata und Excel ermittelt und mit den Kontrollen verglichen.

Um zu ermitteln, ob die NO-induzierte Relaxation über die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase vermittelt wird, wurden Versuche mit ODQ durchgeführt. Hierbei wurden Gefäße mit 100 μM ODQ für 10 min inkubiert (Kontrolle mit Lösungsmittel DMSO), danach 3 bis 4 mal gewaschen und anschließend mit 1 μM Phenylephrin kontrahiert. Durch Zugabe verschiedener NO-Donatoren sollte die Relaxation ausgelöst werden. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

3.3.6 Kreuzdesensitisierungs-Experimente

Die Kreuzdesensitisierungs-Experimente wurden unter den gleichen Bedingungen wie die der Desensitisierung (siehe 3.3.5) durchgeführt (10 min Vorinkubation mit einem NO-Donator, Auswaschen des NOs (Wechseln des K-H-Puffers, 10 min), Kontraktion mit 1 μM Phenylephrin; als Kontrolle dienten Gefäße ohne NO-Vorinkubation). Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums wurde jedoch nicht der zuvor benutzte NO-Donator appliziert, sondern die membrangebundene Guanylyl-Cyclase (GC-A) wurde mit ANP aktiviert, um die Relaxation auszulösen. Auch hier wurde die ANP-Konzentration so gewählt, daß sie im Mittel nur eine etwa 50 %ige Relaxation auslöst. Die Relaxation vorinkubierter Ringe wurde dann durch die Auswertung mit Myodata und Excel ermittelt und mit den Kontrollen verglichen. Führt die Aktivierung dieser Cyclase zu einer Verringerung der Relaxation bei NO-vorinkubierten Gefäßen, so spricht man von einer Kreuzdesensitisierung, deren Ursprung nicht auf die NO-GC zurückzuführen ist.

Um den Ursprung der Desensitisierung bzw. Kreuzdesensitisierung innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade zu ermitteln, wurde eine Relaxation der NO-vorinkubierten und nicht-vorinkubierten Gefäße durch 8pCPT-cGMP ausgelöst. Die voll-kontrahierten Gefäße wurden mit der halbmaximal effektiven Konzentration 8pCPT-cGMP (50 μM) relaxiert. 8pCPT-cGMP ist ein nicht hydrolysierbares cGMP-Analogon, welches die cGMP-abhängige Proteinkinase direkt aktiviert, also in der Signalkaskade die Cyclasen überspringt und die Relaxation NO-unabhängig vermittelt.

3.3.7 Charakterisierung und Nutzung der NO-GC-knock-out-Mäuse

Zur Untersuchung der Physiologie der glatten Muskulatur der NO-GC-KO-Mäuse wurden Organbad-Studien (siehe 3.3, K-H-Puffer mit L-NAME und Diclofenac) durchgeführt. Hierzu wurden die Aorten gleichaltriger Wildtyp und NO-GC-KO-Mäuse eingesetzt, und ihr Verhalten gegenüber kontraktile und dilatierenden Substanzen wurde miteinander verglichen.

Nach der Charakterisierung der KO-Tiere wurden verschiedene Substanzen auf die spezifische Aktivierung der NO-GC hin getestet. Hierbei wurden verschiedene Stimulatoren der NO-GC im Wildtyp- und im KO-Tier getestet und miteinander verglichen.

3.4 Bestimmung der intrazellulären cGMP-Konzentration

3.4.1 Messung der cGMP-Antwort in Aorta, Bronchien und Vene der Ratte und Lunge der Maus und Messung der Desensibilisierung in Ratten-Aortenstreifen und Maus-Lungengewebe

Die gereinigten Gefäße wurden in Längsrichtung aufgeschnitten und schließlich in Streifen etwa gleicher Größe von 2-5 mg Feuchtwicht geteilt. Die Gewebe-Stücke der Lunge wurden von Randregionen mit möglichst wenig Blutgefäßen und Bronchien entnommen. Vor Beginn der Experimente wurden die Gefäßstreifen bzw. Gewebe-Stücke in K-H-Lösung für mindestens 60 min in der Anwesenheit von 200 μ M L-NAME bei 37°C äquilibriert. In allen Experimenten wurde der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME eingesetzt, um eine endogene NO-Produktion auszuschließen. Die Inkubationen in K-H-Puffer wurden durch Schockgefrieren der Gewebe-Stücke beendet. Dazu wurde eine in flüssigem Stickstoff gekühlte Metallklammer verwendet. In den Experimenten zur Bestimmung der Dosis-Wirkungskurven für NO wurde eine Inkubationszeit von 120 Sekunden gewählt. Dieser Wert wurde durch Untersuchungen der NO-induzierten cGMP-Antwort über die Zeit ermittelt. Hier war die intrazelluläre cGMP-Konzentration maximal. Die NO-induzierte cGMP-Syntheserate in der Aorta wurde auch unter Hemmung der cGMP-abbauenden Phosphodiesterase 5 durch den Inhibitor Sildenafil (100 μ M) bestimmt.

Für die Desensibilisierungsexperimente wurden die Aorten- und Lungenstücke mit den angegebenen submaximal wirksamen NO-Konzentrationen für 10 min vorinkubiert. Durch dreimaliges Waschen wurde das NO entfernt und nach einer Pause von 10, 30 und 60 Minuten (Aorta) bzw. 10 min (Lunge) wurde eine zweite, maximal wirksame Konzentration des

NO-Donators (100 μM) zugegeben. Bei der Aorta wurde die NO-induzierte intrazelluläre cGMP-Konzentration über einen Zeitraum von 8 min gemessen, die Inkubation wurde also zu den angegebenen Zeitpunkten wie oben beschrieben gestoppt. Am Lungen-Gewebe wurde nur die maximale cGMP-Konzentration geprüft, d.h. die Reaktionen wurden nach 20 s gestoppt. Als Kontrollen dienten nicht-vorinkubierte Gewebe-Stücke.

Die Extraktion des cGMPs erfolgte durch Homogenisation des Gewebes in einem Glas-Glas-Homogenisator in 500 μl eiskaltem 70 %igem Ethanol. Nach Zentrifugation (15 min, 20.000 x g und 4°C) wurde der cGMP-enthaltende Überstand bei 105°C und N_2 -Begasung eingedampft; die cGMP-Konzentration wurde mittels RIA bestimmt (siehe 3.1.3). Das nach der Zentrifugation zurückbleibende Proteinpellet wurde in 0,1 M NaOH-0,1% SDS-Lösung bei 60°C unter Schütteln gelöst, und die Proteinkonzentration wurde durch die BCA-Methode (Pierce) bestimmt.

3.4.2 Messung der cGMP-Antwort in HEK-GC-PDE2-Zellen

HEK-Zellen, die die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase und Phosphodiesterase 2 stabil exprimieren, wurden in 500 μl DMEM-Nährlösung (Gibco) in 24-w Platten (Sarstedt) bis zu einer Dichte von ca. 100.000 Zellen pro *well* bei 37°C kultiviert. Die Zählung der Zellen erfolgte mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer. Zu Beginn des Versuches wurde die Nährlösung gegen 300 μl eines 37°C warmen Zellpuffers (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4 und 1 mg/ml Glukose) ausgetauscht, und 15 min bei 37°C äquilibriert. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurde die Inkubation der Zellen mit der Substanz BAY60-7550 in 300 μl Zellpuffer durchgeführt. Nach 6 min wurde die Inkubation durch Absaugen des Puffers und Zugabe von 300 μl eiskalter 0,1 M HCl gestoppt. Der Überstand der lysierten Zellen wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, gevortext und bei -20°C gelagert. Von diesem Zelllysate wurden 10 μl zur Bestimmung des intrazellulären cGMP-Levels (siehe 3.1.3) benutzt.

3.5 Gewebeinkubation und Aufarbeitung für die Proteinanalyse

Die gereinigten Gefäße (Aorta, Bronchus und Vene) wurden in Längsrichtung aufgeschnitten und wie das Lungengewebe in Streifen etwa gleicher Größe von 2-5 mg Feuchtwicht geteilt. Vor Beginn der Experimente wurden die Gewebe-Streifen in K-H-Lösung für mindestens 60 min in Anwesenheit von 200 μM L-NAME bei 37°C äquilibriert. Die

Inkubationen wurden durch Schockgefrieren der Gewebe-Stücke zu den angegebenen Zeitpunkten beendet.

Die Gewinnung der zytosolischen Proteine erfolgte durch Homogenisation des gefrorenen Gewebes in einem eisgekühlten Glas-Glas-Homogenisator in 450 μ l eiskaltem Puffer (PBS, 2 mM DTT, Proteaseinhibitormix (1:100, Sigma), pH 7,4). Für die Extraktion des Gesamt-Proteins wurde das Homogenat zusätzlich 1 Stunde mit 1 % SDS bei 60°C schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation des Homogenats (15 min, 20.000 x g und 4°C) wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen, die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (Pierce) bestimmt und mit 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzt und gemischt. Nach Kochen des Überstandes (5 min, 105°C) wurde dieser sofort auf Eis abgekühlt und direkt zur Proteinanalyse (siehe 3.1.1) eingesetzt, oder bei -20°C gelagert. Untersucht wurden die Komponenten der NO/cGMP-Signalkaskade (NO-GC, PDE 5, PKGI und VASP), welche mit spezifischen Antikörpern (α -VASP und α -PKGI von Calbiochem; α - α_1 -, α - β_1 -NO-GC und α -PDE5, Herstellung am Lehrstuhl) in der Western-Blot-Analyse detektiert wurden.

3.5.1 Proteinfällung durch Trichloressigsäure und Aceton

Zur Konzentrierung des in 3.4 gewonnenen, proteinhaltigen Überstandes, können die Proteine mittels TCA-Aceton-Methode ausgefällt und in einem beliebigen Volumen gelöst werden. Hierzu wurde der Überstand (4°C) mit eiskalter TCA versetzt, bis zu einer finalen Konzentration von 20 %, und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (5.000 x g, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet 2–3 mal mit Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen des Protein-Pellets bei 50°C im Schüttler wurde es in 100-200 μ l 1 x Laemmli-Probenpuffer gelöst, 5 min bei 105°C gekocht, auf Eis abgekühlt und für die Proteinanalyse (siehe 3.1.1) eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Eine unzureichende Entfernung der TCA führte durch den pH-Abfall zu Problemen bei der Gelelektrophorese. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert des Probenpuffers nach jeder Proteinfällung bestimmt (pH-Papier, Merck) und, wenn nötig, mit 1 M NaOH auf pH 6,6 korrigiert.

3.5.2 Aktivierung der PDE5 in Aorten- und Bronchiengewebe

Die Aktivierung der PDE5 wird durch ihre Phosphorylierung aufgezeigt und nachgewiesen. Der Phosphorylierungs-Zustand der PDE5 wurde unter den gleichen Inkubationsbedingungen (NO-Konzentrationen und Inkubationszeiten) wie bei den Versuchen zur De-

sensibilisierung (siehe 3.3.5) analysiert. Hierzu wurden die Aorten- und Bronchienstücke mit submaximal wirksamen NO-Konzentrationen für 10 min vorinkubiert. Durch dreimaliges Waschen wurde das NO entfernt und nach einer Pause von 10, 30 und 60 Minuten wurde eine zweite, maximal effektive Konzentration des NO-Donators (100 μM) zugegeben. Nach 2 min wurde die Inkubation mit einer in flüssigem N_2 gekühlten Metallklammer gestoppt und das Gewebe wurde wie in 3.4.1 beschrieben aufgearbeitet und der Proteinanalyse zugeführt. Die Western-Blot Analyse wurde mit einem Antikörper durchgeführt, der die an Ser-102 phosphorylierte Sequenz CTRKIS- PO_3 -ASEFDR der PDE5 spezifisch erkennt. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch die Western-Blot-Detektion von 200 ng eines gereinigten Fragments der PDE5 getestet, das *in vitro* durch die gereinigte PKGI phosphoryliert wurde (Antikörper und trunkierte PDE5 wurden zur Verfügung gestellt von Prof. W. J. Thompson, Cell Pathways Inc., Horsham, USA).

4. Ergebnisse

Der NO/cGMP-Signalweg besitzt eine wichtige Funktion innerhalb des kardiovaskulären Systems, indem er den Tonus der glatten Muskulatur und die Thrombocytenaggregation reguliert. Einige pathophysiologische Zustände, wie z.B. die endotheliale Dysfunktion, die möglicherweise einen Risikofaktor für die Angina pectoris und die bronchiale Hyperreaktivität darstellt, werden auf einen zu hohen Gefäßmuskeltonus, d.h. auf eine verminderte Relaxation und/oder auf eine übermäßige Kontraktion der glatten Muskulatur zurückgeführt. Daher ist die Regulation des NO/cGMP-Signalwegs in der glatten Muskulatur von großem Interesse. In Thrombocyten wurde dieser Signalweg bereits ausführlich untersucht (Müllershausen *et al.*, 2001). In diesen Zellen führten aufeinanderfolgende NO-Stimulationen zu einer schnellen Desensitisierung des Signalwegs, die auf eine erhöhte und langanhaltenden Aktivität der PDE5 zurückzuführen war. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation und die Desensitisierung der NO/cGMP-Signalkaskade in verschiedenen glattmuskulären Geweben, wie Aorta, Vene und Bronchius der Ratte untersucht.

4.1 Untersuchung der NO/cGMP-Signaltransduktion in der glatten Muskulatur

4.1.1 Nachweis der Komponenten des NO/cGMP-Signalwegs

In Aorten-, Bronchien-, Venen-, und Lungengewebe sollten zunächst die einzelnen Komponenten des Signalwegs, d.h. NO-GC, PDE5, PKGI und VASP, auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die zytosolischen Proteinfractionen der jeweiligen Gewebe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Mitglieder des Signalwegs durch Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für die Detektion der NO-induzierten Phosphorylierung von PDE5 und VASP wurden die Gewebe zuvor mit NO stimuliert. In Abb. 3 A ist das Ergebnis der Western Blot-Analyse dargestellt. In Aorten-, Bronchien-, Venen-, und Lungengewebe wurde die α_1 -Untereinheit der NO-GC (80 kDa) und die β_1 -Untereinheit (70 kDa) detektiert. Auch die PDE5 (100 kDa) und die PKGI (75 kDa) konnten in allen untersuchten glattmuskulären Geweben gezeigt werden. Damit wurde die Expression aller wichtigen Komponenten des NO/cGMP-Signalwegs in diesen Geweben nachgewiesen.

Die funktionelle Interaktion der intakten Signalkaskade wurde durch die NO-induzierte

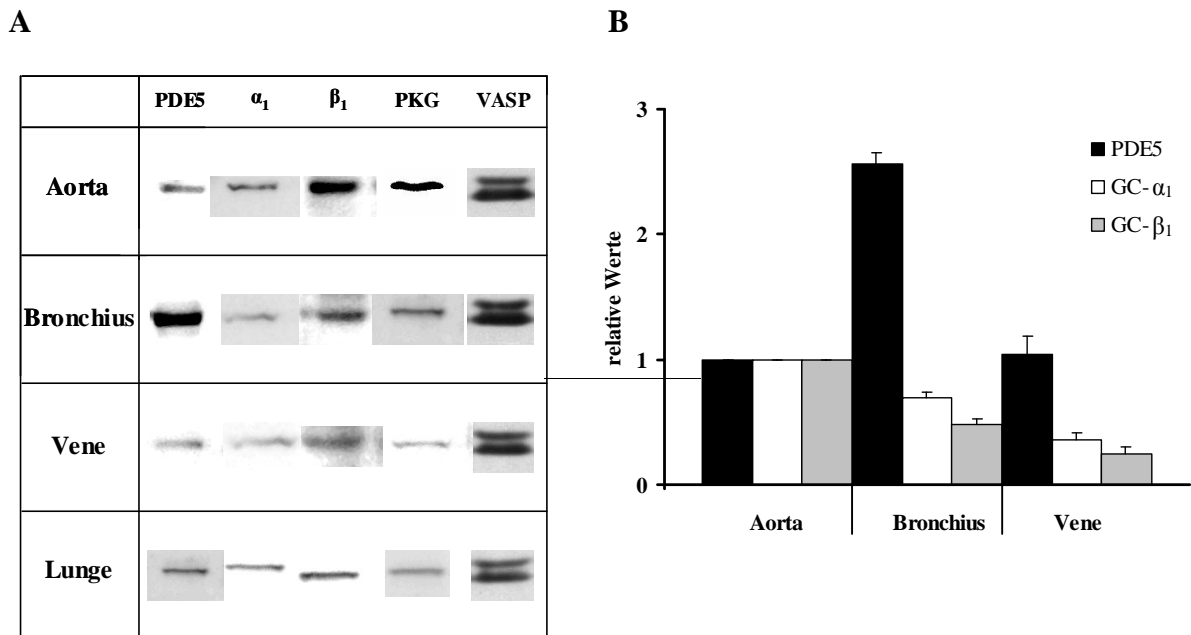


Abb. 3: Nachweis der NO-GC, PDE5, PKGI und VASP in verschiedenen glattmuskulären Organen mittels Western-Blot

Zytosolische Fraktionen (25 μ g Protein) der angegebenen Gewebe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die PDE5, die α_1 -Untereinheit der NO-GC, die β_1 -Untereinheit der NO-GC, die PKGI und gegen VASP wurden die Enzyme der NO/cGMP-Signalkaskade detektiert. (A) In allen Geweben wurde die PDE5 bei ca. 100 kDa detektiert, die α_1 -GC bei ca. 80 kDa, die β_1 -GC bei ca. 70 kDa, die PKGI bei ca. 75 kDa und das VASP bei 46 bzw. 50 kDa detektiert. Gewebe-Stücke zur VASP-Untersuchung wurden vor der Aufarbeitung für 2 min mit 100 μ M GSNO inkubiert. (B) Die Intensität der Western-Signale der glattmuskulären Gewebe wurden hinsichtlich der Menge der α_1 - und β_1 -Untereinheit der NO-GC und der PDE5 mit spezieller Software (Labworks, wie unter 3.5 beschrieben) verglichen. Dabei wurden die Werte der Aorta als 1 definiert und die restlichen Mengen relativ dazu ausgedrückt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 4-13 unabhängigen Experimenten.

Phosphorylierung von VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein), einem Substrat der PKGI, nachgewiesen. Der verwendete monoklonale Antikörper ist spezifisch für eine Aminosäuresequenz mit einem phosphorylierten Serin innerhalb des VASP-Proteins. Dieses Epitop wird ausschließlich dann erkannt, wenn VASP durch die PKGI am Ser-239 phosphoryliert wird (Smolenski *et al.*, 1998). Auf der Western Blot-Membran in Abb. 3 A ist eine Bande bei 46 kDa zu erkennen, die dem am Ser-239 phosphorylierten VASP entspricht. Die zweite Bande bei 50 kDa entspricht dem doppelt phosphoryliertem VASP (Ser-239 und Ser-157). Dabei führt die Phosphorylierung am Ser-157 zu einer Änderung des apparenten Molekulargewichts in der SDS-PAGE. Die aufgezeigten PKGI-vermittelten Phosphorylierungen demonstrieren eine intakte, über NO-GC, cGMP und PKGI verlaufende Weiterleitung des NO-Signals hin zu VASP. Die sofortige Umsetzung des NO-Signals ist sehr wahrscheinlich für eine schnelle funktionelle Reaktion der glatten Muskulatur innerhalb des kardiovaskulären Systems erforderlich.

In Abbildung 3 B ist der Vergleich der Proteinmengen von α_1 - und β_1 -Untereinheiten der NO-GC sowie von PDE5 innerhalb der drei glattmuskulären Gewebe dargestellt. Die Menge von NO-GC und PDE5 der Aorta wurde als 1 definiert, und die Mengen der anderen Gewebe wurden relativ dazu ausgedrückt. In den Bronchien befand sich ca. 2,6fach mehr PDE5 als in Aorta oder Vene. Die Menge der NO-GC ist in den Bronchien jedoch um ca. ein Drittel, in der Vene sogar um zwei Drittel geringer als in der Aorta. Die verhältnismäßig kleinere Menge an NO-GC und größere Menge an PDE5 in Bronchius und Vene weist auf die Dominanz des cGMP-Abbaus gegenüber der cGMP-Synthese in diesen Organen hin, was zu einer geringeren NO-induzierten cGMP-Antwort als in der Aorta führen könnte (siehe 4.1.3).

4.1.2 Die NO-induzierte cGMP-Antwort in der glatten Muskulatur

Nach dem Nachweis der Komponenten der Signalkaskade auf Proteinebene wurden die verschiedenen glattmuskulären Gewebe auf ihre Sensitivität gegenüber NO und ANP untersucht. Die verwendeten NO-Donatoren GSNO, DETANO und ProliNO führen nach spontaner Freisetzung von NO zur Stimulation der NO-GC. Dabei unterscheiden sie sich in der Halbwertszeit der NO-Freisetzung. ANP stimuliert eine membranständige Guanylyl-Cyclase (GC-A). Zunächst wurde die NO- bzw. ANP-induzierte cGMP-Produktion im Zeitverlauf analysiert. Danach wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt, um die Sensitivität der Kaskade für verschiedene Agonisten in den unterschiedlichen Organen zu ermitteln.

Darüberhinaus wurde der Einfluß der cGMP-spezifischen, cGMP-abbauenden PDE5 auf die NO-induzierte cGMP-Antwort analysiert.

4.1.3 Die NO-induzierte cGMP-Antwort im Zeitverlauf und der Einfluß der PDE5

Zur Untersuchung der cGMP-Antwort in den verschiedenen Organen wurde intaktes Gewebe isoliert, in Stücke unterteilt und in physiologischen Puffern gehalten. Um eine endogene NO-Produktion zu verhindern, wurden alle Versuchsansätze in Anwesenheit des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME (200 μ M) durchgeführt. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation mit maximal wirksamen Dosen zweier verschiedener NO-Donatoren, GSNO und DETANO. Darüberhinaus wurden die Gewebe mit ANP behandelt, welches die GC-A stimuliert und infolgedessen zu einer NO-unabhängigen Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration führt. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Schockfrieren des Gewebes in flüssigem Stickstoff gestoppt. Nach Homogenisation der Gewebe-Stücke wurde das extrahierte cGMP mittels RIA und die dazugehörige Proteinmenge mit der BCA-Methode bestimmt und daraus die cGMP-Konzentration berechnet.

In Abb. 4 A-C ist der Zeitverlauf der cGMP-Antwort nach Stimulation mit GSNO, DETANO bzw. ANP in Aorten-Gewebe dargestellt. Die NO-Stimulation führte in allen Geweben zu einer transienten cGMP-Antwort. Dabei kam es nach dem Maximum zu einer schnellen Reduktion der cGMP-Konzentration. In Aorten lag das NO-induzierte cGMP-Maximum bei 60 Sekunden, und das ANP-induzierte cGMP-Maximum bei 240 Sekunden. In der Aorta waren die nach GSNO/DETANO-Stimulation maximal erreichten cGMP-Mengen gegenüber den Ausgangswerten etwa 150fach erhöht, nach ANP-Stimulation 60-fach. Es zeigte sich, daß die verschiedenen NO-Donatoren eine vergleichbare cGMP-Antwort hervorriefen, womit ein Einfluß der Trägersubstanzen auf die cGMP-Antwort ausgeschlossen werden konnte. In Abb. 4 D-F ist der Zeitverlauf der GSNO-induzierten cGMP-Antwort in Bronchius, Vene und Lunge dargestellt. In Venen trat das cGMP-Maximum nach 120 Sekunden, in Bronchien nach 30 Sekunden und im Lungen-Gewebe der Maus nach 10 Sekunden ein. Die GSNO-Stimulation führte in der Vene zu einer 15fachen, in den Bronchien zu einer 25fachen und in der Lunge zu einer ca. 3fachen Erhöhung der cGMP-Konzentration. Die in den Geweben gemessenen cGMP-Konzentrationen schwankten zum Teil sehr stark zwischen den einzelnen Tieren, was die relativ großen Fehlerbalken erklärt.

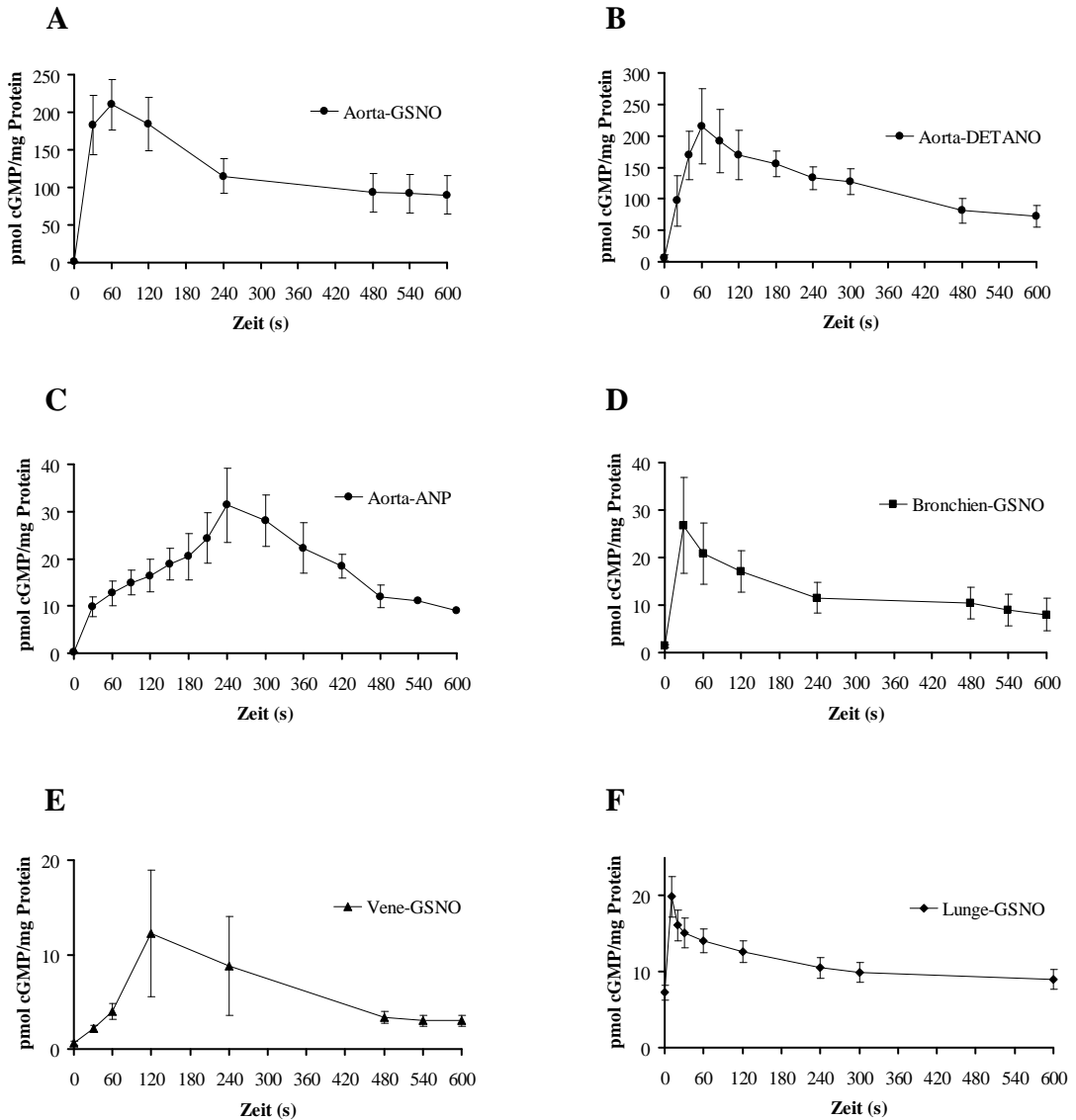


Abb.: 4 NO- und ANP-induzierte cGMP-Antwort im Zeitverlauf

Verschiedene glattmuskuläre Gewebe der Ratte wurden mit verschiedenen NO-Donatoren bzw. ANP stimuliert und die cGMP-Konzentration über die Zeit mittels RIA (siehe 3.1.3) gemessen. In allen untersuchten Geweben führte NO bzw. ANP zu einer transienten cGMP-Antwort, die durch einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration innerhalb von 10-240 Sekunden und einem Rückgang charakterisiert ist. (A-C) zeigen die cGMP-Antworten der Aorten-Streifen nach Stimulation mit GSNO, DETANO und ANP. (D) zeigt die cGMP-Antwort der Bronchien nach GSNO-Stimulation. (E) zeigt die cGMP-Antwort der Vene nach GSNO-Stimulation und (F) die cGMP-Antwort des Lungengewebes nach GSNO-Stimulation. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 7-20 unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

In der glatten Muskulatur wird cGMP hauptsächlich durch die cGMP-stimulierte, cGMP-abbauende PDE5 abgebaut (Rybalkin *et al.*, 2002, 2003). Um die Rolle der PDE5 innerhalb des NO/cGMP-Signalwegs in den verschiedenen Geweben zu untersuchen, wurden die NO-induzierten cGMP-Anstiege über die Zeit in Anwesenheit des PDE5-Hemmstoffs Sildenafil gemessen. Diese Hemmung des cGMP-Abbaus bewirkt eine Akkumulation des cGMPs, das nach Stimulation der NO-GC bzw. der GC-A gebildet wird. In den entsprechenden Versuchen wurden die Gewebe-Streifen für 10 min mit 100 μ M Sildenafil präinkubiert und anschließend mit NO bzw. ANP stimuliert. Die Reaktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt und die cGMP-Konzentration bestimmt. Abb. 5 zeigt, daß infolge der Hemmung der PDE5 die intrazelluläre cGMP-Konzentration bis zu einem Maximum (GSNO: 468 ± 64 pmol cGMP/ mg Protein und ANP: 200 ± 16 pmol cGMP/ mg Protein) ansteigt und dann auf einem Plateau bleibt. Es kann davon ausgegangen werden, daß in der Plateauphase die cGMP-Synthese und der cGMP-Abbau im Gleichgewicht sind. In der Aorta waren die nach GSNO-Stimulation maximal erreichten cGMP-Mengen gegenüber den Ausgangswerten etwa 150fach und nach ANP-Stimulation 50fach erhöht, in den Bronchien 30fach und in der Lunge fast 10fach erhöht. Insgesamt fällt die cGMP-Antwort in Lunge und Bronchien geringer aus als in der Aorta, was durch die verhältnismäßig niedrige Expression der NO-GC und hohe Expression der PDE5 in diesen Organen erklärt werden kann (siehe Abb. 3). In allen untersuchten Geweben führte also die Hemmung der PDE5 zu einer cGMP-Akkumulation. Damit bewirkt eine funktionelle PDE5 den Rückgang der durch die GCs katalysierten Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration und bestimmt somit den transienten Verlauf der NO-induzierten cGMP-Antwort mit. Diese Ergebnisse bestätigen die prominente Rolle der PDE5 für den Abbau von cGMP in der glatten Muskulatur (Rybalkin *et al.*, 2002, 2003).

4.1.4 Dosis-Wirkungskurven für die NO- und die ANP-induzierte cGMP-Antwort

Um die Sensitivität der glattmuskulären Gewebe gegenüber NO bzw. ANP zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Als Inkubationszeit wurden jeweils die Zeitpunkte gewählt, zu denen die cGMP-Antwort maximale Konzentrationen erreicht hatte (siehe Abb. 4). Dementsprechend wurden die Aorten-Streifen mit GSNO für 60 Sekunden und mit ANP für 240 Sekunden inkubiert und anschließend der cGMP-Gehalt bestimmt.

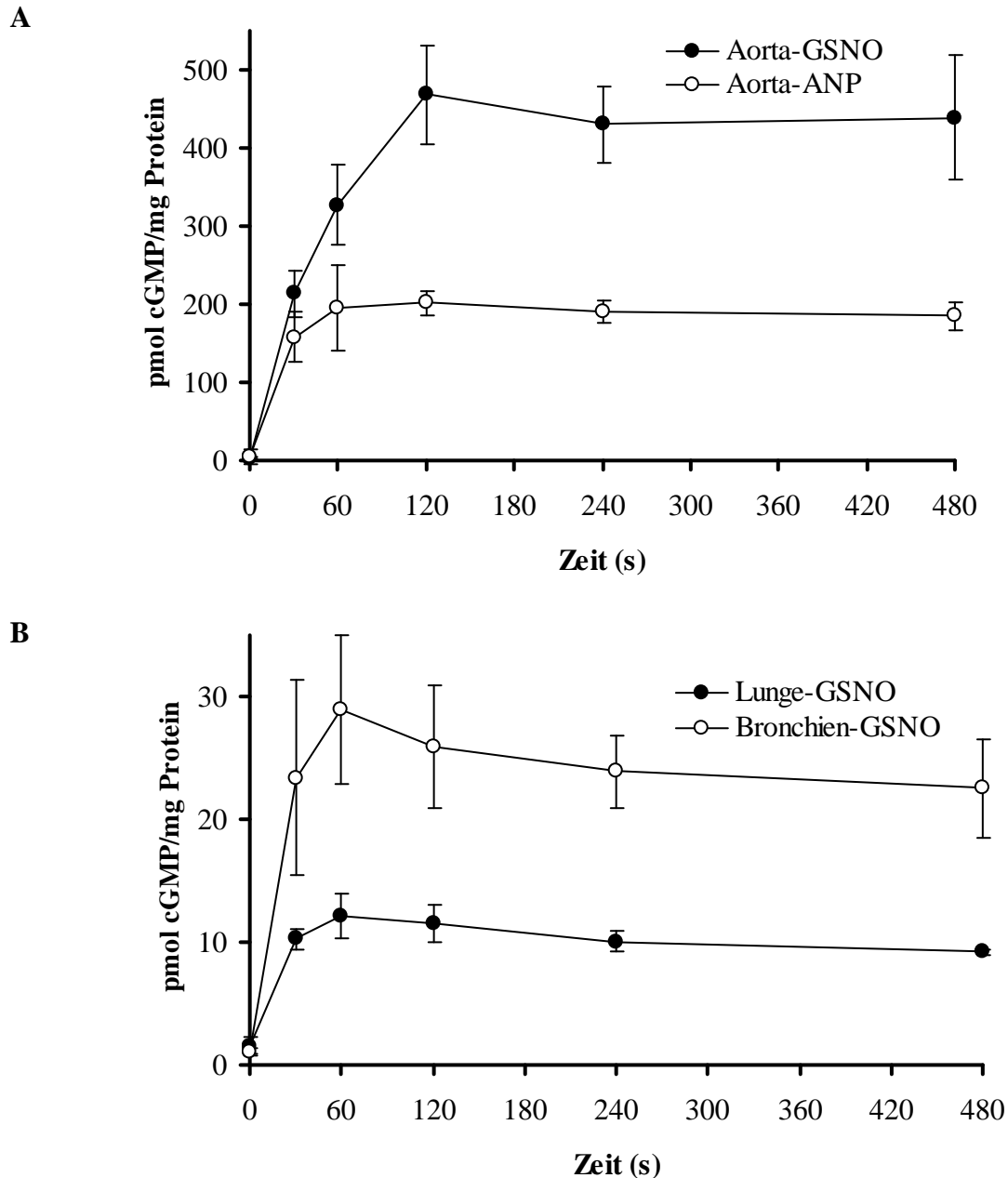


Abb. 5: NO- und ANP-induzierte cGMP-Antwort in Anwesenheit von Sildenafil

Verschiedene glattmuskuläre Gewebe wurden für 10 min mit dem PDE5-Hemmstoff Sildenafil (100 μ M) vorinkubiert und anschließend mit GSNO (100 μ M) oder ANP (100 nM) stimuliert. Mittels RIA wurde die cGMP-Konzentration zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. In allen Geweben bildete sich nach Erreichen eines cGMP-Maximums ein Plateau aus. **(A)** NO- und ANP-induzierte cGMP-Antwort in Rattenaorten in der Anwesenheit von Sildenafil. **(B)** NO-induzierte cGMP-Antwort in Lungen und Bronchien in Anwesenheit von Sildenafil. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3-10 unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

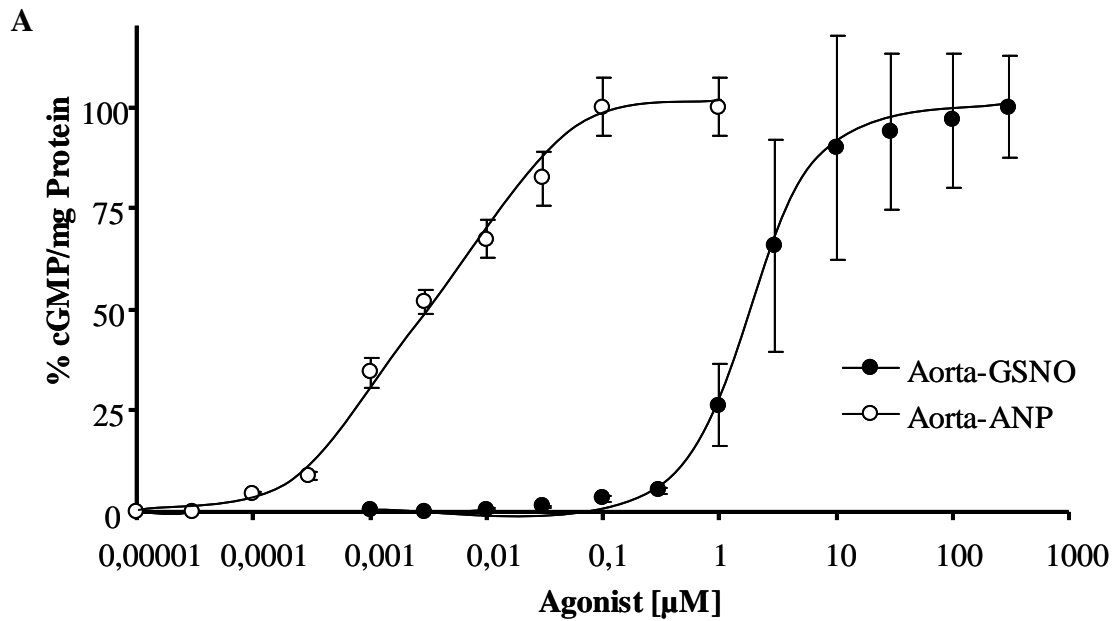
Wie in Abb. 6 dargestellt, ergab sich für GSNO ein EC_{50} -Wert von 3 μM und für ANP ein EC_{50} -Wert von ca. 3 nM. Die maximalen cGMP-Konzentrationen wurden mit einer Dosis von 100 μM GSNO oder 100 nM ANP erreicht. Der direkte Vergleich der Aktivatoren von NO-GC und von GC-A zeigt die enorme Potenz des Peptids ANP in der Aorta. ANP zeigt eine 1000fach höhere Potenz als GSNO, allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß nur jeweils vergleichsweise geringe NO-Mengen aus dem GSNO freigesetzt werden.

4.1.5 Untersuchung zur funktionellen Relevanz in Organbadversuchen

Um die physiologische Relevanz der NO-induzierten cGMP-Antworten zu untersuchen, wurde die NO-induzierte Relaxation von Aorten- und Bronchien-Ringen im Organbad analysiert. Das Organbad ermöglicht sensitive Kraftmessungen am Gewebe oder Organ *ex vivo*. Die Kontraktion von Gewebe-Ringen äußert sich dabei in einer Kraftzunahme, wohingegen die Relaxation mit einer Abnahme der Kraft korreliert, die über Kraftmesser aufgenommen und aufgezeichnet wird. Zunächst wurde die Kontraktion der glatten Muskulatur von Aorta und Bronchus durch die kontraktile Agonisten Carbachol und Phenylephrin herbeigeführt. Nach stabiler Kontraktion wurden Untersuchungen zur Relaxation durchgeführt. Hierzu wurden zuerst Dosis-Wirkungskurven für die Agonisten GSNO, DEANO, DETANO, ANP und 8pCPT-cGMP aufgenommen, um einen Überblick über relaxierende Substanzen zu gewinnen.

4.1.6 Dosis-Wirkungskurven der kontrahierenden und relaxierenden Substanzen

Um die Sensitivität von Aorta und Bronchus gegenüber kontrahierenden und relaxierenden Agonisten zu ermitteln, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Die hier eingesetzten Agonisten Carbachol und Phenylephrin binden an ihre Rezeptoren und führen jeweils G-Protein-gekoppelt zur einer IP_3 -Response, also zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und infolgedessen zur Kontraktion der glatten Muskulatur (siehe 1.2.1). Während in der Aorta eine α -adrenerge Stimulation durch Sympathomimetika wie Phenylephrin zur Kontraktion führt, sind es im glatten Bronchialmuskel direkte Parasympathomimetika wie Carbachol, die eine Kontraktion auslösen. Die Stimulation der NO-GC durch NO-Donatoren sowie die Aktivierung der GC-A durch ANP resultieren in einer gesteigerten cGMP-Bildung, was über die Aktivierung der PKGI zur Relaxation der glatten Muskulatur führt. In den hier aufgeführten Experimenten wurden glattmuskuläre Gewebe von



B

cGMP-Konzentration unstimuliert pmol cGMP/mg Protein	cGMP-Konzentration stimuliert pmol cGMP/mg Protein	EC ₅₀	Stimulation x-fach
0,6	GSNO: 110	3 µM	180
0,6	ANP: 30	3 nM	50

Abb. 6: NO- und ANP- induzierte cGMP-Antworten der Ratten-Aorta

Rattenaortenstreifen wurden mit ansteigenden GSNO-Konzentrationen für 60 Sekunden und mit den ANP-Konzentrationen für 240 Sekunden inkubiert; der cGMP-Gehalt in den Geweben wurde mittels RIA bestimmt (A). In (B) sind die Werte der Dosis-Wirkungskurven tabellarisch gegenübergestellt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 5 bzw. 3 unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

Aorta und Bronchius der Ratte untersucht. Um eine endogene NO-Produktion zu verhindern, wurden im Organbad alle Ansätze in Anwesenheit des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME (200 μM) durchgeführt. In Abbildung 7 A ist die Dosis-Wirkungskurve der Phenylephrin-induzierten Kontraktion dargestellt. Phenylephrin führte zu einer vollständigen Kontraktion bei einer Konzentration von 10 μM . Der EC_{50} -Wert lag bei ca. 30 nM. Für die darauffolgenden Messungen der Relaxation wurde 1 μM Phenylephrin zur Vorkontraktion eingesetzt.

In Abbildung 7 B sind Dosis-Wirkungskurven für verschiedene Relaxantien der mit Phenylephrin vorkontrahierten Aorta aufgezeigt. Es wurden unterschiedliche NO-Donatoren eingesetzt, um einen eventuellen Einfluß der NO-Trägersubstanzen auszuschließen. Diese NO-Donatoren zeigten unterschiedliche Sensitivitäten bezüglich der Aorten-Relaxation, was durch die unterschiedlichen Halbwertszeiten der NO-Freisetzung erklärt werden kann. Der EC_{50} -Wert von GSNO lag bei ca. 100-200 nM. DETANO wies einen EC_{50} -Wert der Relaxation von ca. 5 μM auf. Zur Untersuchung der GC-A-vermittelten Relaxation wurde die Aorta mit dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) stimuliert. ANP führte in sehr geringen Konzentrationen zur Relaxation der Aorta. Der EC_{50} -Wert der Relaxation für ANP lag bei ca. 2 nM. Die ANP-vermittelte Relaxation lief im Gegensatz zu der durch NO-induzierten sehr langsam ab. Möglicherweise diffundiert das Peptid langsamer als das gasförmige, membrangängige NO in das Gewebe. Das nicht durch Phosphodiesterasen hydrolysierbare cGMP-Analogon 8pCPT-cGMP vermittelt die Relaxation nicht über eine GC, sondern durch die direkte Aktivierung der PKGI. Hierfür konnte eine Konzentration zur halbmaximalen Relaxation von ca. 50 μM festgestellt werden.

Analog zu den Versuchen mit der Aorta wurden auch an Bronchien-Ringen Dosis-Wirkungskurven für kontrahierende und relaxierende Substanzen aufgenommen. Abbildung 8 A zeigt die Dosis-Wirkungskurve für Carbachol, das die glatte Muskulatur der Bronchien kontrahiert. Die halbmaximale Kontraktion wurde durch 500 nM Carbachol (EC_{50}) erreicht. Zur Vorkontraktion der Bronchien wurde in den weiteren Versuchen immer 20 μM Carbachol eingesetzt. In Abbildung 8 B sind die Dosis-Wirkungskurven für die NO-Donatoren DEANO und GSNO gezeigt, die zur Relaxation der Bronchialmuskulatur führten. Für DEANO wurde ein EC_{50} -Wert von ca. 1 μM ermittelt. GSNO vermittelt eine halbmaximale Relaxation erst bei einer 10fach höheren Konzentration, bei ca. 10 μM . Da die GSNO-vermittelte Relaxation in einigen Experimenten nicht vollständig war, wurde zur Relaxation der Bronchien das schneller wirkende DEANO eingesetzt.

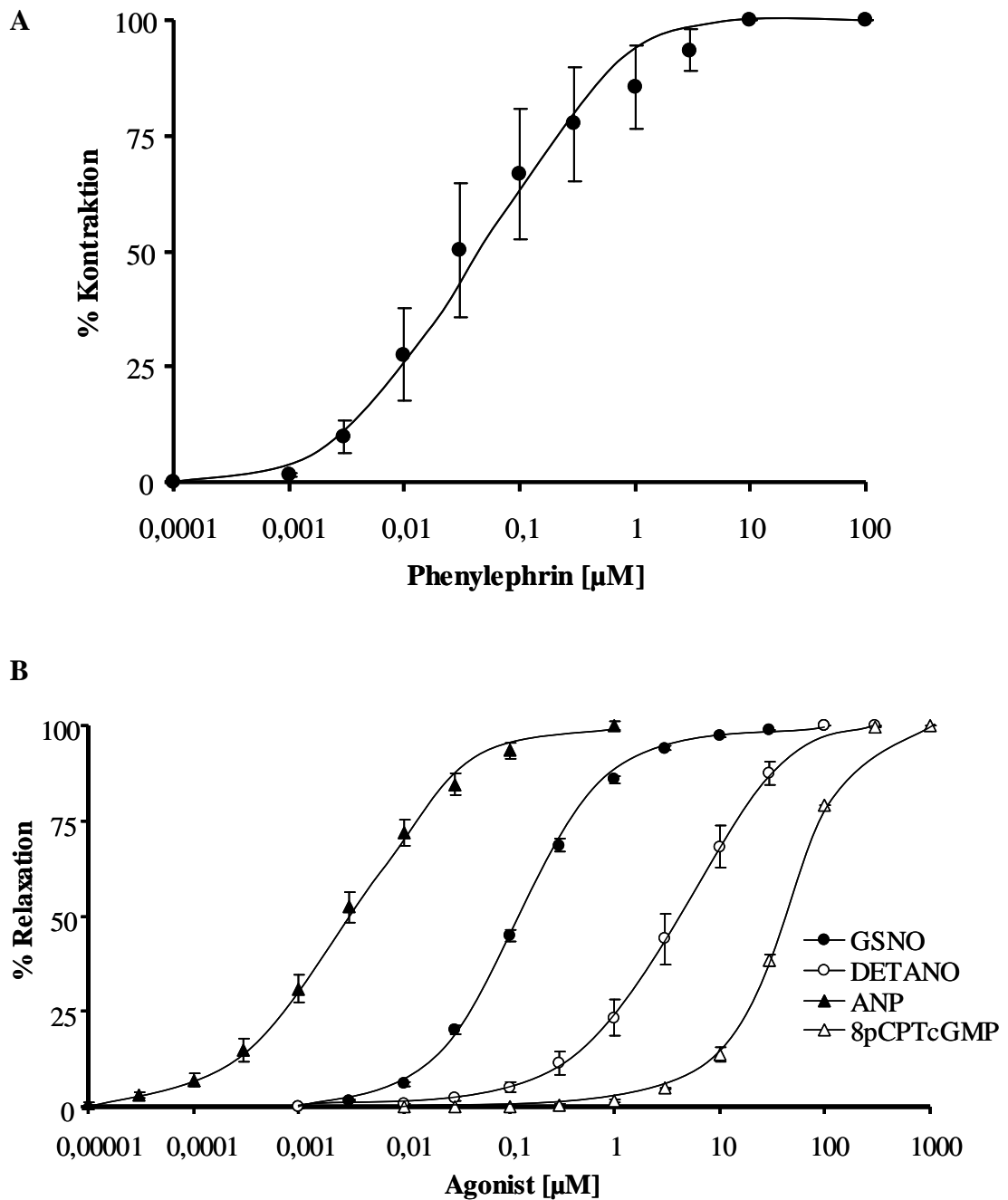


Abb. 7: Kontraktion und Relaxation von Aorten-Ringen im Organbad

Aorte-Ringe der Ratte wurden mit steigenden Konzentrationen Phenylephrin inkubiert (A). Mit 1 μM Phenylephrin vorkontrahierte Aorte-Ringe der Ratte wurden mit verschiedenen relaxierenden Agonisten (B) inkubiert und die resultierende Kontraktion bzw. Relaxation wurde gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3-10 unabhängigen Experimenten mit 4- bzw. 8fach Bestimmung.

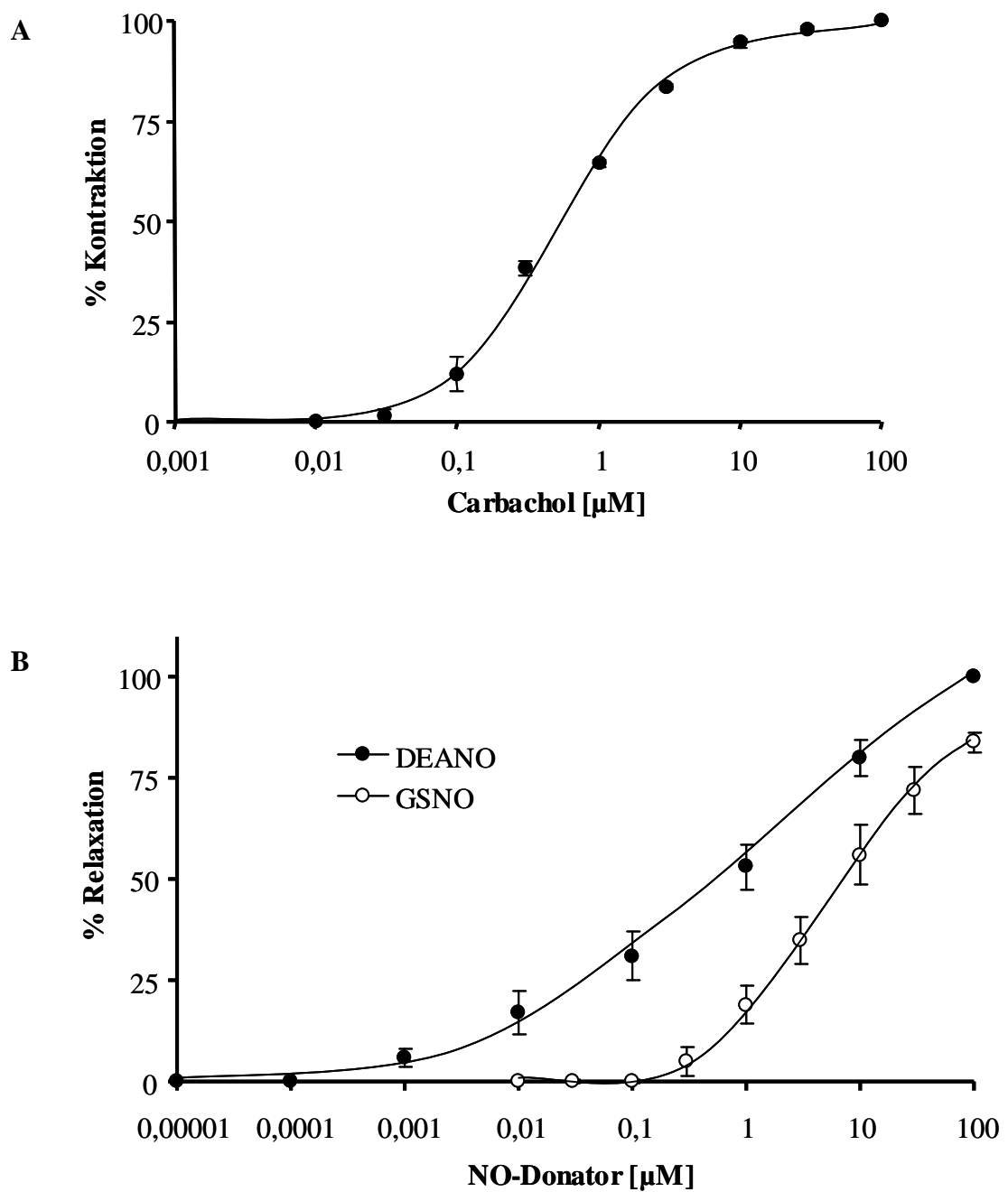


Abb. 8: Kontraktion und Relaxation von Bronchien-Ringen im Organbad

Bronchien-Ringe der Ratte wurden mit steigenden Konzentrationen Carbachol inkubiert (A). Mit 20 μM Carbachol vorkontrahierte Bronchien-Ringe wurden mit den NO-Donatoren DEANO und GSNO inkubiert (B) und die resultierende Kontraktion bzw. Relaxation wurde gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 5-7 unabhängigen Experimenten mit 4- bzw. 8fach Bestimmungen.

4.1.7 Vergleich der GSNO-induzierten Relaxation zwischen Aorta und Bronchius

Die Expression von NO-GC und PDE5 in Aorten und Bronchien unterscheidet sich (siehe Abb. 3), was auf eine unterschiedliche Sensitivität der Kaskade gegenüber NO hindeutet. Daher wurden die GSNO-induzierten Relaxationen dieser beiden Organe miteinander verglichen. Dabei wird deutlich, daß die zur Relaxation notwendige GSNO-Konzentration in den Bronchien fast 100fach höher ist als in der Aorta (Abb. 9). Mit einem EC_{50} -Wert von 100-200 nM GSNO zeigte die Aorta eine wesentlich höhere Sensitivität für NO als die Bronchien (EC_{50} -Wert von 10 μ M GSNO). Dies läßt sich durch das Mengen-Verhältnis von NO-GC zu PDE5 (siehe 4.1 und Abb. 3) erklären. Im Bronchius liegt die PDE5 in wesentlich größerer Menge vor als in der Aorta. Die Menge an NO-GC ist im Bronchius deutlich geringer als in der Aorta, was sich auch in den cGMP-Messungen in Anwesenheit von Sildenafil widerspiegelt (4.1.3).

4.1.8 Vergleich der für die cGMP-Synthese und für die Relaxation notwendigen GSNO-Konzentrationen in der Aorta

In Abbildung 10 sind die Dosis-Wirkungskurven für die GSNO-induzierte cGMP-Bildung in der Aorta (Abb.6) und die GSNO-vermittelte Relaxation der Aorta (Abb.7) dargestellt. Die meßbare NO-induzierte cGMP-Erhöhung trat im Gegensatz zur NO-induzierten Relaxation erst bei ca. 30fach höheren NO-Konzentrationen auf. Dieser Befund spricht dafür, daß eine Relaxation der glatten Muskulatur schon bei geringen Erhöhungen der cGMP-Konzentration hervorgerufen wird, die sich mit unserem Meßsystem nicht messen lassen. Vorstellbar ist dabei, daß lokal bzw. in bestimmten Kompartimenten der Zelle relativ hohe cGMP-Konzentrationen entstehen, die aber bei der Messung der gesamten cGMP-Menge nivelliert werden.

4.1.9 Desensitisierung der NO-induzierten cGMP-Antwort in der Ratten-Aorta

In Thrombocyten konnte eine Desensitisierung der NO-induzierten cGMP-Antwort gezeigt werden (Müllershausen *et al.*, 2001). Der in Abbildung 4 gezeigte transiente Verlauf der NO-induzierten cGMP-Antwort in Aorta und Bronchius ähnelt der cGMP-Antwort in Thrombocyten. Aus diesem Grund sollte ermittelt werden, ob eine Desensitisierung der cGMP-Antwort auch in der glatten Muskulatur auftritt. Hierzu wurden Aorten-Streifen mit

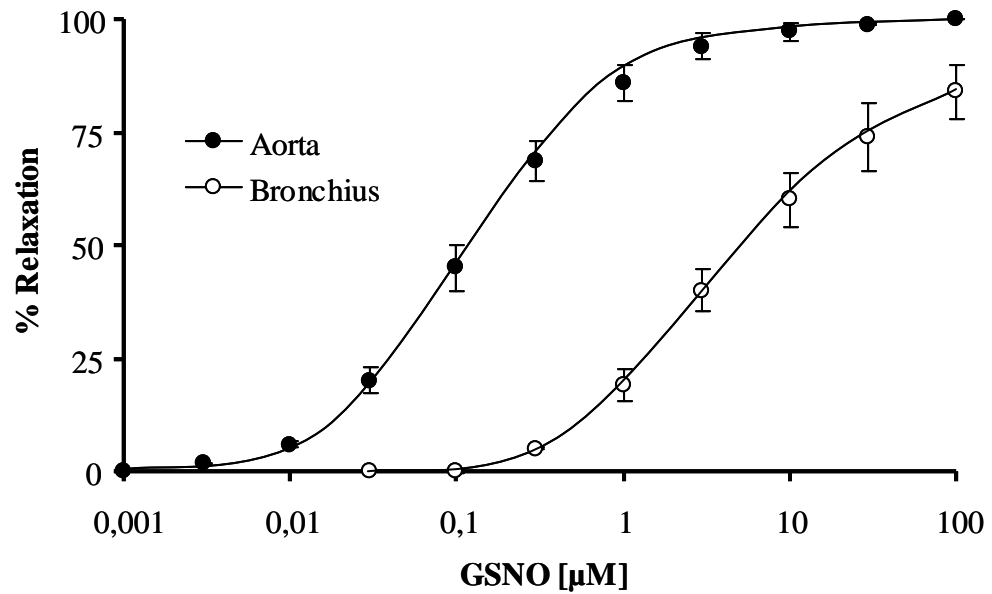


Abb. 9: Vergleich der GSNO-induzierten Relaxationen in Aorta und Bronchien

Hier wurden die Werte der GSNO-induzierten Relaxation aus Abbildung 7 und 8 von Aorta und Bronchus miteinander verglichen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten mit 4- bzw. 8fach Bestimmungen.

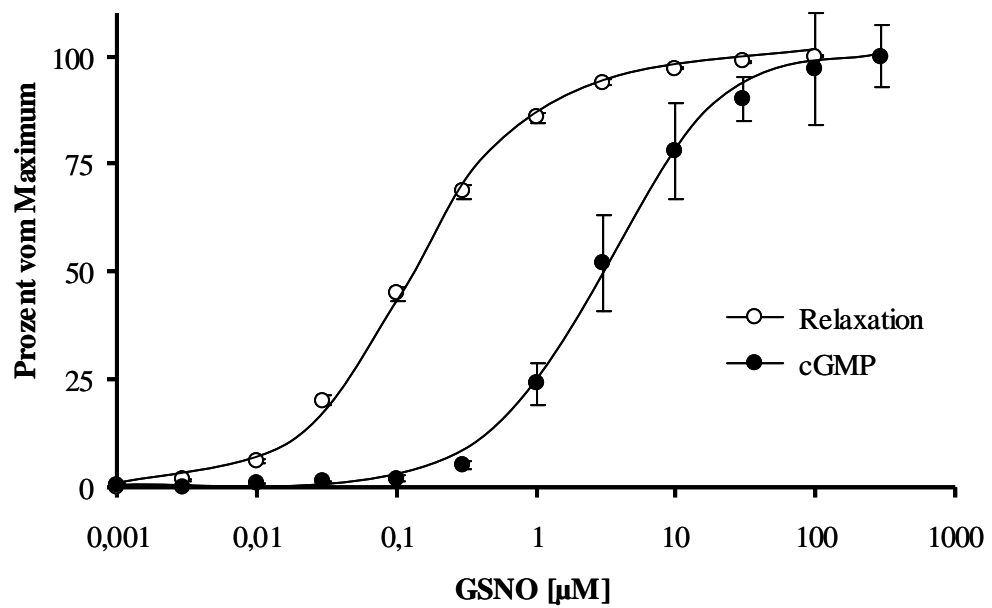


Abb. 10: Vergleich der NO-induzierten cGMP-Bildung und Relaxation in der Aorta

Die in Abbildung 6 ermittelten cGMP-Werte und die in Abbildung 7 gemessenen NO-induzierten Werte der Relaxation wurden prozentual ausgedrückt und miteinander verglichen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3-11 unabhängigen Experimenten mit 4- bzw. 8fach Bestimmungen.

einer submaximal wirksamen GSNO-Konzentration ($10 \mu\text{M}$) für 10 min inkubiert und das NO wieder entfernt. 10, 30 und 60 min später wurde ein zweiter maximal wirksamer NO-Stimulus ($100 \mu\text{M}$) appliziert und die intrazelluläre cGMP-Konzentration wurde mittels RIA zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Als Kontrolle wurde die NO-induzierte cGMP-Bildung in nicht vorinkubierten Aorten-Streifen bestimmt.

Abbildung 11 A zeigt den typischen transienten Verlauf der cGMP-Antwort nach einmaliger Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ GSNO (Kontrolle; siehe auch Abb. 4). Präinkubation mit $10 \mu\text{M}$ GSNO führte zu einer stark verringerten cGMP-Antwort in den Aorten. Kontroll-Aorten zeigten eine maximale NO-induzierte cGMP-Konzentration von ca. $190 \pm 33 \text{ pmol cGMP/mg Protein}$. Vorinkubierte Aorten hingegen zeigten eine maximale cGMP-Konzentration von nur $66 \pm 15 \text{ pmol cGMP/mg Protein}$, dies entsprach einer Reduktion von 66 %. Der NO/cGMP-Signalweg in der glatten Muskulatur kann also wie in Thrombocyten durch Vorinkubation mit submaximal effektiven NO-Konzentrationen desensibilisiert werden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde getestet, wie lange die NO-induzierte Desensibilisierung anhält. 30 min nach der NO-Vorinkubation war die cGMP-Antwort immer noch um 50 % verringert (Abb. 11 B). Sogar 60 min nach der Vorinkubation war immer noch eine deutliche Verringerung von 30 % gegenüber der Kontrolle (Abb. 11 C) zu erkennen. Insgesamt läßt sich zusammenfassen, daß die in Thrombocyten beschriebene NO-induzierte Desensibilisierung der NO/cGMP-Signalkaskade sich auch in einem weiteren System, der glatten Muskulatur, nachweisen läßt. Wie in Thrombocyten führt dort eine Vorinkubation mit submaximal effektiven NO-Konzentrationen zur Abschwächung eines erneuten NO-induzierten cGMP-Signals.

4.1.10 Desensibilisierung der cGMP-Antwort in der Maus-Lunge

Anschließend wurde die Desensibilisierung der NO/cGMP-Signalkaskade in einem nicht-glattmuskulären Organ, der Lunge, untersucht. Hierzu wurde peripheres Lungen-Gewebe, in dem der Anteil an glatter Muskulatur (Bronchien, Arterien, Venen) relativ gering ist, mit einer submaximal wirksamen GSNO-Konzentration ($10 \mu\text{M}$) für 10 min inkubiert und das NO wieder entfernt. 10 min später wurde ein zweiter GSNO-Stimulus von $100 \mu\text{M}$ appliziert, die Reaktion wurde nach 10 Sekunden gestoppt und anschließend die intrazelluläre cGMP-Konzentration mittels RIA bestimmt. Dieser Zeitpunkt zur cGMP-Bestimmung wurde so gewählt, daß die intrazelluläre cGMP-Konzentration maximal war (Abb. 4). Als Kontrolle wurde die cGMP-Bildung ohne Präinkubation und ohne die Zugabe von NO be-

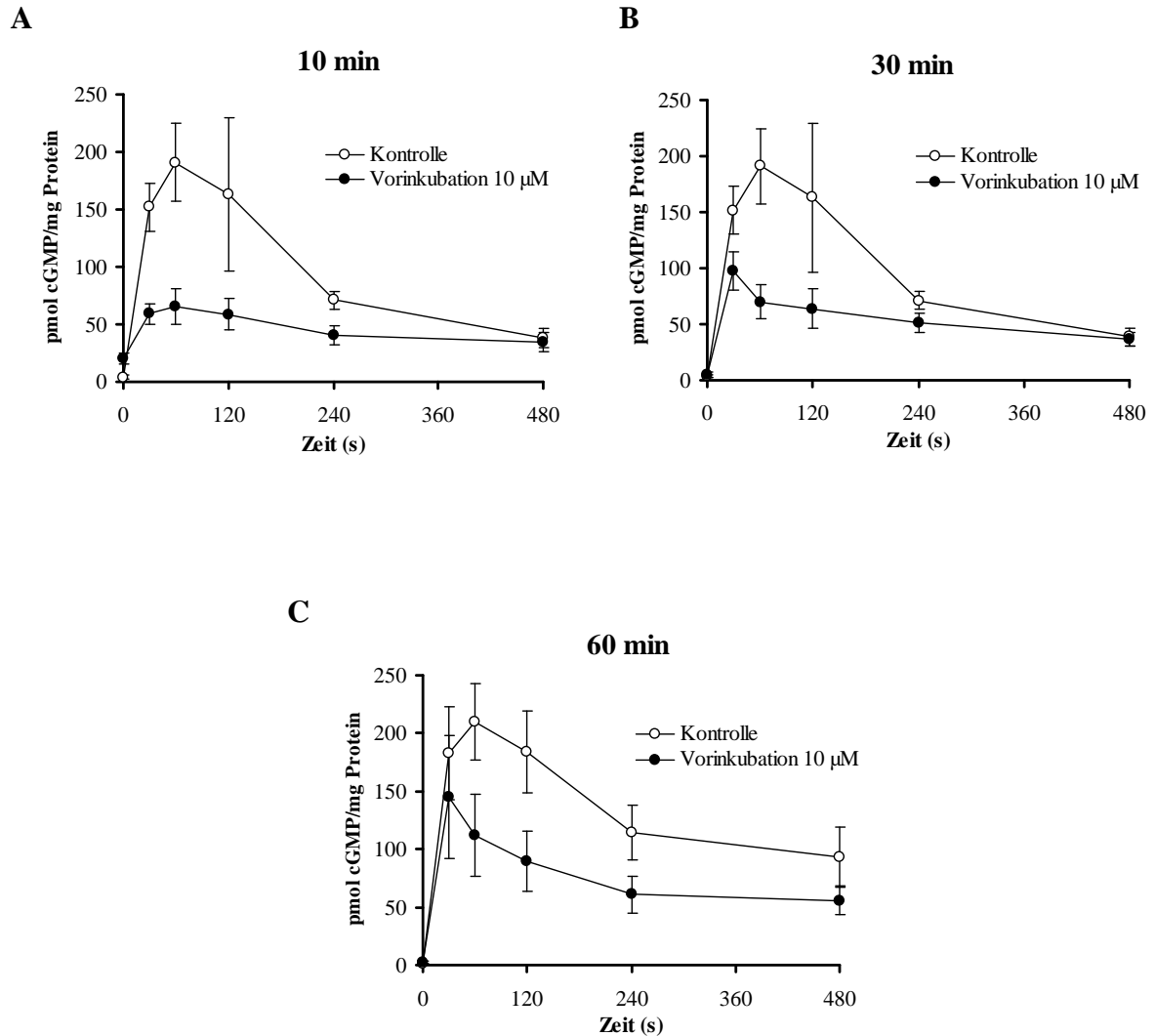


Abb. 11: Desensibilisierung der NO-induzierten cGMP-Antwort in der glatten Muskulatur der Aorta

Rattenaortenstreifen wurden 10 min mit 10 μ M GSNO präinkubiert, das NO aus dem Inkubationspuffer ausgewaschen und nach 10 min (A), 30 min (B) und 60 min (C) wurde erneut mit 100 μ M GSNO stimuliert. Der cGMP-Gehalt wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels RIA bestimmt. Zur Kontrolle wurde die NO-induzierte cGMP-Akkumulation ohne NO-Vorinkubation bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 8-20 unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

stimmt. In Abb. 12 sind die maximalen NO-induzierten cGMP-Antworten ohne und mit Vorinkubation dargestellt.

NO führt auch in der Lunge zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration von $3,1 \pm 0,3$ auf $21,2 \pm 0,6$ pmol cGMP pro mg Protein (7fach). Die Stimulation des mit NO vorinkubierten Lungen-Gewebes führt nur zu einer ca. 2fachen Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration auf $6,9 \pm 0,3$ pmol cGMP pro mg Protein. Damit führt die Vorinkubation mit NO zu einer um 65% reduzierten cGMP-Akkumulation, demzufolge weist auch die Lunge eine Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs auf.

4.1.11 Desensibilisierung der NO/cGMP-vermittelten Relaxation im Organbad

In der Aorta und in der Lunge konnte eine Reduktion der NO-induzierten cGMP-Antwort nach NO-Vorinkubation gezeigt werden (Abb. 11 und 12). In Organbad-Experimenten sollte nun geklärt werden, wie sich diese verringerte cGMP-Menge funktionell auf die Gefäße auswirkt, d.h. ob eine kurze NO-Vorinkubation die Relaxation überhaupt beeinflusst und ob es zu einer Abschwächung der NO-induzierten Relaxation von Aorten- und Bronchien-Ringen kommt.

Zur Untersuchung der Desensibilisierung der NO/cGMP-vermittelten Relaxation wurden die im Organbad fixierten Ringe für 10 min mit verschiedenen NO-Donatoren (Prolino, GSNO und DETANO) vorinkubiert, das NO aus der Organbad-Kammer entfernt und die Gefäße kontrahiert (Aorta: $1 \mu\text{M}$ PE und Bronchien: $20 \mu\text{M}$ CCh). Als Kontrolle dienten Gefäße, die vor der Kontraktion nicht mit NO vorinkubiert wurden. Nach Erreichen eines Plateaus in der Kontraktionsphase (Aorta: 30-45 min und Bronchien: 5-10 min) wurden die Gefäße mit dem jeweiligen NO-Donator (GSNO und DETANO) relaxiert.

Die Konzentration des NO-Donators wurde dabei so gewählt, daß eine etwa 50%ige Relaxation (Abb. 7 B) ausgelöst wurde. Abbildung 13 A zeigt eine repräsentative Aufzeichnung eines Desensibilisierungsversuchs im Organbad. Zur Auswertung wurde die NO-induzierte Relaxation der vorinkubierten Ringe ermittelt und mit der Relaxation von nichtvorinkubierten Ringen verglichen (Abb. 13 B). Abbildung 13 C zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Die Stimulation mit 100 nM GSNO führte in den Kontroll-Gefäßen zu einer Relaxation von 55%. Die mit NO vorinkubierten Gefäße relaxierten nur um 31%, was einer Reduktion von 44 % entspricht. Um festzustellen, ob die beobachtete Desensibilisierung tatsächlich auf das von GSNO freigesetzte NO zurückzuführen ist, oder es sich um NO-unabhängige Effekte handelt, wurde dieses Experiment mit verschiedenen NO-Dona-

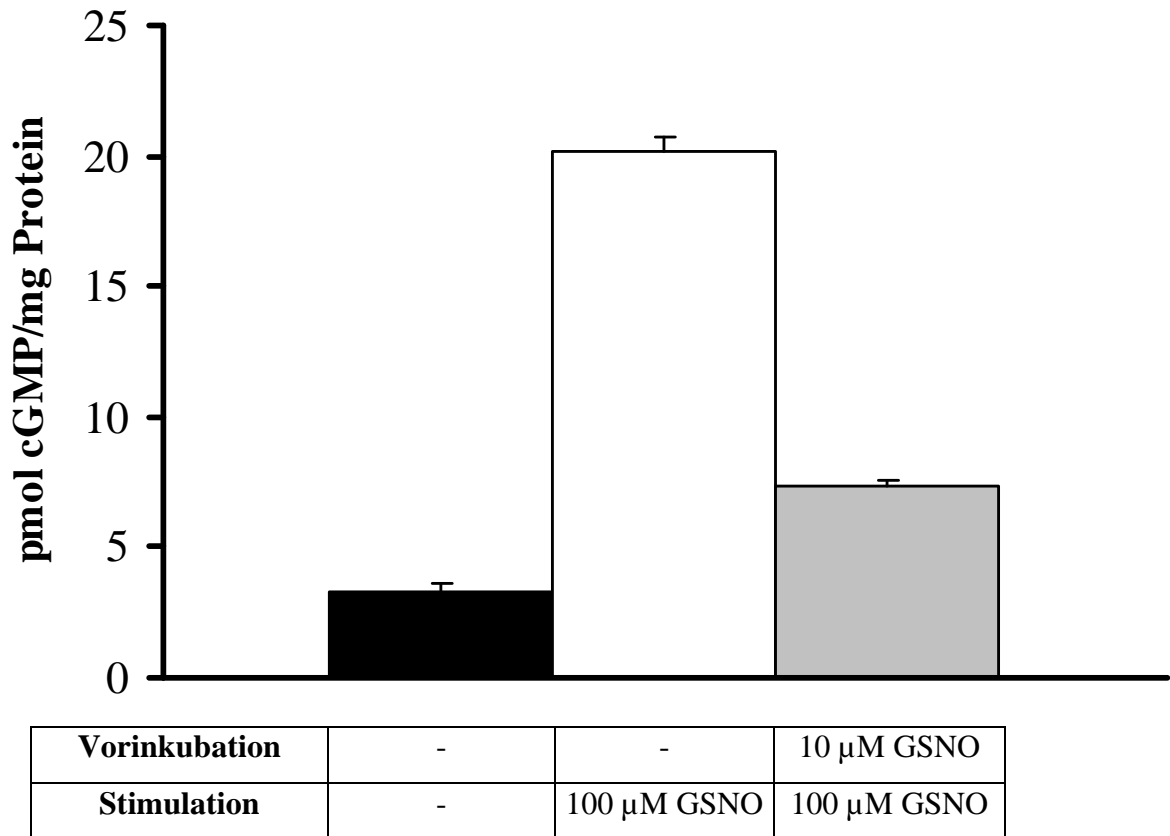


Abb. 12: Desensibilisierung der cGMP-Antwort in Lungengewebe der Maus

Lungengewebe wurde für 10 min mit 10 μ M GSNO präinkubiert, das NO ausgewaschen und 10 min später wurde erneut mit 100 μ M GSNO stimuliert. Nach 10 Sekunden wurde die Reaktion gestoppt, das cGMP isoliert und mittels RIA quantifiziert (grau). Zum Vergleich wurde der cGMP-Gehalt nach NO-Stimulation ohne Vorinkubation bestimmt (weiß). Zur Kontrolle wurden die cGMP-Konzentrationen ohne NO-Stimulus (schwarz) bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

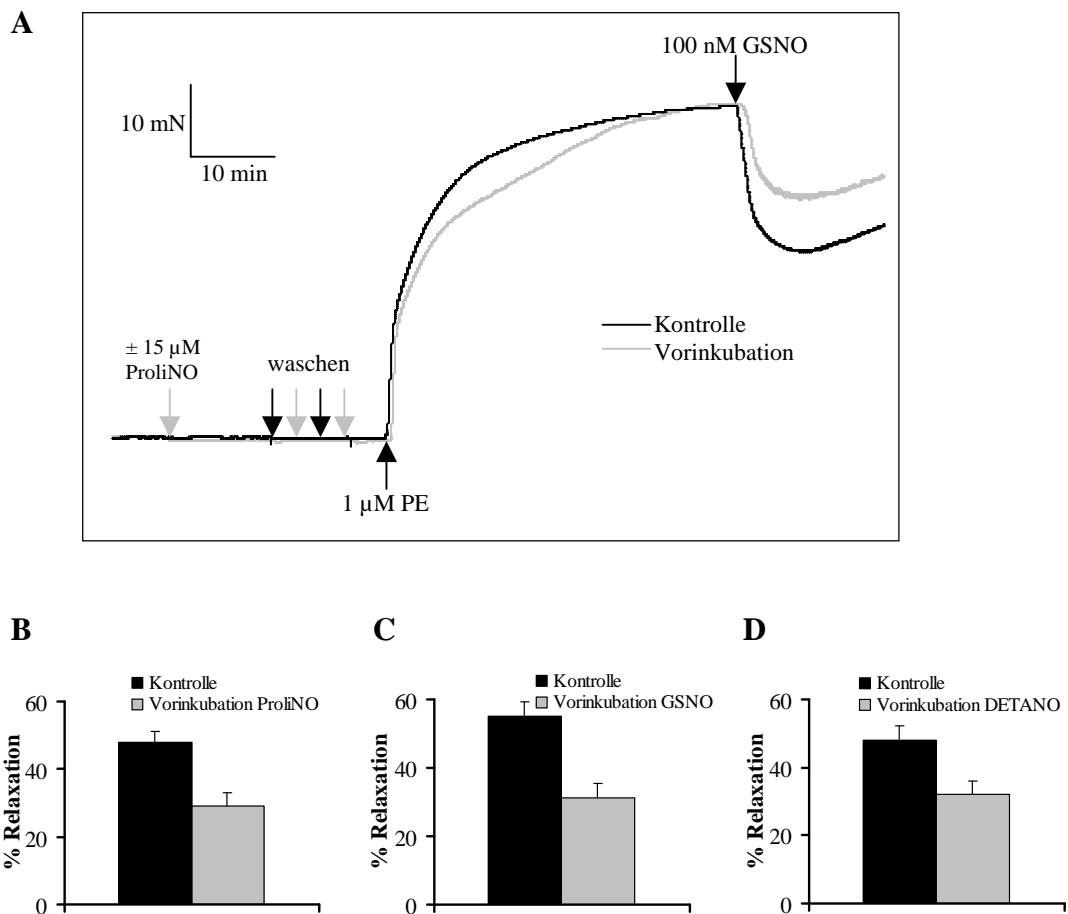


Abb. 13: Desensitisierung der NO/cGMP-vermittelten Relaxation in der Aorta

Aorten-Ringe wurden mit einer submaximal wirksamen NO-Konzentration (15 μ M Prolino, 10 μ M GSNO oder 30 μ M DETANO) präinkubiert, das NO aus dem Inkubationspuffer ausgewaschen und die Gefäße mit 1 μ M PE kontrahiert. Nach Erreichen der maximalen Kontraktion (30-45 min) wurden die Gefäße mit der halbmaximal wirksamen Konzentration dieser NO-Donatoren (100 nM GSNO, 5 μ M DETANO) relaxiert. Als Kontrolle dienten Aorten-Ringe ohne NO-Vorinkubation. **(A)** Zeigt eine repräsentative Aufzeichnung eines Desensitierungsversuchs im Organbad. **(B-D)** Zeigt die statistische Auswertung der aufgeführten Experimente. Die verwendeten NO-Donatoren waren 15 μ M Prolino/ 100 nM GSNO (B), 10 μ M GSNO/ 100 nM GSNO (C) und 30 μ M DETANO/ 5 μ M DETANO (Vorinkubation/ Stimulation). Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 5-8 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

toren wiederholt. Die hier eingesetzten NO-Donatoren besitzen verschiedene Trägermoleküle und setzen ihr NO spontan, aber mit unterschiedlichen Halbwertszeiten frei. Gefäße, die mit 15 μM ProliNO vorinkubiert wurden, zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion von ca. 40 % der GSNO-induzierten Relaxation gegenüber den Kontroll-Gefäßen (Abb. 13 A, B). Die Vorinkubation mit 10 μM DETANO verringerte die Relaxation (ausgelöst durch 5 μM DETANO) um ca. 35 % (Abb. 12 D) im Vergleich zur Kontrolle.

Da die cGMP-Werte im Bronchius sehr gering waren (siehe Abb. 4), konnte eine NO-induzierte Desensibilisierung, d.h. eine NO-vermittelte Reduktion der cGMP-Antwort, leider nicht gemessen werden. Die Desensibilisierung im Bronchius konnte allerdings in Organbadexperimenten untersucht werden. Abbildung 14 A zeigt eine repräsentative Aufzeichnung eines Desensibilisierungsversuchs in Bronchien. Kontroll-Gefäße und mit 30 μM DEANO präinkubierte Gefäße wurden mit 20 μM CCh kontrahiert und nach ca. 5-10 min mit 1 μM DEANO relaxiert. Die Stimulation mit 1 μM DEANO führte in den Kontroll-Gefäßen zu einer Relaxation von 50%. Die vorinkubierten Gefäße relaxierten nur um 27%, was einer Reduktion von 46 % entspricht (Abb. 14 B). Eine Vorinkubation von Bronchien-Ringen mit einer submaximal wirksamen DEANO-Konzentration führte ebenfalls zu einer Abnahme der NO-induzierten Relaxation, also zu einer NO-induzierten Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs.

4.1.12 Nachweis der aktiven PDE5 im desensibilisierten NO/cGMP-Signalweg

In Thrombocyten wurde die Desensibilisierung auf eine schnelle und langanhaltende Aktivierung der PDE5 zurückgeführt, die nach NO-Inkubation durch cGMP vermittelt wird. Parallel dazu wird die PKGI durch cGMP stimuliert, was unter anderem in einer Phosphorylierung der PDE5 am Ser-102 resultiert (Müllershausen *et al.*, 2003). Ob die beobachtete Desensibilisierung der cGMP-Antwort (Abb. 11) und der NO-induzierten Relaxation (Abb. 13 und 14) wie in Thrombocyten auf eine langanhaltende Aktivierung der PDE5 zurückzuführen ist, sollte im nächsten Experiment geklärt werden. Hier wurde die PDE5-Aktivierung anhand der Phosphorylierung in den NO-stimulierten Geweben analysiert. Die phosphorylierte, aktivierte PDE5 kann mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Es wurden die gleichen Inkubations-Bedingungen wie bei den Versuchen zur Desensibilisierung (4.1.11) gewählt. Abbildung 15 zeigt repräsentative Ergebnisse der PDE5-Phosphorylierung in Aorta und Bronchius im Western-Blot. In der Aorta wurde die aktivierte PDE5 zu allen Zeitpunkten (10, 30, 60 min) nach der NO-Stimulation detektiert.

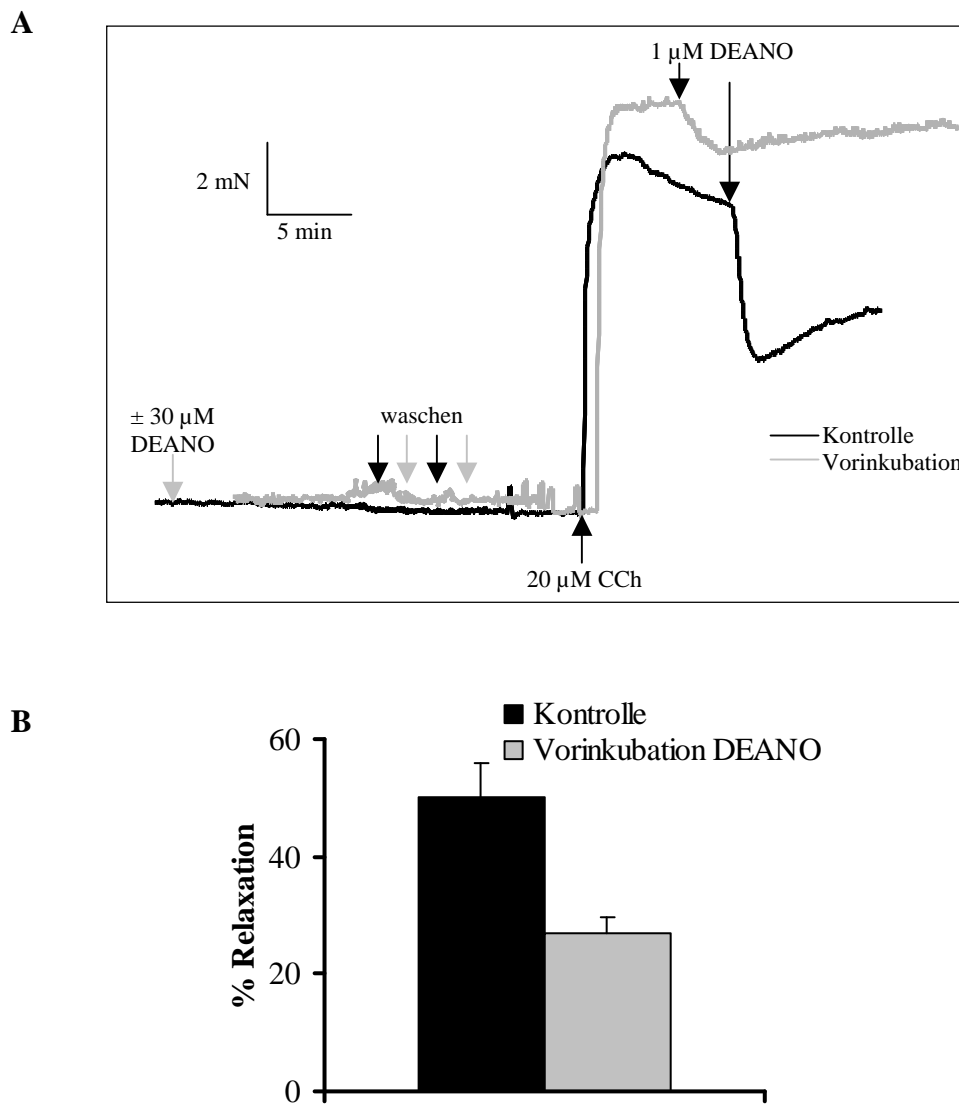


Abb. 14: Desensibilisierung der NO/cGMP-vermittelten Relaxation in Bronchien

Bronchien-Ringe wurden für 10 min mit 30 μ M DEANO präinkubiert, das NO aus dem Inkubationspuffer ausgewaschen und die Gefäße mit 20 μ M CCh kontrahiert. Nach Erreichen der maximalen Kontraktion (5-10 min) wurden die Gefäße mit der halbmaximal wirksamen Konzentration von DEANO (1 μ M) relaxiert. Als Kontrolle dienten Bronchien-Ringe ohne NO-Vorinkubation. **(A)** zeigt eine repräsentative Aufzeichnung eines Desensibilisierungsversuchs im Organbad. **(B)** zeigt die statistische Auswertung der durchgeführten Experimente. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 10 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

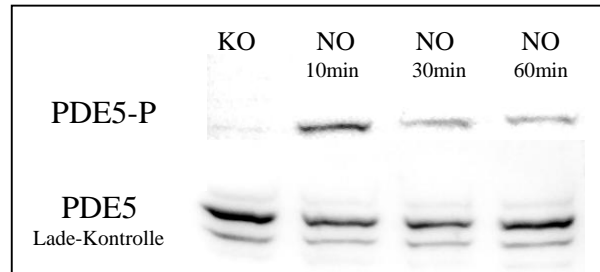
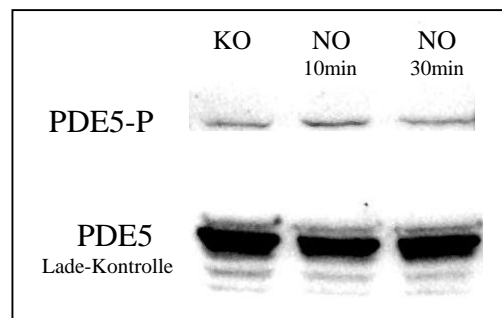
A**B**

Abb. 15: Nachweis der phosphorylierten, aktivierten PDE5 während der Desensibilisierung

Gezeigt sind repräsentative Western-Blots der zytosolischen Fraktionen (25 µg Protein) von Aorta und Bronchius. Mit spezifischen Antikörpern wurde die phosphorylierte, aktivierte Form der PDE5 nachgewiesen. Als Lade-Kontrolle wurde die PDE5 mit einem Antikörper nachgewiesen, der sowohl die nicht-phosphorylierte als auch die phosphorylierte Form erkennt. In der Aorta (**A**) wurde die phosphorylierte PDE5 10, 30 und 60 Minuten nach der NO-Stimulation detektiert. In den Bronchien (**B**) wurde die phosphorylierte Form sowohl in nicht-stimulierten als auch in NO-stimulierten Bronchien nachgewiesen. Durch NO-Behandlung kam es zu einer Zunahme der Phosphorylierung. Die Lade-Kontrolle zeigt die Anwesenheit gleicher Mengen PDE5 im Western-Blot.

Zehn Minuten nach der Stimulation war der Anteil der phosphorylierten PDE5 am größten, aber auch nach 30 bzw. 60 min war sie noch nachweisbar. Der Nachweis der gesamten PDE5-Menge (Lade-Kontrolle) bestätigt, daß vergleichbare Mengen an Protein analysiert wurden.

Auch in Bronchien wurde die aktivierte PDE5 nach der NO-Stimulation detektiert (Abb. 15 B). Die phosphorylierte PDE5 konnte, im Gegensatz zur Aorta, auch in den nicht-stimulierten Bronchial-Geweben nachgewiesen werden. Also liegt dort auch ohne die Zugabe von NO ein Teil der PDE5 phosphoryliert vor, so daß der cGMP-Abbau viel schneller einsetzt. Nach der NO-Gabe erhöhte sich die Menge der phosphorylierten aktiven PDE5, und sie konnte auch 30 min nach der Stimulation noch detektiert werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in Thrombocyten beobachtete Desensitisierung sowohl in der glatten Muskulatur der Aorta und des Bronchius als auch in der Lunge nachgewiesen werden konnte. Wie in den Thrombocyten kommt es auch in der glatten Muskulatur zu einer Phosphorylierung der PDE5, was auf eine cGMP-vermittelte Aktivierung und damit auf einen vermehrten cGMP-Abbau hindeutet. Daher ist vorstellbar, daß die NO-induzierte Desensitisierung einen prinzipiellen Mechanismus darstellt, mit dem Zellen und Gewebe, die die NO-GC und die PDE5 exprimieren, ihre Sensitivität gegenüber NO einstellen können.

4.1.13 Die Identifizierung des Mechanismus der NO-induzierten Desensitisierung in der glatten Muskulatur (Kreuzdesensitisierung).

Zur Desensitisierung des NO/cGMP-Signalwegs wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wie beispielsweise eine verringerte NO-Verfügbarkeit (Mülsch *et al.*, 1988; Münzel *et al.*, 1995; Parker und Gori, 2001) oder eine veränderte Aktivität der NO-GC (Bellamy *et al.*, 2000). In Thrombocyten konnte gezeigt werden, daß die PDE5 für die Desensitisierung verantwortlich ist (Müllershausen *et al.*, 2003). In diesen Zellen wird die PDE5 durch cGMP aktiviert und durch die ebenfalls cGMP-aktivierte PKGI phosphoryliert. Diese Phosphorylierung stabilisiert den aktiven Zustand der PDE5, so daß sie über einen Zeitraum von über 60 Minuten cGMP vermehrt abbaut. Um zu ermitteln, ob die NO-induzierte Desensitisierung in der glatten Muskulatur ebenfalls auf eine erhöhte und langanhaltende PDE5-Aktivität zurückzuführen ist, wurden weitere Experimente durchgeführt. Da die Bestimmung der NO-GC- und PDE5-Aktivitäten im intakten Gewebe nicht möglich ist, wurden sie im Organbad funktionell getestet. Dazu wurde zunächst die ANP/cGMP-ver

mittelte Relaxation und die ANP-induzierte Desensibilisierung aufgezeigt. Eine Vorinkubation mit 100 nM ANP führte über Stimulation der membranständigen GC-A ebenfalls zu einer Verringerung der darauffolgenden ANP-induzierten Relaxation ($EC_{50}=2$ nM ANP) um 80 % (Abb. 16 A). Danach wurde untersucht, ob nach NO-Vorinkubation die ANP-vermittelte Relaxation ebenfalls vermindert ist, was einer Kreuzdesensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs entspräche.

Dazu wurden die Aorten-Ringe mit 15 μ M ProliNO vorinkubiert, das NO aus der Organbad-Kammer ausgewaschen und die Gefäße mit 1 μ M PE kontrahiert. Nach ca. 35 min wurde der maximale Kontraktionszustand erreicht, und die Gefäße wurden dann mit 2 nM ANP relaxiert. Zur Auswertung wurde die ANP-induzierte Relaxation der vorinkubierten Ringe ermittelt und diese mit der Relaxation von nicht-vorinkubierten Ringen verglichen. Abbildung 16 B zeigt eine repräsentative Aufzeichnung eines Kreuzdesensibilisierungsversuchs im Organbad und die statistische Auswertung der Experimente. Kontroll-Gefäße relaxierten nach der Applikation von 2 nM ANP um 30 %. Vorinkubierte Aorten-Ringe zeigten eine Relaxation von 10 %. Die Vorinkubation mit NO führt also zu einer 67 %igen Abnahme der ANP-induzierten Relaxation. Damit konnte bestätigt werden, daß die NO- bzw. ANP-induzierte Desensibilisierung in der Aorta nicht durch eine verminderte Aktivität der NO-GC vermittelt werden kann und daß ein der NO-GC nachgeschalteter Mechanismus für die Desensibilisierung verantwortlich ist.

Um zu zeigen, daß diese Desensibilisierung auf die PDE5-Aktivität und nicht z.B. auf die PKGI zurückzuführen ist, wurde die Relaxation mit einem nicht-hydrolysierbaren cGMP-Analogon (8pCPT-cGMP) untersucht. 8pCPT-cGMP vermittelt eine Relaxation durch die direkte Aktivierung der PKGI. Die zur Relaxation eingesetzte Konzentration des cGMP-Analogons betrug 50 μ M. Abbildung 17 zeigt eine repräsentative Aufzeichnung dieses Organbadversuchs. Die Kontroll-Gefäße und die vorinkubierten Gefäße relaxierten nach 8pCPT-cGMP-Gabe nahezu identisch. In beiden Fällen wurde eine 50%ige Relaxation erreicht. Somit kam es zu keiner Verringerung der Relaxation durch die NO-Vorinkubation. Da die Relaxation durch die direkte Aktivierung der PKGI unverändert war, muß die Desensibilisierung oberhalb der PKGI, also auf der Ebene der cGMP-Bildung oder des cGMP-Abbaus, stattfinden. Auch in Thrombocyten konnte ein Einfluß der NO-GC auf die Desensibilisierung ausgeschlossen werden (Müllershausen *et al.*, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, daß die NO-induzierte Desensibilisierung auch in der glatten Muskulatur auf die Aktivierung der PDE5 und den damit verbundenen vermehrten und langanhaltenden cGMP-Abbau zurückzuführen ist. Da die De-

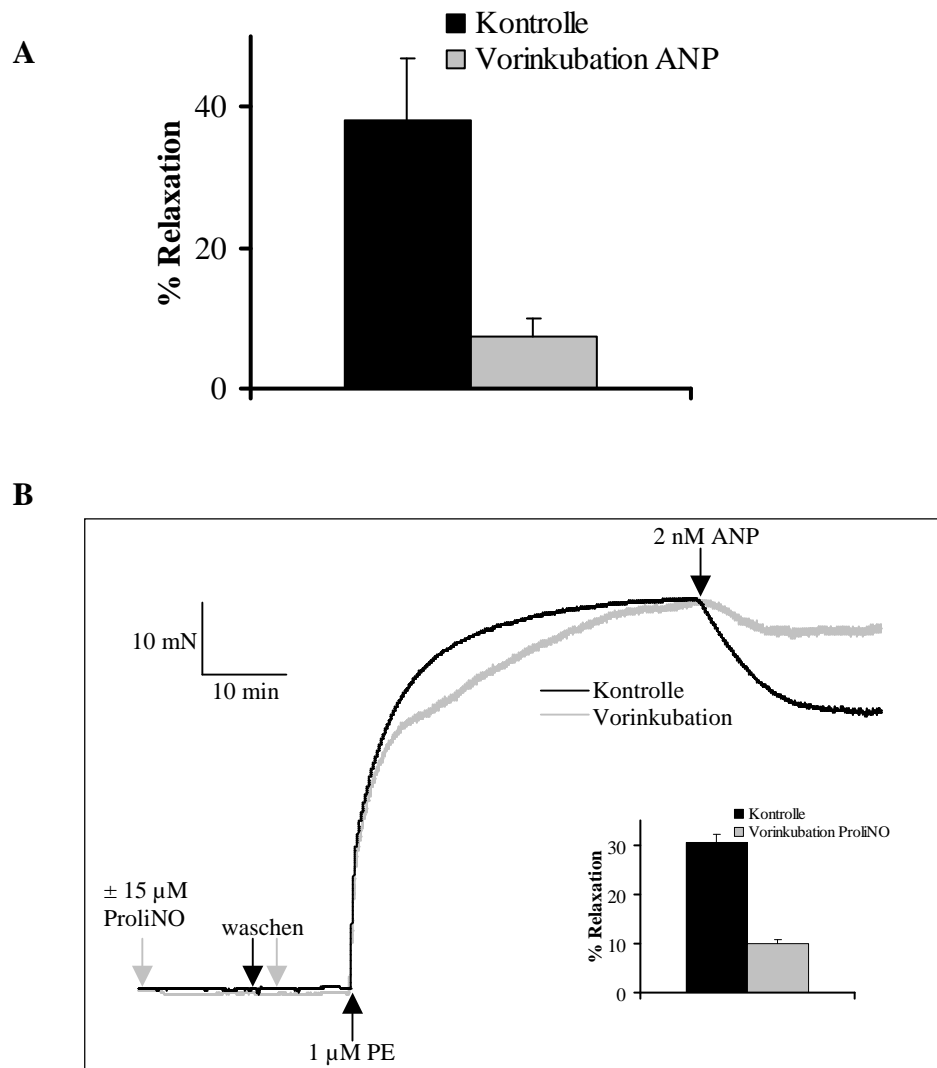


Abb. 16: Desensitierung und Kreuzdesensitierung der NO-/cGMP bzw. ANP/cGMP-vermittelten Relaxation

Aorten-Ringe wurden zuerst mit 100 nM ANP präinkubiert und nach der Kontraktion mit 2 nM ANP relaxiert (siehe Abb. 13). (A) zeigt die statistische Auswertung dieser Experimente. (B) zeigt eine repräsentative Aufzeichnung einer Kreuzdesensitierung im Organbad. Hierzu wurden Aorten-Ringe für 10 min mit 15 μ M ProlNO präinkubiert, das NO ausgewaschen und die Gefäße mit 1 μ M PE kontrahiert. Nach dem Erreichen eines Kontraktions-Plateaus (30-45min) wurden die Gefäße mit 2 nM ANP (EC_{50}) relaxiert. Zur Kontrolle wurden Aorten-Ringe ohne NO-Vorinkubation relaxiert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

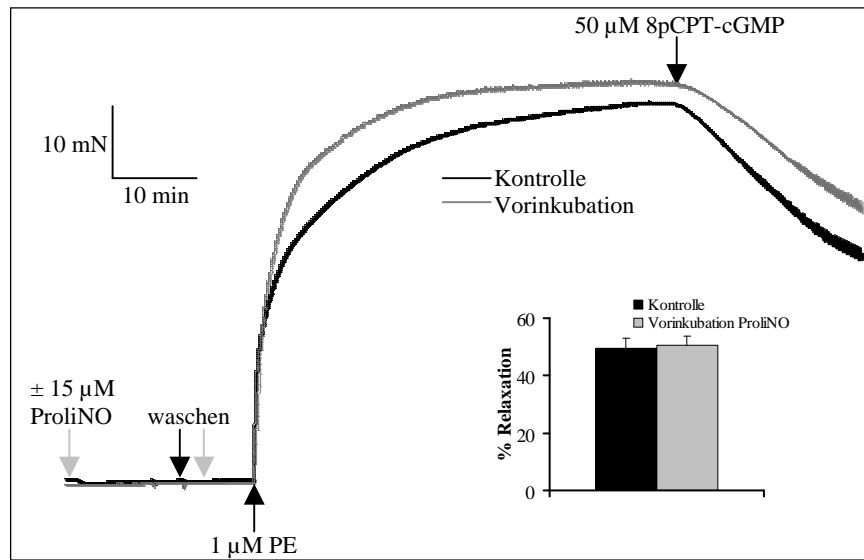


Abb. 17: Untersuchung zum Mechanismus der Desensibilisierung

Aorten-Ringe wurden für 10 min mit 15 μM ProliNO präinkubiert, das NO ausgewaschen und die Gefäße mit 1 μM PE kontrahiert. Nach dem Erreichen eines Kontraktions-Plateaus (30-45min) wurden die Gefäße mit 50 μM 8pCPT-cGMP relaxiert. Zur Kontrolle wurden Aorten-Ringe ohne NO-Vorinkubation relaxiert. Dargestellt ist eine repräsentative Aufzeichnung der PKGI-vermittelten Relaxation im Organbad. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von 8 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

sensibilisierung in verschiedenen Geweben (Aorta, Bronchien und Lunge) gezeigt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß diese negative Feedback-Hemmung in der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion als allgemeiner Mechanismus in allen Geweben vorkommt, die die NO-GC und die PDE5 exprimieren.

4.1.14 Einfluß der PDE3 auf die NO-induzierte Relaxation der glatten Muskulatur

In der glatten Muskulatur wird neben der PDE5 auch die PDE3 als cGMP-abbauendes Enzym exprimiert. Der Einfluß der PDE5 wurde in den vorherigen Versuchen analysiert. In den folgenden Experimenten wurde nun der Einfluß der PDE3 auf den cGMP-Abbau in der glatten Muskulatur untersucht. Die PDE3 besitzt eine höhere Affinität für cAMP als für cGMP. Sie hydrolysiert aber auch cGMP. Bei steigenden intrazellulären cGMP-Konzentrationen wird der cAMP-Abbau gehemmt (Juilfs *et al.*, 1999).

Im Organbad wurden Aorten- und Bronchien-Ringe mit 1 μ M Milrinon, einem spezifischen Hemmstoff der PDE3, für 10 min inkubiert und anschließend mit 1 μ M PE bzw. 20 μ M CCh kontrahiert. Als Kontrolle wurden kontrahierte Gefäße ohne Milrinon-Vorinkubation verwendet. Nachdem die Kontraktion ein stabiles Plateau erreicht hatte, wurden die Gefäße mit steigenden GSNO- bzw. DEANO-Konzentrationen relaxiert.

Die so erhaltenen Dosis-Wirkungskurven der Aorta und der Bronchien ergaben Aufschluß über die NO-Sensitivität bei aktiver und gehemmter PDE3. Die in Abbildung 18 A und B gezeigten Dosis-Wirkungskurven für GSNO und DEANO verlaufen nahezu identisch. Die EC_{50} -Werte (Aorta: 100 nM; Bronchius: 1 μ M) und die zur vollständigen Relaxation führenden GSNO- bzw. DEANO-Konzentrationen stimmten zwischen Kontroll-Gefäßen und Milrinon-behandelten Gefäßen überein. Die PDE3 scheint demzufolge keinen Einfluß auf die NO-induzierte Relaxation in der glatten Muskulatur der Aorta und der Bronchien zu haben. Da in dieser Arbeit nur die NO/cGMP-vermittelte Wirkung an der glatten Muskulatur untersucht wurde, wurde dem cAMP-Abbau durch die PDE3 keine weitere Beachtung geschenkt.

4.1.15 Untersuchung der NO/cGMP-vermittelten Relaxation in β_1 -GC-defizienten Mäusen

Um zu klären, ob NO seine Effekte nur über die NO-GC vermittelt, oder ob weitere NO-Rezeptoren existieren, wurden Versuche mit Organen einer NO-GC-defizienten Maus

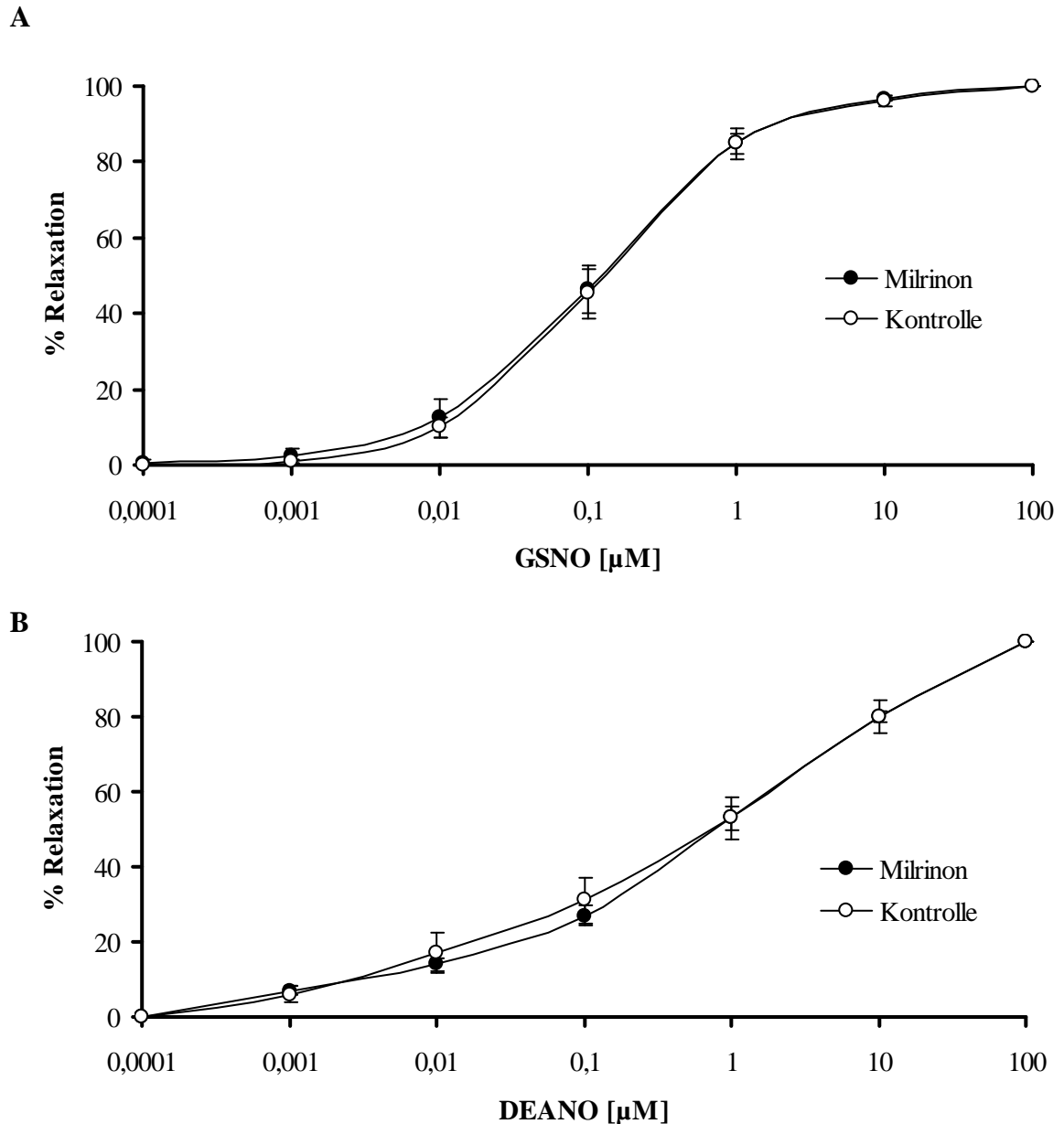


Abb. 18: Einfluß der PDE3 auf die NO-induzierte Relaxation

Aorten- und Bronchien-Ringe wurden für 10 min mit Milrinon (1 µM) inkubiert und anschließend mit PE (1 µM) bzw. CCh (20 µM) kontrahiert. Nach Erreichen der maximalen Kontraktion (30-45 bzw. 5-10 min) wurden die Gefäße mit steigenden GSNO- bzw. DEANO-Konzentrationen relaxiert. Zur Kontrolle wurden Gefäße ohne Milrinon-Behandlung mit NO relaxiert. **(A)** zeigt die GSNO-Dosis-Wirkungskurve in der Aorta und **(B)** zeigt die DEANO-Dosis-Wirkungskurve im Bronchus in An- bzw. Abwesenheit von Milrinon. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

durchgeführt. Bei diesen KO-Mäusen war die β_1 -Untereinheit der NO-GC auf genomischer Ebene ausgeschaltet worden. Da die β_1 -Untereinheit den Dimerisierungspartner beider NO-GC-Isoformen darstellt, kann keine NO-GC gebildet werden. Zunächst wurde der knock-out auf Proteinebene nachgewiesen. In Abbildung 19 A ist das Fehlen aller Untereinheiten der NO-GC in der KO-Maus-Aorta zu erkennen. Danach wurde die maximale NO-induzierte cGMP-Produktion in Aorta und Lunge gemessen. Um die NO-induzierte cGMP-Akkumulation zu maximieren, wurde sie auch in Anwesenheit des PDE5-Hemmstoffs Sildenafil (100 μM) gemessen. Selbst unter diesen Bedingungen konnte in den Geweben der NO-GC-KO-Maus kein cGMP-Anstieg gemessen werden. Der Wildtyp zeigte unter gleichen Bedingungen eine 120fache Erhöhung in der Aorta und eine 200fache Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration in der Lunge (Abb. 19 B, C).

Durch das Ausschalten der β_1 -Untereinheit der NO-GC kam es also zu einem vollständigen Ausbleiben der NO-stimulierten cGMP-Akkumulation in Aorten- und Lungen-Gewebe. Diese Versuche zeigten, daß zumindest in der Maus die NO-GC der einzige Rezeptor für NO ist, der die cGMP-Synthese katalysiert.

4.1.16 Wirkung von NO auf Aorten-Ringe von Wildtyp- und NO-GC-KO-Mäusen

Als nächstes wurde nun die physiologische Auswirkung des knock-outs im Organbad an Aorten-Ringen untersucht. Die myographische Messung des Muskeltonus wurde in Anwesenheit von L-NAME (200 μM) und Diclofenac (3 μM) durchgeführt. Abbildung 20 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für Phenylephrin. KO- und Wt-Tiere zeigten bezüglich der Kontraktion durch Phenylephrin keine Unterschiede in der Sensitivität (EC_{50} -Wert von 0,02 μM).

Zur Untersuchung der cGMP-vermittelten Relaxation wurden die im Organbad fixierten Aorten-Ringe zunächst mit 1 μM PE vorkontrahiert. Nach Ausbilden einer stabilen Kontraktion wurde mit DEANO oder GSNO relaxiert. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der NO-induzierten Relaxation von NO-GC-KO- und Wt-Aorten dargestellt. Weder DEANO noch GSNO führten zu einer Relaxation der Gefäße der KO-Mäuse. Im Wildtyp wurden EC_{50} -Werte von ca. 80 nM DEANO bzw. 700 nM GSNO ermittelt. Diesen Ergebnissen zur Folge kann NO nur über die NO-GC eine Relaxation der glatten Muskulatur der Aorta auslösen. Die Relaxation wird demzufolge nicht über cGMP-unabhängige Mechanismen vermittelt.

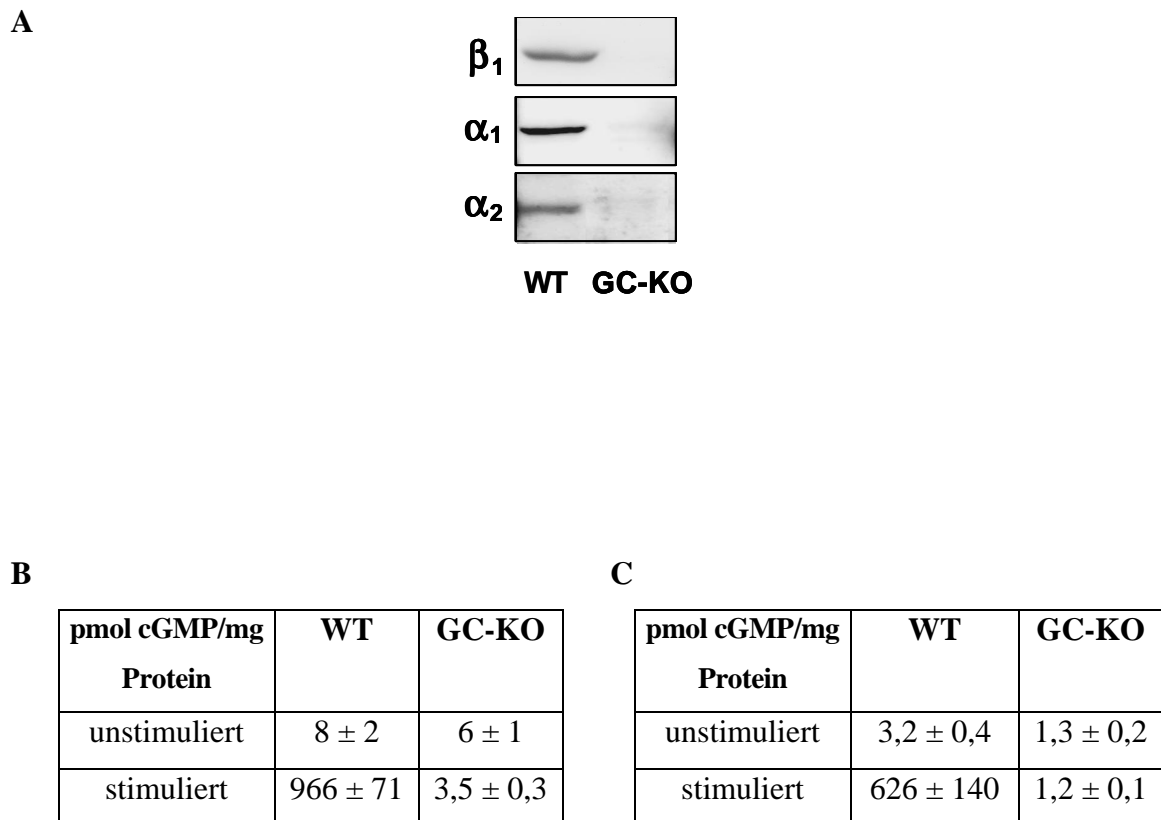


Abb. 19: Nachweis der NO-GC und Messung der NO-induzierten cGMP-Akkumulation in Aorten- und Lungen-Gewebe von Wildtyp- und NO-GC-KO-Mäusen

Abbildung (A) belegt das Fehlen der α - und β -Untereinheiten der NO-GC in Aorten-Gewebe von KO-Mäusen. Mauseartenstreifen (B) und Lungengewebe (C) von NO-GC-KO- und Wildtyp-Tieren wurden 10 min mit 100 μ M Sildenafil inkubiert und danach mit 100 μ M GSNO stimuliert; der cGMP-Gehalt wurde nach 10-minütiger Inkubation mittels RIA bestimmt. Zur Kontrolle wurde der cGMP-Gehalt von nicht-stimuliertem Gewebe ermittelt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3-4 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

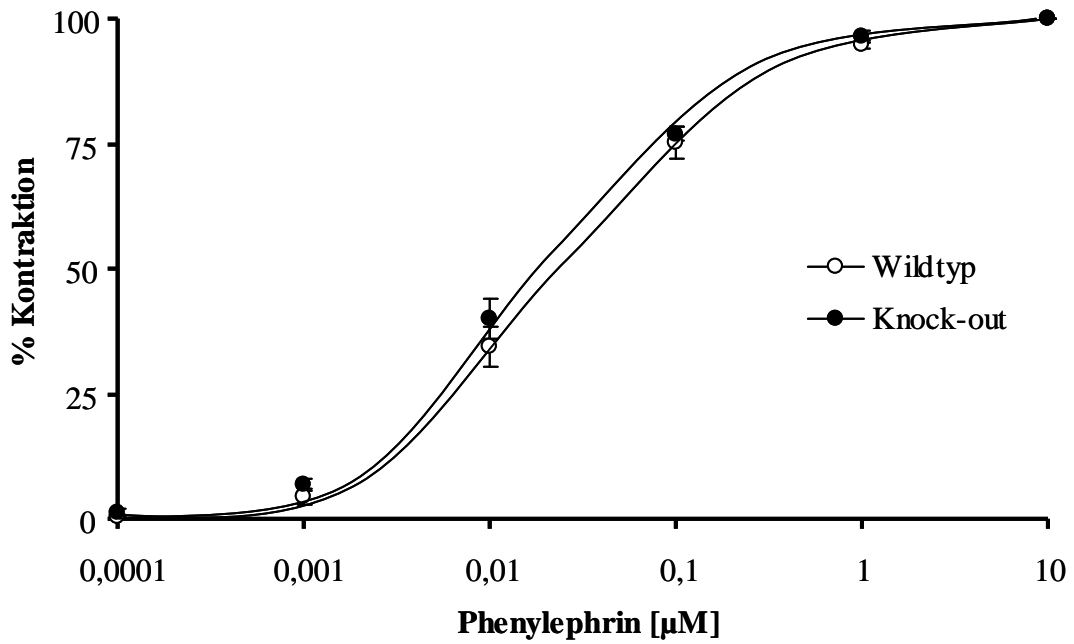


Abb. 20: Phenylephrin-induzierte Kontraktion von Aorten-Ringen von Wildtyp- und NO-GC-defizienten Mäusen

Aorten-Ringe der KO- und Wt-Mäuse wurden mit steigenden Konzentrationen Phenylephrin inkubiert und die resultierende Kontraktion wurde gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 5 (Wt) und 7 (KO) Tieren mit 4fach Bestimmung.

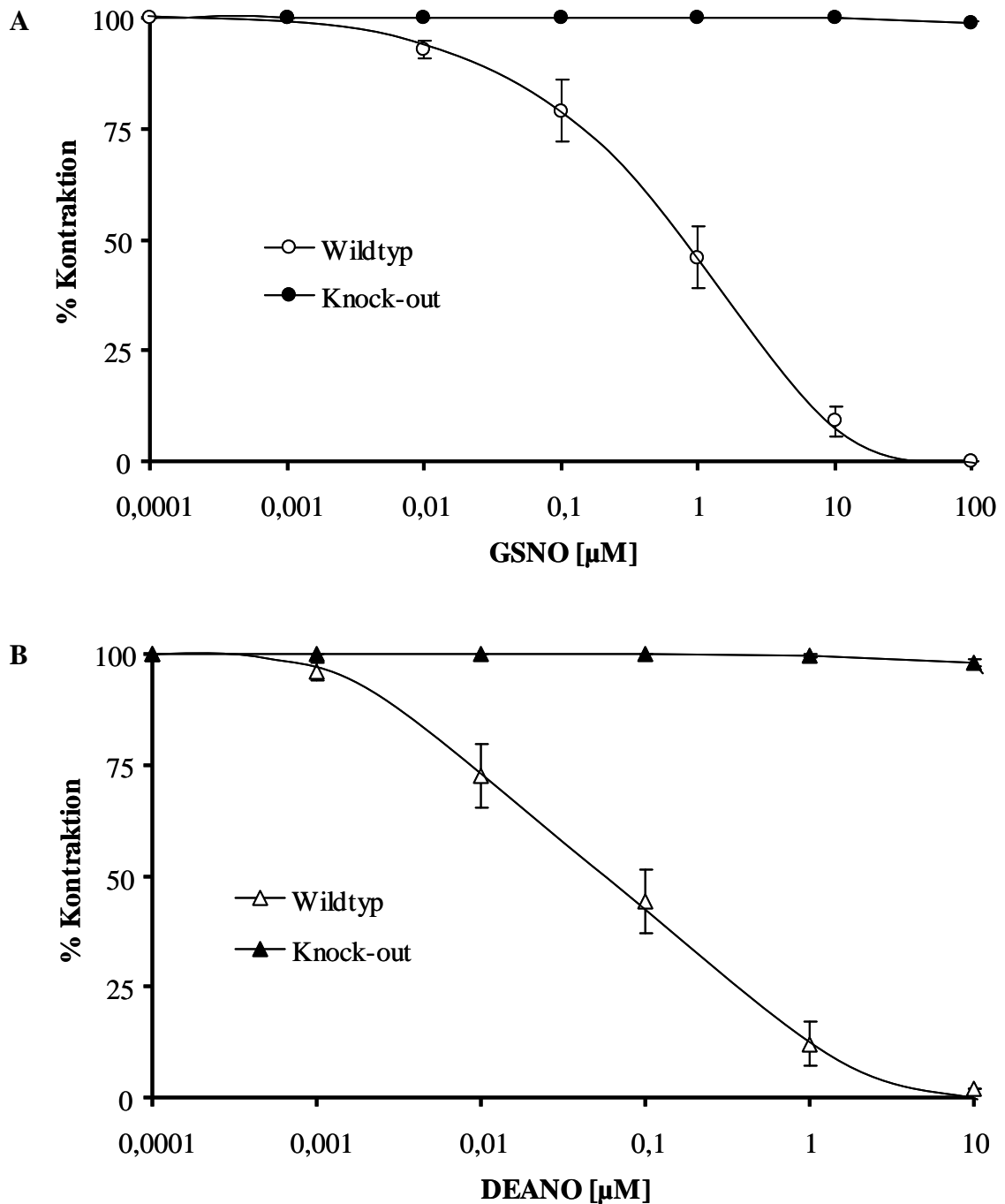


Abb. 21: Wirkung von NO auf Aorten-Ringe von NO-GC-KO- und Wildtyp-Mäusen

Zur Messung der Relaxation wurden die Aorten-Ringe der KO- und Wt-Mäuse mit 1 μM Phenylephrin kontrahiert und dann mit steigenden Konzentrationen der NO-Donatoren inkubiert und die resultierende Relaxation wurde gemessen. **(A)** zeigt die Relaxation mit GSNO und **(B)** mit DEANO. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 5-8 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

4.2 Untersuchungen zum PDE2-Hemmstoff BAY60-7550

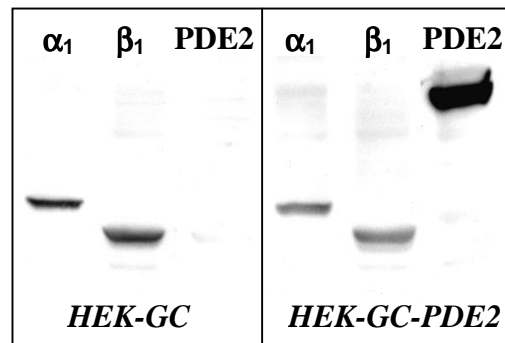
Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer PDE2-Hemmstoff, die Substanz BAY60-7550, publiziert. Die PDE2 wird in verschiedenen Geweben, aber nicht in der glatten Muskulatur exprimiert. Sie hat im zentralen Nervensystem und im Herzen wichtige Funktionen. Als Hemmstoff der PDE2 wurde in bisherigen Versuchen EHNA (Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin) eingesetzt (Podzuweit *et al.*, 1995). EHNA hemmt jedoch neben der PDE2 ($IC_{50} = 0,8-2 \mu M$) zusätzlich die Adenosin Deaminase ($K_i = 4 \text{ nM}$) (Rivet-Bastide *et al.*, 1997). Mit BAY60-7550 wurde ein neuer Hemmstoff der PDE2 beschrieben, der sehr spezifisch ist und in sehr geringen Dosen ($IC_{50} = 2-5 \text{ nM}$) eingesetzt werden kann (Boess *et al.*, 2004.). Mit dem Inhibitor wurden im Rahmen dieser Arbeit unerwartet starke cGMP-Akkumulationen im Lungengewebe gefunden. Daraufhin sollte ein möglicher Effekt von BAY60-7550 auf die NO-GC abgeklärt werden. Zunächst wurde die Wirksamkeit von BAY60-7550 in einem zellulären System getestet. Hierzu wurden zwei im Institut bereits hergestellte HEK-Zelllinien verwendet (Müllershausen *et al.*, 2003).

Die eine Zelllinie exprimiert stabil die beiden Untereinheiten der NO-GC (α_1 , β_1), ist also in der Lage, bei NO-Stimulation cGMP zu produzieren (HEK-GC). Von dieser Zelllinie ausgehend wurde eine zweite Linie generiert, die zusätzlich die PDE2 stabil exprimiert (HEK-GC-PDE2).

Die stabile Expression von NO-GC und PDE2 wurde zunächst mittels Western-Blot überprüft. In den HEK-GC-Zellen lassen sich die beiden NO-GC-Untereinheiten mit spezifischen Antikörpern detektieren (70 und 80 kDa), während in den HEK-GC-PDE2-Zellen zusätzlich eine stabile Expression der PDE2 (100 kDa) zu sehen ist (Abbildung 22 A). Aus der HEK-GC-PDE2-Zelllinie wurde nun eine zytosolische Fraktion gewonnen, um die Aktivität der PDE2 in einem *in vitro*-Assay zu messen. Abbildung 22 B zeigt die Hemmung der PDE2 durch EHNA und BAY60-7550 in HEK-GC-PDE2-Zytosolen. Steigende BAY60-7550-Konzentrationen führen zur vollständigen Hemmung der PDE2-Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von ca. 2-5 nM, also übereinstimmend mit der Originalpublikation (Boess *et al.*, 2004.). EHNA konnte die PDE2 mit einem IC_{50} -Wert von ca. 3-5 μM hemmen, was den Daten der Originalpublikation entspricht (Podzuweit *et al.*, 1995). BAY60-7550 ist damit ca. 1000fach potenter als EHNA.

Als nächstes wurde die Wirkung von BAY60-7550 auf die PDE2 in intakten HEK-GC-PDE2-Zellen untersucht. Abbildung 23 zeigt die konzentrationsabhängige cGMP-Erhöhung durch BAY60-7550 mit einem EC_{50} -Wert von ca. 30 μM . Bei 100 μM BAY60-7550

A



B

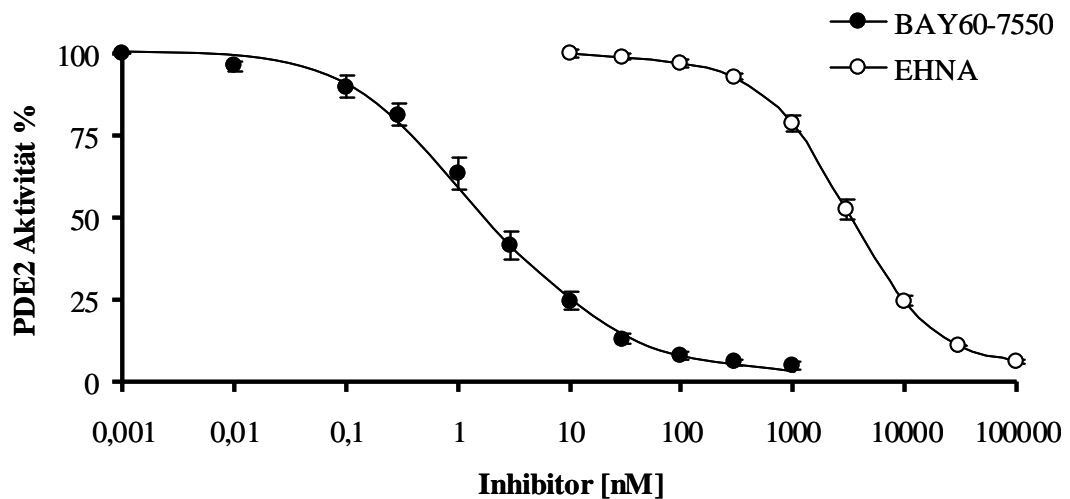


Abb. 22: Nachweis der Expression von NO-GC und PDE2 in HEK-Zellen und Hemmung der PDE2-Aktivität durch BAY60-7550 und EHNA

(A) Nachweis der PDE2 in NO-GC-exprimierenden HEK-Zellen (HEK-GC-PDE2) und Kontroll-Zellen (HEK-GC) mittels Western-Blot. In beiden Zelllinien wurde die α_1 - und β_1 -Untereinheit der NO-GC bei 80 und 70 kDa detektiert. Die PDE2 wurde nur in den HEK-GC-PDE2-Zellen bei ca. 100 kDa detektiert. (B) Jeweils 10 μ l der HEK-Zell-Zytoplasten wurden mit steigenden Konzentrationen der beiden Hemmstoffe BAY60-7550 und EHNA inkubiert und die PDE2-Aktivität über 6 Minuten bei 37°C bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

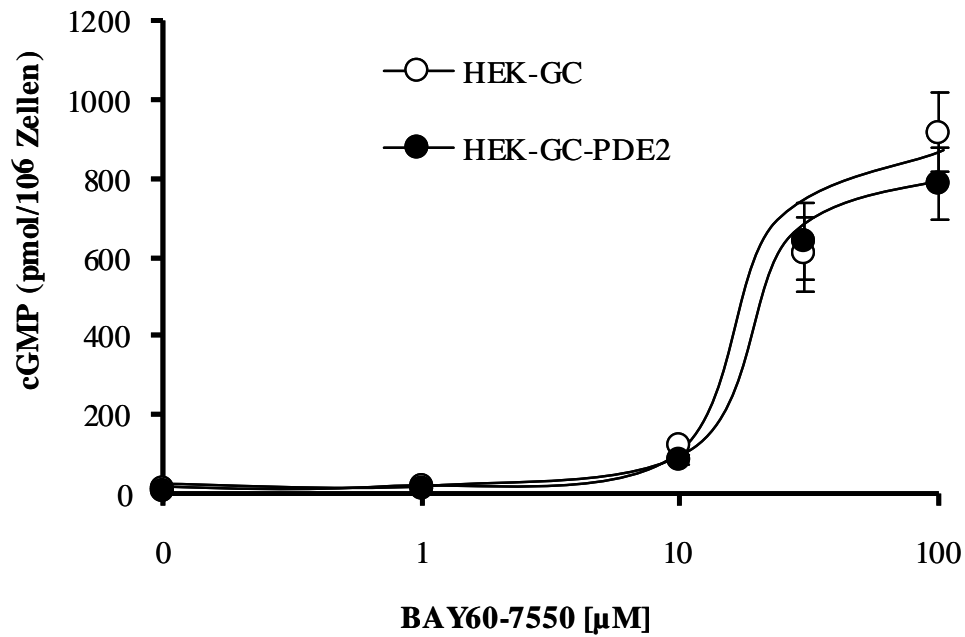


Abb. 23: BAY60-7550-induzierter cGMP-Anstieg in intakten HEK-GC- und HEK-GC-PDE2-Zellen

HEK-GC- und HEK-GC-PDE2-Zellen wurden für 10 min mit steigenden Konzentrationen BAY60-7550 inkubiert und anschließend die entstandenen cGMP-Konzentrationen mittels RIA bestimmt. In beiden Zelllinien kommt es zu einem BAY60-7550-induzierten cGMP-Anstieg mit einem Maximum bei einer Konzentration von 100 μM. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von 8 unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

entsprach dies einem 100fachen Anstieg der cGMP-Konzentration. BAY60-7550 führte auch in HEK-GC-Zellen zu einem 100fachen Anstieg der cGMP-Konzentration. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß BAY60-7550 in intakten Zellen die NO-sensitive GC aktiviert, hierzu sind allerdings höhere Konzentrationen notwendig ($EC_{50}=30\ \mu\text{M}$) als zur Hemmung der PDE2.

Daher sollte nun untersucht werden, ob die Substanz die gereinigte NO-GC direkt aktiviert. Abbildung 24 A zeigt, daß BAY60-7550 zu einer ca. 30fachen Stimulation der gereinigten NO-GC führt. Der Wert der EC_{50} lag bei $50\ \mu\text{M}$. Dieser Wert liegt mehr als 1000fach über dem IC_{50} -Wert der PDE2-Hemmung (2-5 nM). Anschließend wurde der Aktivierungsmechanismus näher untersucht. Zur NO-induzierten Aktivierung der NO-GC ist die prosthetische Häm-Gruppe notwendig. Durch Behandlung des Enzym mit 0,5 % Tween20 kommt es zum Verlust der Häm-Gruppe und der Stimulierbarkeit durch NO (Foerster *et al.*, 1996). Die Substanz ODQ, die als NO-GC-Inhibitor eingesetzt wird, oxidiert die Häm-Gruppe der NO-GC und führt so zum Verlust der NO-Stimulierbarkeit (Schrammel *et al.*, 1996). Der Einfluß von BAY60-7550 wurde in Gegenwart von 0,5 % Tween20 und $1\ \mu\text{M}$ ODQ erneut im GC-Assay getestet. Es zeigte sich, daß BAY60-7550 in Gegenwart von Tween20 und ODQ nicht mehr zur Stimulation der NO-GC führte (Abb. 24 B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß BAY60-7550 seine stimulierenden Eigenschaften nur dann vermittelt, wenn die NO-GC durch die prosthetische Häm-Gruppe ihre aktivierbare Konformation einnimmt. Der Verlust der Häm-Gruppe oder deren Oxidation führen zur Konformationsänderung und zum Verlust der Stimulierbarkeit durch BAY60-7550.

Die Effekte von BAY60-7550 auf die NO-GC wurden zusätzlich am Aorten-Gewebe getestet. Im Organbad führte die Inkubation mit BAY60-7550 zur vollständigen Relaxation der Maus-Aorta. Der EC_{50} -Wert der Relaxation lag bei ca. $5\ \mu\text{M}$ BAY60-7550 (Abb. 25). Das Ausmaß der Relaxation deutet auch hier darauf hin, daß BAY60-7550 einen kombinatorischen Effekt ausübt, indem es sowohl die PDEs hemmt als auch die NO-GC aktiviert. Die Stimulation der NO-GC mit BAY60-7550 in intakten Zellen erfolgt erst bei höheren Konzentrationen als die Hemmung der PDE2. Da bei Untersuchungen am intakten Gewebe in der Regel höhere Konzentrationen von BAY60-7550 nötig sind als bei gereinigten Fraktionen oder Enzymen, kann eine Erhöhung der cGMP-Konzentration nicht unbedingt nur auf die Hemmung der PDE2, sondern gegebenenfalls auch auf eine Stimulation der NO-GC zurückgeführt werden.

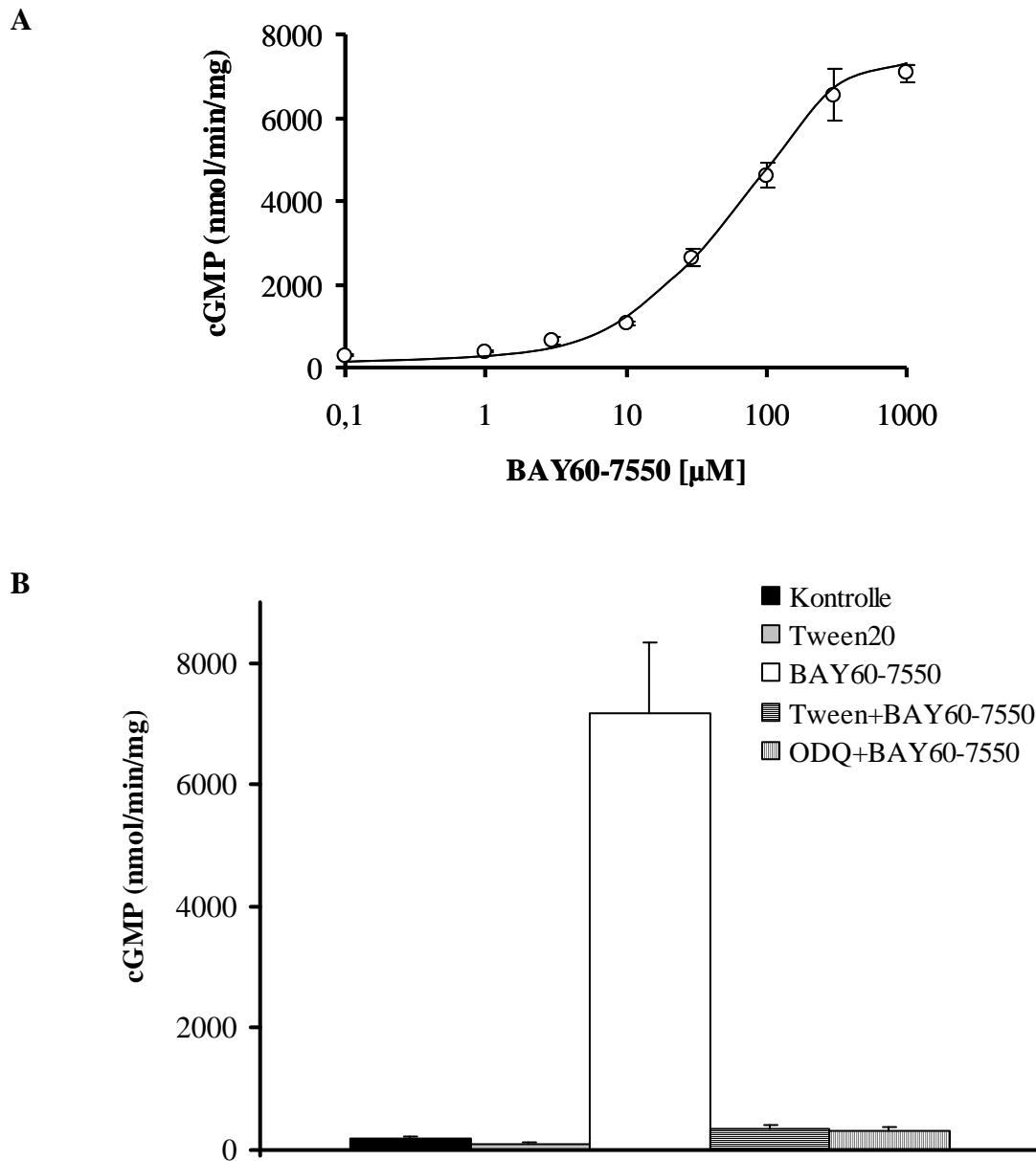


Abb. 24: Stimulation der gereinigten NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch BAY60-7550 und Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus

Die gereinigte Guanylyl-Cyclase wurde mit steigenden Konzentrationen BAY60-7550 bzw. mit den angegebenen Substanzen für 10 min bei 37°C inkubiert und die Aktivität wurde wie in 3.1.6 beschrieben ermittelt. (A) zeigt die konzentrationsabhängige Stimulation der NO-GC durch BAY60-7550 mit einem EC_{50} -Wert von 50 µM. In (B) wurde der Effekt von BAY60-7550 in Ab- bzw. Anwesenheit von 0,5 % Tween20 oder 1 µM ODQ bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 5-10 unabhängigen Experimenten mit 3fach Bestimmung.

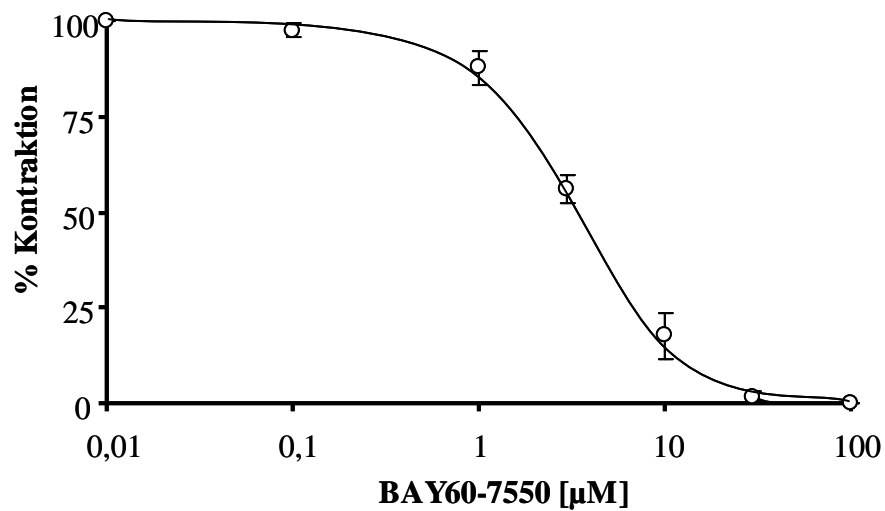


Abb. 25: Wirkung von BAY60-7550 auf die glatte Muskulatur der Maus-Aorta

Zur Messung der Relaxation wurden die Aorten-Ringe der Wt-Mäuse mit 1 μ M Phenylephrin kontrahiert und dann mit steigenden Konzentrationen von BAY60-7550 inkubiert und die resultierende Relaxation wurde gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten mit 4fach Bestimmung.

5. Diskussion

Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur ist eine wichtige Komponente innerhalb der kardiovaskulären Homöostase. Einige pathophysiologische Zustände werden auf einen zu hohen Gefäßmuskeltonus, d.h. auf eine gestörte Relaxation und/oder auf eine übermäßige Kontraktion der glatten Muskulatur zurückgeführt. Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird über die NO/cGMP-Signalkaskade vermittelt. Dabei bilden NO-Synthasen im Endothel der Blutgefäße auf ein Ca^{2+} -Signal hin vermehrt NO, welches die NO-sensitive GC in der glatten Muskelschicht stimuliert. Diese katalysiert die Bildung von cGMP, welches über verschiedene Effektor-Proteine die NO-induzierte Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt. Das im Endothel gebildete NO diffundiert nicht nur in die benachbarte Muskelschicht, sondern auch in die Thrombocyten im Gefäßlumen, in denen es die Aggregation hemmt. In Thrombocyten wurde der NO/cGMP-Signalweg untersucht und eine Desensibilisierung durch NO aufgezeigt (Müllershausen *et al.*, 2001). Der dieser Desensibilisierung zugrunde liegende Mechanismus konnte aufgeklärt werden, es zeigte sich, daß die PDE5-Aktivität als entscheidender Faktor die Dauer und die Intensität eines cGMP-Signals mitbestimmt. Die NO-induzierte Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs könnte auch eine Rolle im Rahmen der bereits seit 130 Jahren bekannten Nitrat-Toleranz spielen. Als Nitrat-Toleranz wird die innerhalb von 24 Stunden auftretende Wirkungsverringerung bei kontinuierlicher Gabe von Nitraten bezeichnet. Zur Nitrat-Toleranz wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, wie zum Beispiel eine verminderte NO-stimulierte Aktivität der NO-GC (siehe auch 1.1.6).

5.1 Desensibilisierung des NO/cGMP-Signalwegs in der glatten Muskulatur

In der vorliegenden Arbeit wurde die NO/cGMP-Signalkaskade in verschiedenen glattmuskulären Organen genauer untersucht. Zuerst wurde die bereits für Thrombocyten beschriebene Desensibilisierung der cGMP-Antwort (Müllershausen *et al.*, 2001) auch in Ratten-Aorten und in einem nicht-glattmuskulären System, der Maus-Lunge, aufgezeigt. In Thrombocyten wurde die Desensibilisierung nur auf der Ebene der cGMP-Antwort nachgewiesen. In dieser Arbeit ist es gelungen, die funktionelle Relevanz der Desensibilisierung in der glatten Muskulatur nachzuweisen. So führten aufeinander folgende NO-Applikationen im Organbad an Aorten- und Bronchienringen zu einer Verringerung der NO-induzierten

Relaxation. Durch eine Vorinkubation mit einer vergleichsweise niedrigen NO-Konzentration nimmt also die Responsivität der glatten Gefäßmuskulatur gegenüber einer weiteren NO-Stimulation ab. Die schnelle und lange andauernde Reduktion der cGMP-Antwort nach NO-Vorinkubation kann durch eine veränderte NO-GC-Aktivität, eine veränderte PDE-Aktivität oder durch eine Kombination beider Mechanismen bedingt sein. Um die Rolle der PDE5 zu analysieren, mußte ihre Aktivität im Verlauf der Desensibilisierung untersucht werden. Im Thrombocytenlysate (Müllershausen *et al.*, 2001) konnte die Aktivität der PDE5 direkt gemessen und eine Zunahme der Aktivität nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß eine cGMP-vermittelte PDE5-Aktivierung mit einer Phosphorylierung des Enzyms einhergeht, die zu einer langanhaltenden Stabilisierung des aktiven Zustands führte. Diese Messungen sind im intakten Gewebe jedoch nicht möglich. Der Aktivitätszustand der PDE5 wurde im glattmuskulären Gewebe dementsprechend über die Detektion der phosphorylierten PDE5 auf Proteinebene analysiert. Auch in der glatten Muskulatur des Bronchus und der Aorta führt NO über cGMP zur Phosphorylierung der PDE5. Auch 60 Minuten nach NO-Vorinkubation konnte noch aktive, d.h. phosphorylierte PDE5 nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, daß die PDE5 an der Desensibilisierung beteiligt ist. Die Abnahme phosphorylierter PDE5 über die Zeit entsprach dabei der jeweiligen Zunahme der Ansprechbarkeit des NO/cGMP-Signalwegs nach erneuter NO-Stimulation (siehe Abb. 10).

Analog dazu konnte in Bronchien ebenfalls eine Zunahme phosphorylierter PDE5 nach NO-Stimulation gezeigt werden. Der Nachweis der Desensibilisierung auf cGMP-Ebene ließ sich in diesem Organ aufgrund des geringen cGMP-Gehalts nicht durchführen (siehe Abb. 4 D). Die geringen cGMP-Konzentrationen lassen sich durch den vergleichsweise hohen PDE5- und niedrigen NO-GC-Gehalt in Bronchien im Vergleich zur Aorta erklären. Darüberhinaus wurde bereits ohne Zugabe von NO phosphorylierte PDE5 in den Bronchien nachgewiesen, was auf ihren hohen Aktivitätszustand hinweist. Diese Ergebnisse entsprechen dem Modell eines negativen Rückkopplungsmechanismus des NO/cGMP-Signalwegs, der publiziert wurde (Müllershausen *et al.*, 2003). Dabei aktiviert cGMP zunächst die PDE5 und die PKGI, die die PDE5 phosphoryliert und dadurch ihren aktiven Zustand über einen längeren Zeitraum aufrecht erhält. Eine durch einen weiteren NO-Stimulus induzierte cGMP-Antwort wird durch die bereits aktivierte PDE5 daher reduziert. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus des NO/cGMP-Signalwegs konnte in dieser Arbeit auch an der glatten Muskulatur gezeigt werden.

Um den Einfluß der PDE5 auf die Desensibilisierung der NO-induzierten cGMP-Antwort und der Relaxation zu bestätigen, wurden weitere Versuche im Organbad durchgeführt. Hierbei konnte eine Kreuzdesensibilisierung nachgewiesen werden, d.h. die Vorinkubation mit NO führte auch zu einer verringerten Relaxation durch ANP, dem Stimulator der membrangebundenen GC-A. Da die GC-A zuvor nicht durch ANP stimuliert worden war, ist ein desensibilisierter Zustand der GC-A unwahrscheinlich. Hieraus kann geschlußfolgert werden, daß die Desensibilisierung sehr wahrscheinlich nicht auf der Ebene der NO-GC stattfindet, sondern auf Ebene der cGMP-Effektoren oder des cGMP-Abbaus. Da die durch 8pCPT-cGMP hervorgerufene Relaxation nicht durch eine NO-Vorinkubation verringert wurde, ist eine Desensibilisierung auf Ebene der PKGI und darunter auszuschließen. Als wahrscheinlicher Mechanismus der NO-induzierten Desensibilisierung in der glatten Muskulatur bleibt, analog zum Thrombocytenmodell, die durch die NO-Vorinkubation hervorgerufene Phosphorylierung und langanhaltende Aktivierung der PDE5, die bei einem erneuten NO-Stimulus für einen vermehrten cGMP-Abbau sorgt.

Weitere Untersuchungen in der glatten Muskulatur der Aorta und des Bronchius zeigten, daß die PDE3 keinen Einfluß auf die NO-induzierte Relaxation hat und somit auch zur Desensibilisierung nicht beiträgt. Es kann davon ausgegangen werden, daß die NO-induzierte Desensibilisierung in allen glattmuskulären Geweben durch die PDE5 vermittelt wird. Der weitere Einfluß von cAMP und der Kalzium-regulierten PDE1 auf die Relaxation der glatten Muskelzellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht thematisiert.

Um zu ermitteln, ob NO auch durch Stimulation anderer Rezeptoren die cGMP-Synthese steigert bzw. eine Relaxation vermittelt, wurde NO-GC-KO-Maus-Gewebe untersucht. Zuerst wurde das Gewebe auf Ebene der intrazellulären cGMP-Synthese in Aorta und Lunge und später im Organbad charakterisiert. Im NO-GC-KO-Gewebe ließ sich keine NO-induzierte cGMP-Synthese nachweisen, und im Organbad war die NO-induzierte Relaxation der NO-GC-KO-Maus-Aorta komplett aufgehoben. Die cGMP-Synthese und die cGMP-vermittelte Relaxation, die durch NO hervorgerufen werden, können dementsprechend nur über die NO-GC vermittelt werden.

5.2 Zusammenhang von NO-GC- und PDE5-Expression, der NO-induzierten cGMP-Antwort und der resultierenden Relaxation in der glatten Muskulatur

In allen untersuchten glattmuskulären Organen (Aorta, Vene und Bronchius) und der Lunge zeigte die NO-induzierte cGMP-Antwort einen charakteristischen transienten Zeitver-

lauf mit einem schnellen Anstieg und darauffolgenden Abfall der intrazellulären cGMP-Konzentration (siehe Abb. 4). Die maximal erreichten cGMP-Konzentrationen waren in den einzelnen Organen jedoch sehr unterschiedlich. In der Aorta waren die Konzentrationen am höchsten, im Bronchius und in der Lunge wurden deutlich geringere Konzentrationen gemessen und in der Vene waren sie am niedrigsten. Gründe dafür lieferte der quantitative Vergleich der exprimierten cGMP-bildenden und -abbauenden Enzyme. In der Aorta wurde die größte Menge an NO-GC und geringste Menge an PDE5 exprimiert, was die vergleichsweise hohen cGMP-Konzentrationen erklärt. In Bronchius und Vene zeigte sich eine geringere Menge an NO-GC und eine höhere Menge an PDE5. In Bronchien und Venen ist das Verhältnis von cGMP-Synthese und -Abbau im Vergleich zur Aorta zugunsten des Abbaus verschoben, eine verminderte Synthese von cGMP steht also einer höheren abbauenden Kapazität gegenüber. Die dominante Rolle der PDE5 beim cGMP-Abbau in der glatten Muskulatur wurde durch den Einsatz von Sildenafil verifiziert (Rybalkin *et al.*, 2002, 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die PDE5 in den hier untersuchten glattmuskulären Organen maßgeblich für den cGMP-Abbau verantwortlich ist.

Um die physiologische Relevanz der cGMP-Antworten am Gewebe zu untersuchen, wurden anschließend Organbad-Experimente durchgeführt. Diese *ex vivo*-Methode bietet den Vorteil, Untersuchungen an einem funktionellen Organ über einen langen Zeitraum durchführen zu können. Der direkte Vergleich zwischen Aorta und Bronchius zeigte eine vergleichbare Ansprechbarkeit auf die kontrahierenden Agonisten Phenylephrin und Carbachol, und eine im Verhältnis zur Aorta geringe Ansprechbarkeit des Bronchius auf den relaxierenden NO-Donator GSNO. So wirkt GSNO in der Aorta bereits bei ca. 100fach niedrigeren Konzentrationen als in den Bronchien (siehe Abb. 9 A). Auch hier bietet sich das Mengen-Verhältnis von NO-GC zu PDE5 in diesen Geweben als Erklärung an (Abb. 3). Im Bronchius ist die Menge an NO-GC deutlich geringer als in der Aorta, weshalb grundsätzlich weniger cGMP gebildet wird. Zusätzlich ist die PDE5-Menge im Bronchius größer als in der Aorta, das gebildete cGMP unterliegt also einem vermehrten Abbau durch die PDE5. In Übereinstimmung mit diesen Befunden ist die für die Relaxation des Bronchius benötigte NO-Konzentration in Vergleich zur Aorta erhöht. Diese Ergebnisse gewinnen eine besondere Bedeutung im Hinblick auf pharmakologische Eingriffe in die NO/cGMP-Signalkaskade unterschiedlicher Organe. So wird die vergleichsweise hohe Expression der NO-GC in der Aorta pharmakologisch bereits seit über 130 Jahren durch den Einsatz von NO-Pharmaka zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen erfolgreich ausgenutzt.

Generell stellt aber auch die Hemmung von PDEs einen erfolgsversprechenden pharmakotherapeutischen Ansatz dar, die intrazelluläre Konzentration cyclischer Nukleotide zu erhöhen. So würde sich für eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration im Bronchius eher ein PDE5-Hemmstoff anbieten als ein Aktivator der NO-GC. Im Tiermodell wurde bereits der wirksame Einsatz von Sildenafil bei pulmonalen Erkrankungen (z.B. pulmonale Hypertonie) nachgewiesen (Toward *et al.*, 2004).

Bei dem Vergleich der für die cGMP-Antwort bzw. Relaxation benötigten NO-Konzentrationen in der Aorta zeigte sich, daß eine Relaxation bereits bei NO-Konzentrationen ausgelöst wird, bei denen noch kein Anstieg der cGMP-Konzentration meßbar ist. Es kann davon ausgegangen werden, daß NO in der Zelle zu lokalen cGMP-Erhöhungen führt, die in der Lage sind, eine Relaxation auszulösen. Aufgrund der hier eingesetzten Meßmethoden können die NO-induzierten cGMP-Anstiege jedoch nur im gesamten Gewebe und nicht subzellulär am eigentlichen Wirkort gemessen werden. Der Vergleich zwischen cGMP-Menge und NO-induzierter Relaxation war im Bronchius aufgrund des geringen cGMP-Gehalts nicht möglich.

5.3 Die Wirkung von BAY60-7550 auf die PDE2 und die NO-GC

Hemmstoffe und Aktivatoren von Enzymen stellen wichtige Werkzeuge in der biomedizinischen Forschung dar. Die PDE2 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, sie baut cAMP und cGMP ab und übernimmt eine wichtige Rolle im *cross talk* zwischen den cAMP- und cGMP-Signalwegen. Mit BAY60-7550 wurde ein neuer PDE2-Hemmstoff publiziert (Boess *et al.*, 2004). Dieser Hemmstoff kann im Vergleich zum bisher eingesetzten PDE2-Inhibitor EHNA in geringeren Konzentrationen (nM) eingesetzt werden. Erst ab 100fach höheren Konzentrationen wirkt er unspezifisch auf andere PDEs. Obwohl BAY60-7550 als PDE2-Hemmstoff publiziert wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit eine Wirkung auf die NO-GC gezeigt werden. In intakten HEK-GC-Zellen war auch in Abwesenheit der PDE2 ein signifikanter cGMP-Anstieg meßbar.

Die Wirkung von BAY60-7550 wurde dann an der gereinigten NO-GC verifiziert. BAY60-7550 führte konzentrationsabhängig zur 30fachen Stimulation des Enzyms. Weitere Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der NO-GC durch BAY60-7550 ergaben, daß die stimulierenden Eigenschaften nur dann vermittelt werden, wenn die NO-GC mit einer prosthetische Häm-Gruppe in ihrer aktivierbaren Konformation vorliegt. Der Verlust der Stimulierbarkeit durch BAY60-7550 durch Oxidation oder das Herauslösen der

Häm-Gruppe weist darauf hin, daß für die BAY60-7550-induzierte Aktivierung der NO-GC eine intakte Häm-Gruppe notwendig ist.

Um die physiologische Relevanz der BAY60-7550-induzierten NO-GC-Stimulation in einem natürlichen System zu klären, wurden *ex vivo*-Untersuchungen an glattmuskulären Aortengewebe im Organbad durchgeführt. Dabei führte BAY60-7550 zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation der Aorta. Da die PDE2 im glatten Muskel nicht exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, daß die Relaxation durch BAY60-7550 in der Tat durch die Stimulation der NO-GC hervorgerufen wurde. Es bleibt also festzuhalten, daß für Untersuchungen am Gewebe oder an ganzen Zellen, bei denen mikromolare BAY60-7550-Konzentrationen eingesetzt werden, neben der unspezifischen Hemmung anderer PDEs (Boess *et al.*, 2004) auch die Wirkung auf die NO-GC berücksichtigt werden muß.

6. Zusammenfassung

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System. Sie vermittelt die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur und kontrolliert damit den Tonus der glatten Muskulatur innerhalb der kardiovaskulären Homöostase. Dabei stimuliert endogen freigesetztes NO die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase, die daraufhin vermehrt cGMP bildet. Das Signalmolekül cGMP stimuliert verschiedene Effektoren, wie cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und cGMP-regulierte Ionenkanäle, die das NO/cGMP-Signal physiologisch umsetzen. Abgebaut wird das cGMP durch Phosphodiesterasen, die den cGMP-Effekt beenden und damit die Dauer und Intensität eines cGMP-Signals entscheidend mitbestimmen. In Thrombocyten ist die langanhaltende Aktivierung der PDE5 durch cGMP für die NO-induzierte Desensitisierung des Signalwegs verantwortlich. Dieser Mechanismus würde eine Erklärung für die Nitrat-Toleranz eines Organismus nach mehrfacher NO-Applikation bieten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die NO/cGMP-Signalkaskade in verschiedenen glattmuskulären Geweben zu untersuchen, eine mögliche NO-induzierte Desensitisierung nachzuweisen und den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären.

Zuerst wurde die Expression einzelner Komponenten der NO/cGMP-Signalkaskade auf Proteinebene in Aorta, Bronchus, Vene und in der nicht-glattmuskulären Lunge aufgezeigt. Danach wurde der Zeitverlauf der NO-induzierten cGMP-Antwort durch cGMP-Messungen in verschiedenen Geweben aufgenommen. In allen Geweben zeigte die cGMP-Messung nach NO-Stimulation einen transienten, d.h. nur vorübergehenden Verlauf der cGMP-Antwort. Auch die Stimulation der membranständigen Guanylyl-Cyclase (GC-A) durch ANP führte zu diesem charakteristischen transienten Verlauf der cGMP-Antwort. Das Ausmaß und die Dauer der cGMP-Erhöhung unterschied sich in den jeweiligen Geweben, was durch die unterschiedlich starke Expression der cGMP-auf- und abbauenden Enzyme erklärt werden konnte. Der transiente Verlauf der cGMP-Antwort legt eine komplexe Regulation des NO/cGMP-Signalwegs nahe, welche entweder auf der Ebene der cGMP-Bildung oder auf der Ebene des cGMP-Abbaus stattfinden muß. Es konnte gezeigt werden, daß der cGMP-Abbau und somit die Terminierung des Signals in der glatten Muskulatur hauptsächlich durch die PDE5 katalysiert wird.

Die physiologische Relevanz der cGMP-Antwort äußerte sich in einer Relaxation der glatten Muskulatur, wobei eine Relaxation bereits bei NO-Konzentrationen ausgelöst wurde,

bei denen noch kein Anstieg der cGMP-Konzentration meßbar war. Der Vergleich der Relaxation zwischen Aorta und Bronchius zeigte eine geringere Sensitivität des Bronchius gegenüber NO im Vergleich zur Aorta, was ebenfalls auf die unterschiedlich starke Expression der Proteine (NO-GC und PDE5) zurückgeführt werden kann.

Durch eine kurze NO-Vorinkubation konnte eine Desensibilisierung der NO-induzierten cGMP-Antwort in der glatten Muskulatur und in der Lunge nachgewiesen werden. Die nachgewiesene Phosphorylierung der PDE5 wurde als Hinweis auf eine Aktivierung der PDE5 gewertet, und es wurde davon ausgegangen, daß die erhöhte und langanhaltende PDE5-Aktivierung die Reduktion des cGMP-Signals bedingt. In weiteren *ex vivo*-Versuchen sollten nun die physiologischen Auswirkungen der verminderten cGMP-Antwort ermittelt werden. Nach kurzer NO-Vorinkubation zeigten Aorten- und Bronchiengewebe eine verminderte NO-induzierte Relaxation. Diese Ergebnisse zeigen, daß die durch cGMP vermittelte Aktivierung der PDE5 nicht nur die NO-induzierte cGMP-Antwort begrenzt, sondern auch zu einer Abschwächung der physiologischen Funktion führt. Um die Aktivierung der PDE5 als möglichen Mechanismus der Desensibilisierung weiter einzugrenzen, wurden mit der Aorta Kreuzdesensibilisierungs-Versuche durchgeführt. Mit diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß weder die NO-GC noch die PKGI für die verringerte cGMP-vermittelte Relaxation verantwortlich ist. Auch konnte ein Einfluß der ebenfalls in diesen Geweben exprimierten PDE3 ausgeschlossen werden. Insgesamt deuten die Experimente also darauf hin, daß in der glatten Muskulatur, ähnlich wie in Thrombocyten, die cGMP-induzierte PDE5-Aktivierung nach NO-Vorinkubation zu einer Abnahme der cGMP-Antwort und auch zu einer Abnahme der Relaxation führt. Mit Hilfe von Geweben der NO-GC-KO-Mäuse konnte belegt werden, daß NO in Abwesenheit der NO-GC weder die cGMP-Synthese noch eine Relaxation induzieren kann. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, daß die NO-GC den einzigen Rezeptor für NO im Organismus darstellt.

Weiteres Ziel war die Untersuchung der Wirkung des im Verlauf der vorliegenden Arbeit beschriebenen PDE2-Hemmstoffs BAY60-7550 auf einzelne Komponenten der NO/cGMP-Signalkaskade. Anhand von *in vitro*-Studien konnte die Inhibition der PDE2 bei niedrigen BAY60-7550-Konzentrationen verifiziert werden. Darüber hinaus konnte jedoch auch eine Häm-abhängige Aktivierung der NO-GC durch hohe Konzentrationen von BAY60-7550 festgestellt werden, die auch in intakten Zellen und *ex vivo* funktionell in Organbadexperimenten nachweisbar war.

7. Literatur

Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. und Toro L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, HSI0, is a target of cGMPdependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**: 32950-6.

Ammendola, A., Geiselhoring, A., Hofmann, F. und Schlossmann, J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptorassociated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J. Biol. Chem.* **276**: 24153-9.

Anantharaman, V., Koonin, E. V. und Aravind, L. (2001). Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J. Mol. Biol.* **307**: 1271-92.

Aravind, L. und Ponting, C. P. (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 458-9.

Artemyev, N. O., Arshavsky, V. Y. und Cote, R. H. (1998). Photoreceptor phosphodiesterase: interaction of inhibitory gamma subunit and cyclic GMP with specific binding sites on catalytic subunits. *Methods* **14**: 93-104.

Atkinson, R. A., Saudek, V., Huggins, J. P. und Pelton J. T. (1991). ¹H NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: a leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry* **30**: 9387-95.

Axelsson, K. L., Wikberg, J. E. und Andersson, R. G. (1979). Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci.* **24**: 1779-86.

Ballard, S. A., Gingell, C. J., Tang, K., Turner, L. A., Price, M. E. und Naylor, A. M. (1998). Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J. Urol.* **159**: 2164-71.

Bellamy, T. C., Wood, J., Goodwin, D. A. und Garthwaite, J. (2000). Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 2928-33.

Boess, F. G., Hendrix, M., van der Staay, F. J., Erb, C., Schreiber, R., van Staveren, W., de Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A. und Koenig, G. (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* **47**: 1081-92.

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

Bohme, G. A., Bon, C., Stutzmann, J. M., Doble, A. und Blanchard, J. C. (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* **199**: 379-81.

- Bollet, M., Allen, M. J., Ballard, S. A., Gepi-Attee, S., Muirhead, G. J., Naylor, A. M., Osterloh, I. H. und Gingell, C. (1996). Sildenafil: an orally active type 5' cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* **8**: 47-52.
- Bredt, D. S. und Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulinrequiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 682-5.
- Burnett, A. L. (2005). Phosphodiesterase 5 mechanisms and therapeutic applications. *Am. J. Cardiol.* **96**: 29M-31M.
- Buechler, W. A., Nakane, M. und Murad, F. (1991). Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 351-7.
- Bult, H., Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordaens, F. H., Van Maercke, Y. M. und Herman, A. G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**: 346-7.
- Chen, L., Daum, G., Chitaley, K., Coats, S. A., Bowen-Pope, D. F., Eigenthaler, M., Thumati, N. R., Walter, U., und Clowes, A. W. (2004). Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **8**: 1403-8.
- Chinkers, M. und Garbers, D. L. (1989). The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* **245**: 1392-4.
- Chinkers, M. und Wilson, E. M. (1992). Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J. Biol. Chem.* **267**: 18589-97.
- Conti, M. (2000). Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* **14**: 1317-27.
- Corbin, J. D. und Francis, S. H. (1999). Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J. Biol. Chem.* **274**: 13729-32.
- Corbin, J. D., Turko, I. V., Beasley, A. und Francis, S. H. (2000). Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2760-7.
- Degerman, E., Belfrage, P. und Manganiello, V. C. (1997). Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J. Biol. Chem.* **27**: 6823-6.
- de Sauvage F.J., Camerato T.R. und Goeddel D.V. (1991): Primary structure and functional expression of the human receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **266**, 17912-8.
- Diamond, J. (1978). Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **9**: 327-40.

- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. und Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**: 601-5.
- Di Rosa, M. und Ialenti, A. (1990). Selective inhibition of inflammatory reactions by vasocortin and antinflammin 2. *Prog. Clin. Biol. Res.* **349**: 81-90.
- Dong, H., Osmanova, V., Epstein, P. M. und Brocke, S. (2006). Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**: 713-9.
- Drewett, J. G. und Garbers, D. L. (1994). The family of Guanylyl-Cyclase receptors and their ligands. *Endocr. Rev.* **15**: 135-62.
- Fan Chung, K. (2006). Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 110-7.
- Fawcett, L., Baxendale, R., Stacey, P., McGrouther, C., Harrow, I., Soderling, S., Hetman, J., Beavo, J. A. und Phillips, S. C. (2000). Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 3702-7.
- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. und Lyubarsky, A. L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**: 310-3.
- Field, M., Graf, L. H., Jr., Laird, W. J. und Smith, P. L. (1978). Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 2800-4.
- Fisher, D. A., Smith, J. F., Pillar, J. S., St. Denis, S. H. und Cheng, J. B. (1998). Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**: 570-7.
- Foerster, J., Harteneck, C., Malkewitz, J., Schultz, G. und Koesling, D. (1996). A functional heme-binding site of soluble Guanylyl-Cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur. J. Biochem.* **240**: 380-6.
- Förstermann, U., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Sheng, H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M. und Murad, F. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1849-57.
- Francis, S. H., Turko, I. V. und Corbin, J. D. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **65**: 1-52.
- Friebe, A., Schultz, G. und Koesling, D. (1996). Sensitizing soluble Guanylyl-Cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.* **15**: 6863-8.

- Friebe, A., Müllershausen, F., Smolenski, A., Walter, U., Schultz, G. und Koesling, D. (1998). YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol. Pharmacol.* **54**: 962-7.
- Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B. und Keef, K. D. (1999). Cyclic GMPdependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J. Biol. Chem.* **274**: 10927-35.
- Fülle, H. J., Vassar, R., Foster, D. C., Yang, R. B., Axel, R. und Garbers, D. L. (1995). A receptor Guanylyl-Cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 3571-5.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. und Sessa, W. C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**: 597-601.
- Furchgott, R. F. und Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the Relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-6.
- Galle, J., Zabel, U., Hubner, U., Hetzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C. und Schmidt, H. H. (1999). Effects of the soluble Guanylyl-Cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *Br. J. Pharmacol.* **127**:195-203.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K. und 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**: 184-8.
- Gerzer, R., Böhme, E., Hofmann, F. und Schultz, G. (1981). Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS. Lett.* **132**: 71-4.
- Gerzer, R., Hofmann, F. und Schultz, G. (1981). Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur. J. Biochem.* **116**: 479-86.
- Gillespie, P. G. und Beavo, J. A. (1988). Characterization of a bovine cone photoreceptor phosphodiesterase purified by cyclic GMP-sepharose chromatography. *J. Biol. Chem.* **263**: 8133-41.
- Gross, S. S., Stuehr, D. J., Aisaka, K., Jaffe, E. A., Levi, R. und Griffith, O. W. (1990). Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**: 96-103.
- Hagiwara, M., Endo, T. und Hidaka, H. (1984) Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 453-7.
- Hansen, G., Jin, S., Umetsu, D. T. und Conti, M. (2000). Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6751-6.

- Harper, J. F. und Brooker, G. (1975). Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1**: 207-18.
- Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G. und Böhme, E. (1990). Expression of soluble Guanylyl-Cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS. Lett.* **272**: 221-3.
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Böhme, E. und 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**: 217-22.
- Haslam, R. J., Davidson, M. M., Davies, T., Lynham, J. A. und McClenaghan, M. D. (1978). Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **9**: 533-52.
- Haslam, R. J., Dickinson, N. T. und Jang, E. K. (1999). Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb. Haemost.* **82**: 412-23.
- Haug L. S., Jensen V., Hvalby O., Walaas S. I. und Ostvold A. C. (1999): Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J. Biol. Chem.* **274**: 7467-73.
- Hedlund, P., Aszodi, A., Pfeifer, A., Alm, P., Hofmann, F., Ahmad, M., Fassler, R. und Andersson, K. E. (2000): Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 2349-54.
- Hofmann, F., Gensheimer, H. P. und Gobel, C. (1985). cGMP-dependent protein kinase. Autophosphorylation changes the characteristics of binding site 1. *Eur. J. Biochem.* **147**: 361-5.
- Hofmann, F., Ammendola, A. und Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* **113**: 1671-6.
- Houslay, M. D. und Adams, D. R. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitisation and compartmentalisation. *Biochem. J.* **370**: 1-18.
- Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K. D., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G. und Böhme, E. (1990). Purification of soluble Guanylyl-Cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur. J. Biochem.* **190**: 273-8.
- Hunter, W. M. und Greenwood, F. C. (1964). A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem. J.* **91**: 43-56.
- Hurley, J. B. und Stryer, L. (1982). Purification and characterization of the gamma regulatory subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase from retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* **257**: 11094-9.

- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. und Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 9265-9.
- Ignarro, L. J., Bush, P. A., Buga, G. M., Wood, K. S., Fukuto und J. M, Rajfer, J. (1990). Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**: 843-50.
- Iwata, T., Uchida-Mizuno, K., Katafuchi, T., Ito, T., Hagiwara, H. und Hirose, S. (1991). Bifunctional atrial natriuretic peptide receptor (type A) exists as a disulfide-linked tetramer in plasma membranes of bovine adrenal cortex. *J. Biochem. (Tokyo)* **110**: 35-9.
- Iyengar, R., Stuehr, D. J. und Marletta, M. A. (1987). Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 6369-73.
- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H. R., Lohmann, S. M. und Walter, U. (1994). Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 9426-30.
- Juilfs, D. M., Fulle, H. J., Zhao, A. Z., Houslay, M. D., Garbers, D. L. und Beavo, J. A. (1997). A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and Guanylyl-Cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 3388-95.
- Juilfs, D.M., Soderling, S., Burns, F. und Beavo, J. A. (1999). Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**: 67-104.
- Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U. und Schultz, J. E. (2002). A GAF-domain-regulated Adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.* **21**: 3672-80.
- Keilbach, A., Ruth, P. und Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* **208**: 467-73.
- Kiemer, A. K. und Vollmar, A. M. (1998). Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* **273**: 13444-51.
- Kim, D., Rybalkin, S. D., Pi, X., Wang, Y., Zhang, C., Munzel, T., Beavo, J. A., Berk, B. C. und Yan, C. (2001). Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation* **104**: 2338-43.
- Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G. und Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J. Cell Biol.* **144**: 745-54.
- Klatt, P., Schmidt, K. und Mayer, B. (1992): Brain nitric oxide synthase is a hemoprotein. *Biochem. J.* **288**: 15-7.

- Klodt, J., Kuhn, M., Marx, U. C., Martin, S., Rosch, P., Forssmann, W. G. und Adermann, K. (1997). Synthesis, biological activity and isomerism of guanylate cyclase C-activating peptides guanylin and uroguanylin. *J. Pept. Res.* **50**: 222-30.
- Knispel, H. H., Goessl, C. und Beckmann, R. (1992). Nitric oxide mediates relaxation in rabbit and human corpus cavernosum smooth muscle. *Urol. Res.* **20**: 253-7.
- Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. und Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 5159-62.
- Koesling, D., Herz, J., Gausepohl, H., Niroomand, F., Hinsch, K. D., Mülsch, A., Böhme, E., Schultz, G. und Frank, R. (1988). The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS. Lett.* **239**: 29-34.
- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G. und 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**: 128-32.
- Koller, K. J., Lowe, D. G., Bennett, G. L., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. und Goeddel, D. V. (1991). Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* **252**: 120-3.
- Komalavilas, P. und Lincoln, T. M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.* **271**: 21933-8.
- Kowaluk, E. A., Poliszczuk, R. und Fung, H. L. (1987). Tolerance to relaxation in rat aorta: comparison of an S-nitrosothiol with nitroglycerin. *Eur. J. Pharmacol.* **144**: 379-83.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lev-Ram, V., Nebyelul, Z., Ellisman, M. H., Huang, P. L. und Tsien, R. Y. (1997). Absence of cerebellar long-term depression in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Learn Mem.* **4**: 169-77.
- Li, J. und Lester, H. A. (1999). Functional roles of aromatic residues in the ligand-binding domain of cyclic nucleotide-gated channels. *Mol Pharmacol.* **55**: 873-82.
- Li, L., Yee, C. und Beavo, J. A. (1999). CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science* **283**: 848-51.
- Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. und Moncada, S. (1990). Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**: 4794-7.

- Lin, C. S., Lau, A., Tu, R. und Lue, T. F. (2000). Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**: 628-35.
- Lincoln, T. M., Komalavilas, P., Cornwell, T. L. (1994). Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* **23**: 1141-7.
- Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U. und De Jonge, H. R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 307-12.
- Loughney, K., Hill, T. R., Florio, V. A., Uher, L., Rosman, G. J., Wolda, S. L., Jones, B. A., Howard, M. L., McAllister-Lucas, L. M., Sonnenburg, W. K., Francis, S. H., Corbin, J. D., Beavo, J. A. und Ferguson, K. (1998). Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMPbinding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* **216**: 139-47.
- Loughney, K., Taylor, J. und Florio, V. A. (2005). 3',5'-Cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *Int. J. Impot. Res.* **17**: 320-5.
- Lowe, D. G., Chang, M. S., Hellmiss, R., Chen, E., Singh S., Garbers, D. L. und Goeddel D.V. (1989). Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO. J.* **8**, 1377-84.
- Lowe, D. G. (1992). Human natriuretic peptide receptor-A Guanylyl-Cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry* **31**: 10421-5.
- Lowe, D. G., Dizhoor, A. M., Liu, K., Gu, Q., Spencer, M., Laura, R., Lu, L. und Hurley, J. B. (1995). Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina Guanylyl-Cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 5535-9.
- MacMicking, J., Xie, Q. W. und Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-50.
- MacPhee, C. H., Reifsnyder, D. H., Moore, T. A., Lerea, K. M. und Beavo, J. A. (1988). Phosphorylation results in activation of a cAMP phosphodiesterase in human platelets. *J. Biol. Chem.* **263**: 10353-8.
- Markert, T., Krenn, V., Leebmann, J. und Walter, U. (1996). High expression of the focal adhesion- and microfilament-associated protein VASP in vascular smooth muscle and endothelial cells of the intact human vessel wall. *Basic Res. Cardiol.* **91**: 337-43.
- Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D. und Wishnok, J. S. (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* **2**: 8706-11.
- Martinez, S. E., Wu, A. Y., Glavas, N. A., Tang, X. B., Turley, S., Hol, W. G. und Beavo, J. A. (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 13260-5.

- Mayer, B., John, M. und Böhme, E. (1990): Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* **277**: 215-9.
- Mellion, B. T., Ignarro, L. J., Ohlstein, E. H., Pontecorvo, E. G., Hyman, A. L. und Kadowitz, P. J. (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'- monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**: 946-55.
- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. und Koesling, D. (2003). Major occurrence of the new alpha(2)beta(1) isoform of NO-sensitive Guanylyl-Cyclase in brain. *Cell. Signal.* **15**: 189-95.
- Meyer, M. R., Angele, A., Kremmer, E., Kaupp, U. B. und Muller, F. (2000). A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 10595-600.
- Müllershausen, F., Russwurm, M., Thompson, W. J., Liu, L., Koesling, D. und Friebe, A. (2001). Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J. Cell Biol.* **155**: 271-8.
- Müllershausen, F., Friebe, A. Feil, R., Thompson, W. J., Hofmann, F. und Koesling, D. (2003). Direct activation of PDE5 by cGMP: Long-term effects within NO/cGMP-signalling. *J. Cell Biol.* **160**: 719-27.
- Müllershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D. und Friebe, A. (2003). The enhanced NO-induced cGMP response induced by long-term L-NAME treatment is not due to enhanced expression of NO-sensitive guanylyl-cyclase. *Vascul. Pharmacol.* **40**: 161-5.
- Müllershausen, F., Russwurm, M., Friebe, A. und Koesling, D. (2004). Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive Guanylyl-Cyclase BAY 41-2272. *Circulation* **109**: 1711- 3.
- Müllershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D. und Friebe, A. (2004). In vivo reconstitution of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 4023-30.
- Müllershausen, F., Koesling, D. und Friebe, A. (2005). NO-sensitive Guanylyl-Cyclase and NO-induced feedback inhibition in cGMP signaling. *Front. Biosci.* **10**: 1269-78.
- Mülsch, A., Bauersachs, J., Schäfer, A., Stasch, J. P., Kast, R. und 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**: 681-9.
- Mulsch, A., Busse, R. und Bassenge, E. (1988). Desensitization of guanylate cyclase in nitrate tolerance does not impair endothelium-dependent responses. *Eur. J. Pharmacol.* **158**: 191-8.

- Munzel, T., Giaid, A., Kurz, S., Stewart, D. J. und Harrison, D. G. (1995). Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 5244-8.
- Munzel, T., Hink, U., Yigit, H., Macharzina, R., Harrison, D. G. und Mulsch, A. (1999). Role of superoxide dismutase in in vivo and in vitro nitrate tolerance. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 1224-30.
- Murad, F., Förstermann, U., Nakane, M., Pollock, J., Tracey, R., Matsumoto, T. und Buechler, W. (1993). The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28**: 101-9.
- Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S. und Nakano, T. (1999). Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell. Signal.* **11**: 671-6.
- Nakane, M., Saheki, S., Kuno, T., Ishii, K. und 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**: 1139-47.
- Nakane, M., Arai, K., Saheki, S., Kuno, T., Buechler, W. und Murad, F. (1990). Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* **265**: 16841-5.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-64.
- Nilius, B. und Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**: 1415-59.
- O'Connor, V., Genin, A., Davis, S., Karishma, K. K., Doyere, V., De Zeeuw, C. I., Sanger, G., Hunt, S. P., Richter-Levin, G., Mallet, J., Laroche, S., Bliss TV und French, P. J. (2004). Differential amplification of intron-containing transcripts reveals long term potentiation-associated up-regulation of specific PDE10A phosphodiesterase splice variants. *J. Biol. Chem.* **279**: 15841-9.
- O'Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R. und Arancio, O. (1991). Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 11285-9.
- Pagano, P. J., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P. M., Tauber, A. I. und Cohen, R. A. (1995). An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* **268**: H2274-80.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. und Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-6.

- Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S. und Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 1251-6.
- Parker, J. D. und Gori, T. (2001). Tolerance to the organic nitrates: new ideas, new mechanisms, continued mystery. *Circulation* **104**: 2263-5.
- Pellicone, C., Cook, N. J., Nullans, G. und Virmaux, N. (1985). Light-induced conformational change in rhodopsin detected by modification of G-protein binding, GTP gamma S binding and cGMP phosphodiesterase activation. *FEBS. Lett.* **181**: 184-8.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. und Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**: 105-49.
- Podzuweit, T., Nennstiel, P. und Muller, A. (1995). Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cell Signal.* **7**: 733-8.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. und Moncada, S. (1990): Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 10043-7.
- Rao, M. C., Guandalini, S., Laird, W. J. & Field, M. (1979). Effects of heatstable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum. *Infect. Immun.* **26**: 875-8.
- Rivet-Bastide, M., Vandecasteele, G., Hatem, S., Verde, I., Benardeau, A., Mercadier, J. J. und Fischmeister, R. (1997). cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J. Clin. Invest.* **99**: 2710-8.
- Russwurm, M., Wittau, N. und Koesling, D. (2001). Guanylyl-Cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 Guanylyl-Cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* **276**: 44647-52.
- Rybalkin, S. D., Bornfeldt, K. E., Sonnenburg, W. K., Rybalkina, I. G., Kwak, K. S., Hanson, K., Krebs, E. G. und Beavo, J. A. (1997). Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. *J. Clin. Invest.* **100**: 2611-21.
- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. und Beavo, J. A. und Bornfeldt, K. E. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* **90**: 151-7.
- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Feil, R., Hofmann, F. und Beavo, J. A. (2002). Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 3310-7.

- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X. B. und Beavo, J. A. (2003). PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO. J.* **22**: 469-78.
- Rybalkin, S. D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. und Beavo, J. A. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ. Res.* **93**: 280-91.
- Sadhu, K., Hensley, K., Florio, V. A. und Wolda, S. L. (1999). Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **47**: 895-906.
- Sanders, K. M. und Ward, S. M. (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am. J. Physiol.* **262**: G379-92.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. und Hofmann, F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ. Res.* **87**: 825-30.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. und Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* **404**: 197-201.
- Schmidt, H. H., Nau, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K. E., Klein, M. M., Niroomand, F. und Bohme, E. (1988). Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* **154**: 213-6.
- Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D. und 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., Schultz, K.-D., Böhme, E. und Kreye, V. A. (1978). The possible role of cyclic GMP in the action of hormones and drugs on smooth muscle tonus: Effects of exogenous cyclic GMP derivatives. *Adv. Ther. (ed. J. C. Stoclet) Vol. 3. Pergamon Press, Oxford, New York*: 113-122.
- Schultz, G. und Böhme, E. (1984). Guanylate Cyclase. GTP pyrophosphatase-lyase (cyclizing), E.C.4.6.1.2. *Methods of enzymatic analysis IV (ed. H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Graßl). Verlag Chemie, Weinheim, New York*: 379-89.
- Schulz, S., Singh, S., Bellet, R. A., Singh, G., Tubb, D. J., Chin, H. und Garbers, D. L. (1989). The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* **58**, 1155-62.
- Schulz, S., Green, C. K., Yuen, P. S. T. und Garbers, D. L. (1990). Guanylyl-Cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* **63**, 941-8.
- Schulz, S., Wedel, B. J., Matthews, A. und Garbers, D. L. (1998). The cloning and expression of a new Guanylyl-Cyclase orphan receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 1032-7.

Schuman, E. M. und Madison, D. V. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*. **254**: 1503-6.

Seybold, J., Thomas, D., Witzenrath, M., Boral, S., Hocke, A. C., Burger, A., Hatzelmann, A., Tenor, H., Schudt, C., Krull, M., Schutte, H., Hippenstiel, S. und Suttorp, N. (2005). Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood*. **105**: 3569-76.

Shibuki, K. und Okada, D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*. **349**: 326-8.

Smith, J. A., Francis, S. H., Walsh, K. A., Kumar, S. und Corbin, J. D. (1996). Autophosphorylation of type Ibeta cGMP-dependent protein kinase increases basal catalytic activity and enhances allosteric activation by cGMP or cAMP. *J. Biol. Chem.* **271**: 20756-62.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.

Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H. und Walter, U. (1998). Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **273**: 20029-35.

Soderling, S. H., Bayuga, S. J. und Beavo, J.A. (1999). Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 7071-6.

Soderling, S. H. und Beavo, J. A. (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 174-9.

Somlyo, A. P. und Somlyo, A. V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**: 231-6

Sonnenburg, W. K., Mullaney, P. J. und Beavo, J. A. (1991). Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J. Biol. Chem.* **266**: 17655-61.

Stasch, J. P., Becker, E. M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Feurer, A., Gerzer, R., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schroder, H., Schroeder, W., Stahl, E., Steinke, W., Straub, A. und Schramm, M. (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* **410**: 212-5.

Stasch, J. P., Schmidt, P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Haerter, M., Heil, M., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schramm, M., Schroeder, W., Schroeder, H., Stahl, E., Steinke, W. & Wunder, F. (2002). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br. J. Pharmacol.* **136**: 773-83.

- Steiner, A. L., Wehmann, R. E., Parker, C. W. und Kipnis, D. M. (1972). Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **2**, 51-61.
- Stone, J. R. und Marletta, M. A. (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**: 5636-40.
- Stone, J. R. und Marletta, M. A. (1995). Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* **34**, 14668-74.
- Stryer, L., Hurley, J. B. und Fung, B. K. (1981). First stage of amplification in the cyclic nucleotide cascade of vision. *Curr. Top. Membr. Transp.* **15**: 93-108.
- Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1990). C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 863-70.
- Suga, S., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., Yoshimasa, T. und Nakao, K. (1993). Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells-evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology.* **133**: 3038-41.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M. und Mendelsohn, M. E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Science* **286**: 1583-7.
- Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Gilman, A. G. und Sprang, S. R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science.* **278**: 1907-16.
- Thomas, M. K., Francis, S. H. und Corbin, J. D. (1990). Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J. Biol. Chem.* **265**: 14971-8.
- Thompson, D. K. und Garbers, D. L. (1995). Dominant negative mutations of the Guanylyl-Cyclase-A receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations. *J. Biol. Chem.* **270**: 425-30.
- Thorne, G. M., Deneke, C. F. und Gorbach, S. L. (1979). Hemagglutination and adhesiveness of toxigenic Escherichia coli isolated from humans. *Infect. Immun.* **23**, 690-9.
- Toward, T. J., Smith, N. und Broadley, K. J. (2004). Effect of phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil (ViagraTM), in animal models of airways disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**: 227-34.
- Turko, I. V., Francis, S. H. und Corbin, J. D. (1998). Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem. J.* **329**: 505-10.

Turko, I. V., Ballard, S. A., Francis, S. H. und Corbin, J. D. (1999). Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol. Pharmacol.* **56**: 124-30.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. und Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* **389**: 990-4.

Uhler, M. D. (1993). Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J. Biol. Chem.* **268**: 13586-91.

Vaandrager, A. B., Edixhoven, M., Bot, A. G., Kroos, M. A., Jarchau, T., Lohmann, S., Genieser, H. G. und de Jonge, H. R. (1997). Endogenous type II cGMP-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoforms. *J. Biol. Chem.* **272**: 11816-23.

Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Tilly, B. C., Houtsmuller, A. B., Ehlert, E. M., Bot, A. G., Edixhoven, M., Boomaars, W. E., Lohmann, S. M. und de Jonge, H. R. (1998). Membrane targeting of cGMPdependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 1466-71.

Vollmar, A. M. und Schulz, R. (1995). Atrial natriuretic peptide inhibits nitric oxide synthesis in mouse macrophages. *Life Sci.* **56**: PL149-55.

Walter, U., Eigenthaler, M., Geiger, J. und Reinhard, M. (1993). Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv. Exp. Med. Biol.* **344**, 237-49.

Wayman, C., Phillips, S., Lunny, C., Webb, T., Fawcett, L., Baxendale, R. und Burgess, G. (2005). Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int. J. Impot. Res.* **17**: 216-23.

Wedel, B., Humbert, P., Harteneck, C., Foerster, J., Malkewitz, J., Böhme, E., Schultz, G. und Koesling, D. (1994). Mutation of His-105 in the beta1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble Guanylyl-Cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2592-6.

Wedel, B., Harteneck, C., Foerster, J., Friebe, A., Schultz, G. und Koesling, D. (1995). Functional domains of soluble Guanylyl-Cyclase. *J. Biol. Chem.* **270**: 24871-5.

Wedel, B. und Garbers, D. (2001). The Guanylyl-Cyclase family at Y2K. *Annu. Rev. Physiol.* **63**: 215-33.

Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. und Liew, F. Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**: 408-11.

Wernet, W., Flockerzi, V. und Hofmann, F. (1989). The cDNA of the two isoforms of bovine cGMPdependent protein kinase. *FEBS. Lett.* **251**: 191-6.

- Wilson, E. M. und Chinkers, M. (1995). Identification of sequences mediating Guanylyl-Cyclase dimerization. *Biochemistry* **34**: 4696-701.
- Wu, C. C., Ko, F. N., Kuo, S. C., Lee, F.Y. und Teng, C. M. (1995). YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 1973-8.
- Xie, Q., und Nathan, C. (1994). The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leukoc. Biol.* **56**: 576-82.
- Yan, C., Zhao, A. Z., Bentley, J. K. und Beavo, J. A. (1996). The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissuespecific manner. *J. Biol. Chem.* **271**, 25699-706.
- Yang, R.-B., Foster, D. C., Garbers, D. L. und Fulle, H. J. (1995). Two membrane forms of Guanylyl-Cyclase found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 602-6.
- Yu, J., Wolda, S. L., Frazier, A. L., Florio, V. A., Martins, T. J., Snyder, P. B., Harris, E. A., McCaw, K. N., Farrell, C. A., Steiner, B., Bentley, J. K., Beavo, J. A., Ferguson, K. und Gelin, R. (1997). Identification and characterisation of a human calmodulinstimulated phosphodiesterase PDE1B1. *Cell. Signal.* **9**: 519-29.
- Yuen, P. S., Potter, L. R. und Garbers, D. L. (1990). A new form of Guanylyl-Cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* **29**: 10872-8.
- Zhang G., Liu Y., Ruoho A. E., Hurley J. H. (1997): Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* **386**, 247-53.
- Zhao, Y., Schelvis, J. P., Babcock, G. T. und Marletta, M. A. (1998): Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* **37**: 4502-9.

8. Publikationen

Koesling, D., Müllershausen, F., Lange, A., Friebe, A., Mergia, E., Wagner, C. und Russwurm, M. (2005). Negative feedback in NO/cGMP signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 1119-22.

Müllershausen, F., Lange, A., Mergia, E., Friebe, A. und Koesling, D. (2006). Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Mol. Pharmacol.* **69**: 1969-74.

Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. und Koesling, D. (2006). Guanylyl cyclase is the only NO receptor mediating vasorelaxation and platelet inhibition. *Eingereicht.*

Lange, A., Dangel, O., Müllershausen, F., Koesling, D. und Friebe, A. (2006). The new PDE2-specific inhibitor BAY60-7550 activates NO-sensitive guanylyl-cyclase. *In Vorbereitung.*

9. Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAY41-2272	[3-(4-Amino-5-cyclopropylpyrimidin-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin]
BAY60-7550	[2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-7-[(1R)-1-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-phenylbutyl]-5-methylimidazo[5,1-f] [1,2,4] triazin-4(3H)-one]
BNP	natriuretisches Peptid des Hirns (brain-derived natriuretic peptide)
BK _{Ca}	Kalzium-kontrollierter Kaliumkanal
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCh	Carbachol (Acetylcholinester)
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNG-Kanal	durch cyclische Nukleotide regulierter Ionenkanal
CNP	natriuretisches Peptid Typ C
cpm	Zählrate radioaktiver Strahlung (counts per minute)
DAG	Diacylglycerol
DEA	Diethylamin
DEA-NO	Diethylamin-NONOate (1-Diethyl-2-Hydroxy-2-Nitroso-Hydrazin)
DETA-NO	(Z)-1-[2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl) amino] diazen-1-ium-1,2-diolate
DMEM	Nährmedium für Säugerzellen (4500 mg/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvat)
DTT	D,L-Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximal effektive Konzentration
EDRF	'endothelium-derived relaxing factor'
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EHNA	Erythro-9-(2-Hydroxy-3-Nonyl) Adenin
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ET ₁	Endothelin-1

FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GAF-Domäne	Domäne aus α GMP-Phosphodiesterasen, <u>A</u> denylyl-Cyclasen und <u>F</u> hIA (<i>E.coli</i> formate hydrogen lyase transcriptional activator)
GC (NO-GC)	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein-coupled receptor)
GSNO	S-Nitroso-L-Glutathion
GTP, GDP, GMP	Guanosin-5'-triphosphat,-diphosphat,-monophosphat
HEK	human embryonic kidney
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
IC ₅₀	halbmaximale inhibierende Konzentration
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes PKGI-Substrat
ISDN	Isosorbid-dinitrat
kDA	Kilo-Dalton ($10^3 \times \text{g} \times \text{mol}^{-1}$)
k _M	Michaelis-Konstante
LDL	'low density lipoprotein'
L-NAME	N ω -Nitro-L-Argenin-Methylester
M	mol pro Liter
MLC	Myosin-Leichte-Kette
MLCK	Myosin-Leichte-Kette-Kinase
MLCP	Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NTG	Tri-Nitro-Glycerin
ODQ	1H-[1,2,4,]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat buffer saline)
8pCPTcGMP	8-(4-Chlorophenylthio)-guanosin 3',5'-cyclic monophosphat
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phenylephrin

PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (auch: Prostacyclin)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PKGI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Sc-cGMP-TME	Succinyl-cGMP-Tyrosinmethylester
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SNP	Natriumnitroprussid (Sodium nitroprusside)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TEA/HCl	Triethanolamin Hydrochlorid
TRP	'transient receptor potential'
TXA ₂	Tromboxan A ₂
VASP	Vasodilator stimuliertes Phosphoprotein
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzyl-Indazol
% (v/v)	Volumenprozent (volume/volume)
% (w/v)	Gewichtsprozent (weight/volume)

10. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Doris Koesling für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Hanns Hatt danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Florian Müllershausen für die intensive Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft, und Herrn PD Dr. Andreas Friebe für die Übernahme und Weiterführung dieser Betreuung.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmakologie und Toxikologie, die mir tatkräftig unter die Arme gegriffen haben. Ganz besonderer Dank für die stets freundliche Unterstützung geht an Herrn Fred Eichhorst und Herrn Arkadius Pacha.

Meinen Eltern und Anke möchte ich ebenfalls für die stetige Unterstützung danken.

11. Lebenslauf

Name: Alexander Lange
Geburtstag: 2. Juni 1977
Geburtsort: Halle a.d. Saale
Eltern: Herbert Lange
Bärbel Lange, geb. Hubert

Schulbildung

1983 – 1988 Polytechnische Oberschule Heinrich Rau (Halle)
1989 – 1990 Gesamtschule Albert Einstein (Remscheid)
1990 – 1997 Leibniz Gymnasium Remscheid

Juli 1997 Abitur

1997 – 1998 Zivildienst

Studium

1998 – 2002 Studium der Biologie
2002 – 2003 Diplomarbeit in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie
der Ruhr-Universität Bochum
2003 – 2006 Promotion in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie der
Ruhr-Universität Bochum

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit selbstständig verfaßt und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe und daß es sich bei der heute von mir eingereichten Dissertation um fünf in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare handelt. Weiterhin erkläre ich, daß digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.