



Aus der Klinik für Thorax- und kardiovaskuläre Chirurgie

Zentrum für Operative Medizin I

Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie

Universitätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. E. Gams

**NO-unabhängiger Stimulator der löslichen Guanylatcylase und seine Wirkung an
humaner Vena saphena magna
- eine experimentelle Studie -**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Eva Debowski

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jochen D. Schipke

Korreferent: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Der NO-sGC-cGMP-Signalweg	1
1.1.1. NO-vermittelte Vasodilatation	1
1.1.2. NO-vermittelte Thrombozyten-Aggregationshemmung	3
1.1.3. Endotheliale Dysfunktion	4
1.1.4. Therapie mit organischen Nitraten.....	5
1.2. BAY 41-2272: NO-unabhängiger und Häm-abhängiger Stimulator der löslichen Guanylatcyclase	7
1.3. BAY 41-2272 Wirkungsprofil	8
1.4. Vasodilator- stimuliertes Phosphoprotein.....	11
1.5. Ziel der Studie.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Untersuchungsobjekte	14
2.2. Chemikalien, Pharmaka, Reagenzien	14
2.2.1. Stimulator der löslichen Guanylatcyclase: BAY 41-2272	14
2.2.2. Vasodilatoren	14
2.2.3. Vasokonstriktoren	15
2.2.4. Andere.....	15
2.2.5. Inhibitor der sGC: ODQ.....	15
2.2.6. Puffer und Lösungen.....	15
2.2.7. Antikörper.....	17
2.2.8. Gele.....	17
2.3. Versuchsaufbau.....	17

Inhaltsverzeichnis

2.4. Versuchsablauf	18
2.4.1. <i>Präparation</i>	19
2.4.2. <i>Kalibrierung</i>	19
2.4.3. <i>Einhängen und Äquilibration</i>	19
2.5. Funktionstests	20
2.5.1. <i>Kontraktionstest mit Kaliumchlorid</i>	20
2.5.2. <i>Kontraktionstest mit Phenylephrin</i>	20
2.5.3. <i>Dilatationstest mit Acetylcholin</i>	20
2.5.4. <i>Endotheltest mit Acetylcholin</i>	21
2.5.5. <i>Dilatationstest mit BAY 41-2272</i>	21
2.6. Western Blot	22
2.6.1. <i>Durchführung</i>	22
2.6.2. <i>Lyse und Homogenisierung der Venen</i>	23
2.6.3. <i>Proteinbestimmung</i>	23
2.6.4. <i>Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen</i>	23
2.6.5. <i>Transfer der Proteine (Western Blot)</i>	24
2.6.6. <i>Immundetektion</i>	24
2.6.7. <i>Detektion mit Chemilumineszenz</i>	25
2.6.8. <i>Strippen der Membranen</i>	25
2.6.9. <i>Funktionstests (Organbad)</i>	26
2.6.10. <i>Proteinanalyse (Western Blot)</i>	26
2.7. Daten und Statistik	27
2.7.1. <i>Funktionstests</i>	27
2.7.2. <i>Proteinanalyse</i>	27
2.7.3. <i>Statistik</i>	27
3. ERGEBNISSE	28
3.1. Endothelabhängige dilatative Eigenschaften der Venen	28
3.2. Dilatative Wirkung von Acetylcholin an intakten und	30
denudierten Venen	30
3.3. Dilatative Wirkung von BAY 41-2272 an intakten und	31
denudierten Venen	31

3.4. Dilatative Eigenschaften von BAY 41-2272 nach Zugabe des löslichen Guanylatcyclase-Inhibitors ODQ	33
3.5. Proteinanalyse mittels Western Blot.....	34
4. DISKUSSION.....	36
4.1. Methodenkritik	36
4.1.1. Technische Begrenzung der Organbadversuche	36
4.1.2. Materialqualität	36
4.1.3. Denudation	37
4.1.4. Materialwahl	37
4.2. Wirkung von BAY 41-2272 an isolierten humanen Venen	38
4.3. Wirkung von BAY 41-2272 an isolierten humanen Venen nach Zugabe des löslichen Guanylatcyclase-Inhibitors ODQ	42
4.3.1. Aktivität der PK G I nach Zugabe von BAY 41-2272	43
4.3.2. Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP)	43
4.3.3. VASP-Phosphorylierung an Serin 239 nach Zugabe von BAY 41-2272	44
5. ENDOTHELIALE DYSFUNKTION	45
6. ZUSAMMENFASSUNG	47
6.1. Material und Methoden	47
6.2. Ergebnisse	48
6.3. Schlussfolgerung	48
7. LITERATUR.....	50
DANKSAGUNG	58
KONGRESSBEITRÄGE	59
LEBENS LAUF	60

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphorsäure
BAY 41-2272	BAY[3-(4-Amino-5-cyclopropylpyrimidine-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine]
BSA	Rinderserumalbumin
cGMP	zyklisches Guanosin-3'-5'- monophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC50	Konzentration zur halbmaximalen Hemmung der Vor- kontraktion
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ERDF	Endothelial derived relaxing factor (= NO)
EDTA	Ethylenglycol- bis(2-aminoethylether)-N4tetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EtOH	Ethanol
GTN	Glyceroltrinitrat
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
kDA oder kD	Kilodalton
KHP	Krebs-Henseleit Puffer
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-methylester
MeOH	Methanol
NaF	Natriumfluorid
M	Molarität (Substanz/Liter)
MW	Molekulargewicht
N	Newton
NOS	NO-Synthase
NP-40	Nonidet-P20 (Trigetol)

Abkürzungsverzeichnis

OD	optical density
ODQ	[1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PDVF	Polyvinyliden Fluorid
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phenylephrin
pH	-log(H)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
VASP P- Ser239	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein phosphoryliert an Serin 239
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
s	Sekunde
sGC	soluble guanylate cyclase = lösliche Guanylatcyclase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBST	Tris/Bohrat/Tween-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t.Octylphenoxipolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxiethylensorbitanmonolaurat
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
vs.	versus
W	Watt
YC-1	indirekter NO-unabhängiger sGC Aktivator

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Die NO-sGC-cGMP-Signalkaskade im Blutgefäß
modifiziert nach Mullershausen et al, 2003
- Abb. 2: Der NO-sGC-cGMP-Signalweg
modifiziert nach Feil, Kemp-Harper, 2006
- Abb. 3: Foto der isolierten Organbadapparatur IOA 5301 der Firma FMI
- Abb. 4: Einzelnes Organbad mit eingespannter Vene
- Abb. 5: Ablauf der Lumineszenzreaktion
- Abb. 6: Kumulative Dosiswirkungskurve mit ACh von 1 nM bis 1 mM
- Abb. 7: Vergleich der Dilatation an intakter und denudierter Vene durch 1 μ M ACh
- Abb. 8: Vergleich der dilatativen Wirkung von BAY 41-2272 an intakten und denudierten Venen
- Abb. 9: Die dilatative Antwort auf BAY 41-2272 ist durch Zugabe des sGC-Inhibitors ODQ vollständig aufgehoben
- Abb. 10: VASP P-Ser239 ohne und nach BAY- 412272 Inkubation
- Abb. 11: VASP- Western Blot Analyse

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Übersicht zur aktuellen Datenlage im Hinblick auf die Wirkung von BAY 41-2272 in arteriellen Gefäßen in Organbadversuchen
- Tab. 2: Übersicht über die Anzahl der einzelnen Versuche
- Tab. 3: Die durch 1 μM ACh erfolgte Dilatation war in den denudierten Venen, im Vergleich zu den intakten Venen, signifikant geringer
- Tab. 4: EC_{50} Werte und die Mittelwerte \pm SEM von BAY 41-2272 an isolierten intakten und denudierten humanen Venen
- Tab. 5: Die Wirkung von BAY 41-2272 in humanen Venen (eigene Ergebnisse) im Vergleich zur Wirkung an Arterien

1. Einleitung

1.1. Der NO-sGC-cGMP-Signalweg

Die Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO) und die Aufklärung der Bedeutung dieses gasförmigen Radikals für das Herzkreislaufsystem sind entscheidende Ergebnisse mehrjähriger Forschung von Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis Ignarro (Furchgott, 1999) (Murad, 1999) (Ignarro, 1999). Die drei Forscher wurden für ihre Arbeit mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie im Jahr 1998 ausgezeichnet.

NO stellt ein wichtiges Schlüsselmolekül für zahlreiche physiologische Prozesse dar. Es wird vielerorts im Körper durch NO-Synthasen (NOS) gebildet, die die Aminosäure Arginin zu Citrullin und NO umsetzen. Drei Isoformen der NO-Synthasen (neuronale, induzierbare und endotheliale NOS) sind in unterschiedlichen Konzentrationen in einzelnen Kompartimenten des Körpers verteilt und nehmen dort unterschiedliche Funktionen wahr. Dazu gehören die Erregungsübertragung und Langzeitpotenzierung im ZNS (Garthwaite, 1991) (Bohme et al, 1993), die Regulation des Tonus der glatten Muskulatur im Gastrointestinaltrakt und Urogenitaltrakt (Persson et al, 1992) (Toque et al, 2008) und damit verbunden der Sexualfunktion (Pickard et al, 1995), die Beeinflussung der Leukozytenadhäsion (Ahluwalia et al, 2004) sowie die Regulation der Thrombozytenaggregation und des Vasotonus (Furchgott, Vanhoutte, 1989) (Lucas et al, 2000).

1.1.1. NO-vermittelte Vasodilatation

Scher- und Dehnungskräfte im Gefäß aktivieren die für die Regulation des Vasotonus entscheidende endotheliale NO-Synthase zur NO-Bildung (Abb. 1). Daraufhin aktiviert NO die im Cytosol vorhandene lösliche Guanylatcyclase (sGC), die aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bildet (Koesling & Friebe, 1999). Das cGMP fungiert als sekundärer Botenstoff und aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG I, PKG II), cGMP-abhängige Ionenkanäle (Pfeifer et al, 1999) sowie cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (Hofmann et al, 2000).

Einleitung

Die resultierenden Effekte in der Endothelzelle werden durch die Hydrolyse zu Guanosinmonophosphat (GMP) durch Phosphodiesterasen (PDE), in der glatten Gefäßmuskulatur durch die PDE V, beendet (Maurice et al, 2003).

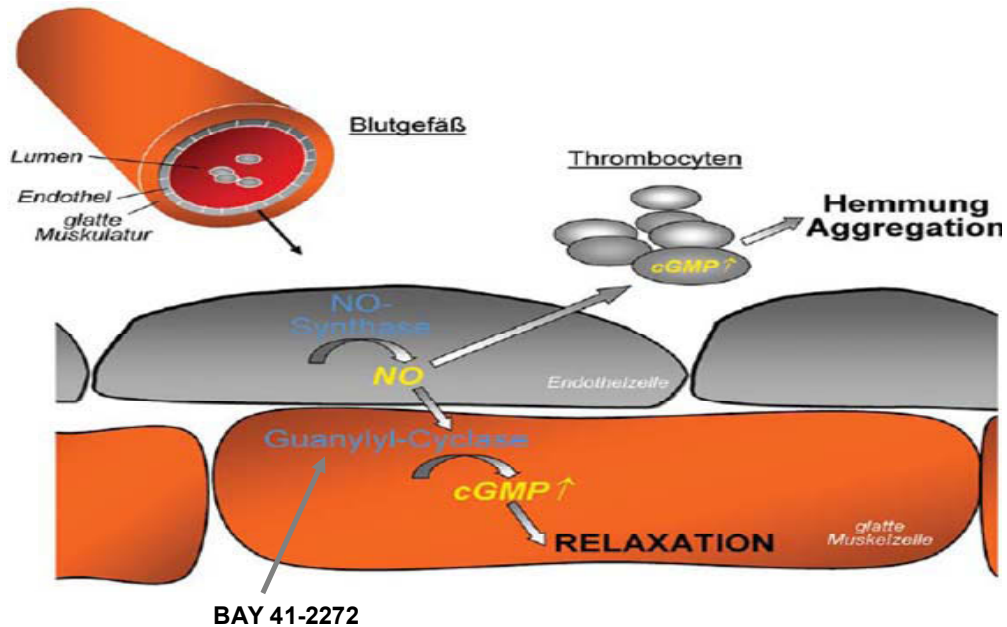


Abb.1: NO-sGC-cGMP- Signalkaskade im Blutgefäß. Scherkräfte induzieren eine Ca^{2+} Erhöhung im Blutgefäß, die zur Aktivierung der NO-Synthase und infolgedessen zur vermehrten NO-Bildung führt. Nach Diffusion in die glatte Muskulatur aktiviert NO die sGC, die über die Bildung von cGMP die Relaxation vermittelt. BAY 41-2272 stimuliert NO-unabhängig die sGC und führt über den gleichen Signalweg zur Relaxation. Das endothelial freigesetzte NO kann ebenfalls über eine verstärkte cGMP-Synthese die Aggregation von Thrombozyten hemmen.

Abb.1: modifiziert nach Muellershausen, 2003

Bei der Vermittlung der NO-abhängigen Vasodilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation spielt vor allem die PKG I eine entscheidende Rolle. Die durch cGMP aktivierte PKG I phosphoryliert Phospholamban, ein Membranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums. Dieses hemmt im dephosphorylierten Zustand die SERCA, eine Ca^{2+} -ATPase, die für die Ca^{2+} -Sequestrierung im sarkoplasmatischen Retikulum zuständig ist. Nach der Phosphorylierung von Phospholamban entfällt die Inhibition der SERCA, und es kommt zu einer erhöhten Ca^{2+} -Sequestrierung in das sarkoplasmatische Retikulum. Gleichzeitig wird der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} nach intrazellulär gehemmt (Cohen et al, 1999). Ein weiterer Mechanismus führt ebenfalls zu einer niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration: Die PKG I phosphoryliert den IRAG, ein IP_3 -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat, das phosphoryliert zu einer Hemmung des IP_3 vermittelten

Ca²⁺-Ausstroms aus dem sarkoplasmatischen Retikulum führt. Die Aktivierung der PKG I führt zu einer erniedrigten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, die die für die Vasokonstriktion benötigte Bildung von Ca²⁺-Calmodulin-Myosinleichtketten in der glatten Muskulatur verhindert (Abb. 2) und in einer Vasodilatation resultiert. Neben diesen Mechanismen kommt es durch NO zu einer Aktivierung Ca²⁺-abhängiger K⁺-Känale, die auch zur Relaxation glatter Muskulatur führt (Gewaltig & Kojda, 2002).

1.1.2. NO-vermittelte Thrombozyten-Aggregationshemmung

Die durch NO vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation erfolgt nach Aktivierung der PKG I sowohl über die Bildung von cGMP als auch über die cGMP-vermittelte Bildung von cAMP durch die PKA (Schmidt et al, 1993).

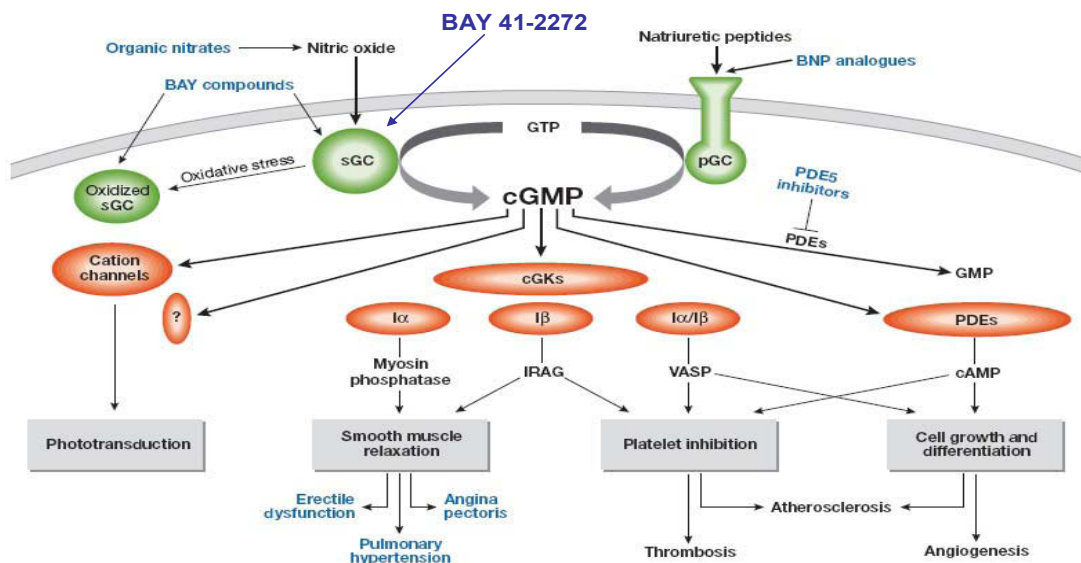


Abb.2: NO-sGC-cGMP- Signalweg: BAY 41-2272 stimuliert direkt die sGC mit Erhöhung der cGMP Levels. cGMP aktiviert unterschiedliche Proteinkinase. Die PKG vermittelt die glatte muskuläre Relaxation und die Plättchenhemmung mit einer Phosphorylierung von VASP. cGMP wird über PDEs zu GMP abgebaut.

Blau: Pathologien, die bei einer eingeschränkten/ funktionsuntüchtigen glattmuskulären Relaxation auftreten

Abb.2: modifiziert nach Feil, Harper, 2006

Ähnlich wie bei der Vasorelaxation kommt es zu einer erhöhten Ca²⁺-Sequestration durch die durch Phospholamban aktivierte sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase (SERCA), d.h. die intrazellulären Ca²⁺-Spiegel fallen ab und führen zur Inhibition

der Aggregation (Schmidt et al, 1993). Die über den cGMP/cAMP Signalweg vermittelte Hemmung der Aggregation ist mit der Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoprotein VASP assoziiert, einem fokalen Adhäsions- und Mikrofilament-assoziiertem Protein (Abb. 2), das eine Verbindung zwischen dem Signaltransduktionssystem und der Zellmotilität darstellt (Abel et al, 1995) (Markert et al, 1996).

1.1.3. Endotheliale Dysfunktion

Eine Reihe von Herzkreislauferkrankungen sind mit einer Beeinträchtigung des NO-sGC-cGMP-Signalweges assoziiert. Diese Beeinträchtigung wird als 'endotheliale Dysfunktion' zusammengefasst. Die endotheliale Dysfunktion geht mit der Verminderung der Endothel-abhängigen vasodilatierenden Antwort auf NO einher. Durch das Fehlen von NO kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen vasodilatierenden und vasokontrahierenden Faktoren (Ruetten et al, 1999), die durch die erniedrigte NO-Bioverfügbarkeit oder durch die erniedrigte NO-Produktion in der Gefäßwand zustande kommt (Kinlay & Ganz, 1997) (Kojda & Harrison, 1999) (Guzik et al, 2000) (Gewaltig & Kojda, 2002). Die Gründe für die erniedrigte NO-Produktion und / oder erniedrigte NO-Bioverfügbarkeit sind multifaktoriell. Freie Radikale können über unterschiedliche Mechanismen die NO-Bioverfügbarkeit senken (Wilcox et al, 1997) (Cai & Harrison, 2000). Zudem können wichtige Schlüsselenzyme des NO-sGC-cGMP-Signalweges, z.B. die Hämgruppe der sGC, durch freie Radikale oxidiert und dadurch unempfindlich für NO gemacht werden (Stasch et al, 2006). Klinisch zeigt sich, dass die endotheliale Dysfunktion mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert ist oder ihre Entstehung begünstigt. Eindrucksvoll konnten Huang und Mitarbeiter im Jahre 1995 die Effekte eines NO-Mangels nachweisen. So hatten NO-Synthase 'knock-out' Mäuse einen deutlich erhöhten systolischen Blutdruck (Huang et al, 1995). Damit wurde gezeigt, dass der endogenen NO-Produktion eine entscheidene Bedeutung bei der Regulation des Blutdruckes zukommt.

Die Hypertonie ist ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Myokardinfarkt oder Apoplex. Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, wie die koronare Herzkrankheit, sind mit einer erhöhten Radikalbildung (O_2) assoziiert

(Kojda & Harrison, 1999) (Guzik et al, 2000) und stellen in den westlichen Industrieländern im Erwachsenenalter nach wie vor die häufigste Todesursache dar.

Laut Todesursachen-Statistik des Statistischen Bundesamts des Jahres 2006 ist in Deutschland nahezu jeder Zweite an den Folgen einer Herz-Kreislauf-erkrankung verstorben, z.B. an einer instabilen Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen mit daraus resultierendem plötzlichem Herztod, einem akuten Myokardinfarkt oder an einer Herzinsuffizienz. Der akute Myokardinfarkt als Folge einer Herz-Kreislauf-erkrankung spielt mit 8 % aller Todesursachen eine herausragende Rolle. Dabei litt ein Großteil der Verstorbenen an einer arteriellen Hypertonie und 75 % aller hospitalisierten Patienten an einer Fettstoffwechselstörung. Viele Patienten hatten zusätzliche Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Rauchen und Übergewicht.

Die Therapie der Herz-Kreislauf-erkrankungen ist also von großer Bedeutung für den Großteil der westlichen Bevölkerung. Dabei stützt sich die Therapie der Herz-Kreislauf-erkrankungen auf medikamentöse und nicht-medikamentöse Therapieansätze, wie z.B. auf Änderungen der Lebensgewohnheiten: Gewichtsreduktion, Nikotinkarenz, ausgewogene, fett- und salzarme Ernährung.

1.1.4. Therapie mit organischen Nitraten

Ein lange etablierter medikamentöser Therapieansatz besteht in der Anwendung von Nitroglycerin. Es wird seit über 140 Jahren zur Therapie der Angina pectoris angewandt und ist somit eines der ältesten Herz-Kreislauf-Präparate (Brunton, 1867).

Die Wirkung organischer Nitrate beruht auf der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Diese Substanzen setzen nach enzymatischer Konversion NO frei, das über die Aktivierung der sGC-cGMP-PKG I Signalkaskade die Vasodilatation vermittelt (Abb. 2). Sie bewirken vor allem eine venöse Dilatation. Das 'venous pooling' bewirkt durch einen geringeren venösen Rückstrom zum Herzen eine Vorlastsenkung. Dadurch kommt es zu einer Reduktion des linksventrikulären Füllungsdruckes, der Wandspannung und des Sauerstoffbedarfes. Die arterielle Wirkung der Nitrate besteht in einer Dilatation der Koronararterien und damit einem verbesserten Sauerstoff-Angebot. In hohen Dosen haben Nitrate auch eine

Einleitung

Nachlast-senkende Wirkung, die ebenfalls zu einer Verminderung des myokardialen Sauerstoffverbrauches führt. Diese Wirkung ist allerdings unerwünscht, denn eine Dilatation im arteriellen Schenkel des Kreislaufsystems kann durch Senkung des Blutdruckes zu einer Orthostasereaktion mit kompensatorischem Herzfrequenzanstieg und konsekutiv erhöhtem Sauerstoffverbrauch führen.

Bis heute sind organische Nitrate, wie z.B. Nitroglycerin, Isosorbiddinitrat und Isosorbidmononitrat, neben β -Rezeptorenblockern und Calciumkanal-Antagonisten, Standardtherapeutika zur Behandlung der Angina pectoris.

Trotz der positiven Effekte ist der Einsatz der meisten Vertreter der organischen Nitrate durch das Auftreten des sogenannten Nitratkopfschmerzes und der raschen Entwicklung einer Nitrattoleranz bei wiederholter Gabe limitiert. Dabei kommt es zu einer Desensibilisierung der Gefäße auf den vasorelaxierenden NO-Reiz und somit zu einem Wirkungsverlust.

Der Mechanismus der Toleranzentstehung ist noch nicht vollständig geklärt. Einen Erklärungsansatz stellt die Beobachtung von Chen und Mitarbeitern (2002) dar, nach dem der Nitrattoleranz eine verminderte metabolische Aktivierung von Glyceroltrinitrat durch die mitochondriale Aldehyddehydrogenase in glatten Muskelzellen zugrunde liegt. Nach weiteren Erklärungsansätzen kommt es bei Anwendung ausgewählter Nitrate zur Verminderung der Bioverfügbarkeit von cGMP, z.B. durch eine herabregulierte Aktivität der sGC (Soff et al, 1997), oder aber durch die erhöhte Aktivität cGMP-abbauender PDEs. Die Herabregulierung der PKG führt dann zu einer Verringerung der cGMP-vermittelten Effekte. Die bei der Therapie mit organischen Nitraten erhöhte Bioverfügbarkeit von freien Radikalen, wie O_2^- , stellt einen weiteren Erklärungsansatz für die verminderte sGC-Aktivität, des Schlüsselenzyms des NO-sGC-cGMP-Signalweges, in Bezug auf die Ansprechbarkeit auf Glyceroltrinitrat dar (Artz et al, 2002). Weiterhin steht die vor allem durch Glyceroltrinitrat vermehrte Radikalbildung in Verdacht, die NO-Synthasen in ihrer Funktion zu entkoppeln und somit die NO-Bioverfügbarkeit zu vermindern. Zusätzlich könnten freie Radikale zur Bildung schädlicher Produkte führen, wie z.B. Peroxinitrit, die verheerende Folgen für die Zellen haben (Gori & Parker, 2002).

Die Anwendung von Nitraten ist limitiert und zunehmend problematisch, weil Nitrate neben der Toleranzentwicklung zu oxidativem Stress in der Zelle beitragen (Stasch et al, 2006) und andere Proteine in ihrer Funktion durch Nitrosilierung oder Interaktion mit Metallen beeinträchtigen können (Hess et al, 2005).

Die Assoziation der Herz-Kreislaufkrankungen mit endothelialer Dysfunktion fordert medikamentöse Strategien, die trotz des beeinträchtigten NO-sGC-cGMP-Signalweges, durch z.B. eine gezielte Aktivierung der einzelnen Komponenten, eine potente Wirkung innerhalb der NO-sGC-cGMP-PKG I Signalkaskade besitzen oder zu einer deutlichen Verbesserung führen.

Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die Identifikation eines NO-unabhängigen Stimulators der sGC im Jahr 1994 durch Ko und Mitarbeiter für großes Interesse sorgte und den Anstoß für intensive Forschung bezüglich neuer Aktivatoren und Stimulatoren der sGC gab, die die Probleme der meisten organischen Nitrate umgehen und ihre positiven therapeutischen Effekte erhalten, erweitern oder sogar verbessern konnten (Ko et al, 1994).

1.2. BAY 41-2272: NO-unabhängiger und Häm -abhängiger Stimulator der löslichen Guanylatcyclase

Ko und Mitarbeiter identifizierten 1994 mit YC-1 einen Thrombozyten-Aggregationshemmer, der seine Wirkung über eine cGMP-Erhöhung in den Thrombozyten entfaltet. Sie beschrieben YC-1 als direkten Aktivator der sGC. In nachfolgenden Arbeiten wurde gezeigt, dass YC-1-unabhängig aber synergistisch mit NO die sGC stimuliert und zu einer Relaxation von mit Phenylephrin vorkontrahierten aortalen Ringe führt (Friebe, 1996) (Mulsch et al, 1997). Anhand dieser Leitstruktur gelang es 2001, mit BAY 41-2272 einen neuen, potenten, *in-vitro* und *in-vivo* NO-unabhängigen und Häm-abhängigen sGC Stimulator herzustellen (Stasch et al, 2001).

Die sGC, das Schlüsselenzym der NO-Signaltransduktion, kommt in einzelnen Geweben in unterschiedlichen Untereinheiten vor. Die in der Gefäßmuskulatur vorkommende sGC ist ein Heterodimer und besteht aus der α_1 -, β_1 -Untereinheit und enthält eine N-terminale Häm-Bindungsdomäne (Koesling & Friebe, 1999). In

dieser Häm-Bindungsdomäne ist die prosthetische Hämgruppe enthalten, ein Porphyrinring mit einem zentralen Eisenatom, der von essentieller Bedeutung für die Bindung ihrer gasförmigen Liganden wie NO oder CO ist. Im Gegensatz zu NO, bindet BAY 41-2272 nicht an die Hämgruppe, sondern an die Cystein 238 und Cystein 243 Region der α_1 -Untereinheit der sGC (Stasch et al, 2001) (Becker, et al 2001). Obwohl BAY 41-2272 auch an die sGC α_2, β_1 -Isoform zu binden scheint (Koglin et al, 2002) (Nimmegeers et al, 2007), ist die für die Relaxation der Gefäßmuskulatur hauptsächlich verantwortliche Isoform die sGC α_1, β_1 . BAY 41-2272 benötigt, genau wie sein Vorläufer YC-1, die Hämgruppe und das darin enthaltene zweiwertige Eisen (Stasch et al, 2001). Das zeigten Versuche, in denen die Hämgruppe durch das Detergenz Tween-20 entfernt, oder bei denen das zweiwertige Eisen der Hämgruppe durch ODQ oxidiert wurde. Ohne Hämgruppe oder nach Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} war die Wirkung von BAY 41-2272 aufgehoben (Stasch et al, 2001) (Straub et al, 2001). BAY 41-2272 wurde somit als ein NO-unabhängiger und Häm-abhängiger Stimulator der sGC identifiziert. Die Stimulation der sGC kann synergistisch mit NO erfolgen und erstreckt sich über einen Konzentrationsbereich von 10 bis 100 nM (Stasch et al, 2001).

1.3. BAY 41-2272 Wirkungsprofil

Schon in der ersten publizierten Arbeit wurde dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 ein breites Wirkungsprofil zugeschrieben. Sein Vorläufer YC-1 zeigte sich als direkter Aktivator der thrombozytären sGC und führte zu einer Thrombozytenaggregationshemmung und einer Verlängerung der Blutungszeit *in-vivo* (Ko et al, 1994). Die für YC-1 beschriebene Eigenschaft wurde auch für BAY 41-2272 für gewaschene Thrombozytenkonzentrate beobachtet (Stasch et al, 2001). Allerdings scheint die Potenz von BAY 41-2272 zur Thrombozyten-Aggregationshemmung im proteinreichen Plasma stark reduziert zu sein, was es zu einer weniger gut geeigneten Substanz zur Thrombozytenaggregationshemmung machen würde (Hobbs, 2003). Oral verabreichtes BAY 41-2272 senkte in spontan hypertensiven Ratten dosisabhängig und langanhaltend den mittleren arteriellen Druck (Stasch et al, 2001) (Straub et al, 2002). Dieser antihypertensive Effekt wurde auch für transgene Mäuse, die ein zusätzliches Renin-Gen besaßen und bei denen nach

Einleitung

Gabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME der systolische Blutdruck anstieg, durch BAY 41-2272 ohne Toleranzentwicklung erzielt (Stasch et al, 2001). Auch in einer anderen Arbeit, in der die Hypertension bei Ratten durch L-NAME Gabe induziert wurde, wurde die antihypertensive Wirkung von BAY 41-2272 bestätigt (Zanfolin et al, 2006). Weiter wurde der durch L-NAME verursachte Anstieg des mittleren arteriellen Druckes, die konsekutive Myokardhypertrophie und der fibrotische Umbau des Myokardgewebes durch chronische BAY 41-2272 Gabe ebenfalls ohne Toleranzentwicklung vollständig aufgehoben. Die Myokardhypertrophie und die Verhinderung des fibrotischen Umbaus wurden in einem Angiotensin II-induzierten Hypertoniemodell der Ratte bestätigt (Masuyama et al, 2006).

Die Beobachtung, dass BAY 41-2272 bis zu einer Konzentration von 10^{-5} M keinerlei PDE V inhibierende Aktivität besitzt und die ansteigenden cGMP-Spiegel auf eine reine sGC Aktivierung zurückzuführen seien (Stasch et al, 2001) wird kontrovers diskutiert. So inhibierte BAY 41-2272 in einer Studie bei einer Konzentration von 3 μ M 50 % der PDE V (Mullershausen et al, 2004). Diese Beobachtung könnten erklären, warum es zu keiner Toleranzentwicklung kommt.

Die Anhebung und die mögliche Akkumulation von cGMP - durch die BAY 41-2272 vermittelte PDE V Hemmung - könnten zu schweren Nebenwirkungen wie Hypotension führen und damit BAY 41-2272 zu einer therapeutisch schlecht einsetzbaren Substanz machen. Diese Ergebnisse sind durch Bischoff und Stasch kritisch hinterfragt worden (Bischoff et al, 2004). Anders als Mullershausen konnten sie keinerlei PDE V-hemmende Aktivität bei einer Konzentration von 1 μ M, die die maximale sGC Stimulation *in-vitro* bedingt, für BAY 41-2272 feststellen. So wird die Frage, ob BAY 41-2272 die PDE V inhibiert und somit Einschränkungen zur Anwendung besitzt, weiterhin kontrovers diskutiert.

Neben der antihypertensiven *in-vivo* Wirkung wurde eine positive BAY 41-2272-Wirkung auch bei der chronischen Herzinsuffizienz und der akuten pulmonalen Hypertonie beobachtet. So senkte die Substanz bei einer durch Tachykardie erzeugten chronischen Herzinsuffizienz beim Hund (10 μ g / kg / min i.v.) den mittleren arteriellen Druck sowie den pulmonalarteriellen Druck aber nicht die Vorlast oder den rechtsatrialen Druck, wie es bei der Gabe von Nitroglycerin der Fall ist. Gleichzeitig stiegen das Herzminutenvolumen und der renale Blutfluss

(Boerrigter, 2003). Bei akuter pulmonaler Hypertension senkte inhaliertes BAY 41-2272 den pulmonalarteriellen Druck und den pulmonalvaskulären Widerstand. Es kam jedoch nicht zu einer Verbesserung der Oxigenierung (Evgenov et al, 2007).

Zusammenfassend zeigen *in-vitro* Untersuchungen mit der Vorgängersubstanz YC-1 an isolierten, mit Phenylephrin vorkontrahierten aortalen Gefäßringen eine Relaxation (IC₅₀-Wert von 10 µM). Im Vergleich inhibiert BAY 41-2272 mit einem IC₅₀-Wert von 0,3 µM deutlich potenter die Kontraktion aortaler Ringe (Straub et al, 2002). In nachfolgenden Arbeiten bestätigte BAY 41-2272 seine potenten vaso-relaxierenden Eigenschaften (Stasch et al, 2001) (Boerrigter, 2003) (Bawankule et al, 2005).

Arbeit Gew	ebe	Dosisspektrum	Intakt [logM]	Denudiert [logM]
Priviero et al, 2005	Aorta (Kaninchen)	0,01-10 µM	6,59±0,05	6,19±0,04
Teixeira et al, 2006	A. basilaris (Ratte)	0,0001-1 µM	8,13±0,03	7,63±0,05
Teixeira et al, 2006	A. mesenterica (Ratte)	0,0001-1 µM	8,21±0,05	6,75±0,06

Tab. 1: Übersicht zur aktuellen Datenlage im Hinblick auf die Wirkung von BAY 41-2272 in arteriellen Gefäßen in Organbadversuchen.

Außerdem wirkt BAY 41-2272 sowohl in endothelhaltigen als auch denudierten Gefäßen. Die Wirkung in denudierten Gefäßen ist allerdings deutlich reduziert (Tab.1) (Priviero et al, 2005) (Teixeira et al, 2006) (Teixeira et al, 2006). Nach *in-vivo* Versuchen entwickelt BAY 41-2272 mögliche therapeutische Optionen bei der arteriellen und pulmonalen Hypertonie und gleichzeitig als Thrombozyten-Aggregationshemmer.

Der Wirkmechanismus und die Signalkaskade, die die NO-abhängige Vasodilatation vermittelt, sind weitgehend aufgeklärt (Abb. 2). Die durch BAY 41-2272 vermittelte Vasodilatation ist ab dem Punkt der direkten, NO-unabhängigen Stimulation der sGC, mit der NO-vermittelten Signalkaskade identisch. Dennoch bleibt die Frage offen, inwieweit in der Vene nach BAY 41-2272-Stimulation cGMP-

unabhängige Mechanismen ebenfalls zu einer Relaxation führen. In der ersten Arbeit zu BAY 41-2272 (Stasch et al, 2001) wurde gezeigt, dass die Vorinkubation mit ODQ, einem irreversiblen Inhibitor der sGC, einen vollständigen Wirkungsverlust von BAY 41-2272 zur Folge hatte. Hingegen konnten einige andere Arbeiten zeigen, dass ODQ zu keiner vollständigen Inhibition der BAY 41-2272 Wirkung führte (Bawankule et al, 2005) (Priviero et al, 2005) (Teixeira et al, 2006) (Teixeira et al, 2006), so dass diese Beobachtungen die Vermutung zuließen, dass es neben der cGMP-vermittelten Vasodilatation auch andere, davon unabhängige, Mechanismen geben muss.

1.4. Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein

Das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) wurde erstmalig als wichtiges Substrat der PKA und der PKG entdeckt und charakterisiert (Waldmann et al, 1987) (Halbrugge, Walter, 1989). VASP gehört zur Familie der prolinreichen Proteine. Es wird in vielen Geweben exprimiert (Reinhard et al, 1992), kommt vor allem in hoher Konzentration in Thrombozyten und in glatten Muskelzellen vor (Markert et al, 1996) und wird sowohl durch die NO-abhängige PKG I als auch durch die PKA phosphoryliert (Abb. 2). Es ist ein fokales Adhäsionsprotein, das an Aktin bindet und mit Zell-zu-Zell-Kontakten assoziiert ist. Als Bestandteil des Zytoskelettes (Reinhard et al, 1992) wird es u.a. für die Zellmotilität in Thrombozyten mitverantwortlich gemacht.

Die VASP-Phosphorylierung kann als Antwort auf cGMP-erhöhende Substanzen, wie z.B. NO, und auf cAMP-erhöhende Substanzen beobachtet werden, wie z.B. bei der Anwendung von Inhibitoren der Thrombozytenaggregation (Waldmann et al, 1987). Zudem findet sich eine sehr hohe Protein-Konzentration in Endothelzellen und der Gefäßwand von Arterien und Venen, wobei seine Funktion im Gefäß unklar bleibt. Versuche mit VASP-defizienten Mäusen ergaben keine Beeinträchtigung der glattmuskulären Gefäßkontraktion (Ibarra-Alvarado et al, 2002) (Aszodi et al, 1999).

VASP besitzt drei Phosphorylationsstellen, Serin 157, Serin 239 und Threonin 278. Die Serinstellen werden mit unterschiedlicher Präferenz in *in-vitro* und in Thrombozyten von der PKA und PKG I phosphoryliert und von der Protein-Phos-

phatase I und II dephosphoryliert (Butt et al, 1994) (Abel et al, 1995) (Smolenski et al, 1998). Die Phosphorylierung am Serin 157 erfolgt durch beide Proteinkinasen, vornehmlich aber durch die PKA. Die Phosphorylierung wird durch eine Verschiebung von 46 kDA zu 50 kDA im SDS-Polyacrylamid Gel sichtbar (Butt et al, 1994). Die Serinstelle 239 wird zum größten Teil von der PKG I phosphoryliert (Butt et al, 1994). Die PKG I vermittelt die NO-induzierte Relaxation (Pfeifer et al, 1999). Da die PKG I in den meisten Zellen nur in geringer Konzentration vorliegt und somit kaum nachzuweisen ist, wurde nach einem anderen Marker für die Aktivität der PKG I gesucht. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 16C2 konnte die Serinstelle 239 von VASP in intakten Zellen nachgewiesen werden. Damit war ein geeigneter Marker entwickelt, um die PKG I Aktivität in intakten Zellen darzustellen (Smolenski et al, 1998). Die vermehrte Phosphorylierung von VASP an Serin 239 kann als Indikator für eine Aktivierung des NO-sGC-cGMP PKG I Signalweges verwendet werden. Tatsächlich kam es nach Zugabe von BAY 41-2272 bei Thrombozyten zu einer vermehrten Phosphorylierung (Hobbs, 2003).

1.5. Ziel der Studie

Die meisten Arbeiten beschreiben BAY 41-2272 als reinen arteriellen Dilatator. Einige Arbeiten sprechen dieser Substanz eine Wirkung an venösen Gefäßen vollkommen ab oder bestätigen sie nur unter unphysiologisch hohen Dosen (Boerrigter, 2003) (Boerrigter, Burnett, 2007). Eine Wirkung im venösen System würde BAY 41-2272 im hämodynamischen Wirkungsprofil dem der organischen Nitrate annähern und es somit für den Einsatz bei Herz-Kreislaufkrankungen attraktiver machen.

Im Anschluss an die vorliegenden Ergebnisse zu der Wirkung von BAY 41-2272 an endothelhaltigen als auch denudierten Arterien von Versuchstieren (Tab. 1), sollte in der vorliegenden Arbeit auch die Wirkung an endothelhaltigen humanen Venen *in-vitro* untersucht werden. Zusätzlich sollte mit den *in-vitro* Versuchen ermittelt werden, inwieweit BAY 41-2272 bei endothelialer Dysfunktion wirkt. Dazu wurde die endotheliale Dysfunktion durch Denudation der Venen simuliert. Mit der Entfernung der Endothelzellen entfällt der Produktionsort von NO (Abb. 1). Die NO-Konzentration wird gesenkt und ein Zustand verminderter NO-Bioverfügbarkeit simuliert, wie er bei der endothelialen Dysfunktion auftritt. Desweiteren soll in

dieser Arbeit ermittelt werden, ob es in humanen Venen zu einer cGMP-unabhängigen Vasodilatation durch BAY 41-2272 kommt, oder ob die Vasodilatation durch BAY 41-2272 in humanen Venen ausschließlich über den NO-sGC-cGMP-PKG I Signalweg vermittelt wird. Um dieser Fragestellung nachzugehen, erfolgen Dosis-Wirkungsversuche mit BAY 41-2272, mit und ohne Zugabe von ODQ, einem irreversiblen Inhibitor der sGC, eines Schlüsselenzyms des NO-cGMP-PKG I-Signalweges. Eine Methode, um die Integrität und Aktivität des NO-sGC-cGMP-PKG I-Signalweges beurteilen zu können, stellt die Western Blot Analyse von VASP und seinen einzelnen Phosphorylationsstellen dar (Musch et al, 2001) (Schulz et al, 2002). Zudem soll ermittelt werden, ob die Inkubation von humanen Venen mit BAY 41-2272 zu einer Phosphorylierung von VASP am Serin 239 führt und damit einen indirekten Beweis erbracht werden, dass BAY 41-2272 über die Aktivierung der PKG vasodilatierend wirkt.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsobjekte

Die Untersuchungen erfolgten an humaner Vena saphena magna. Diese Venen stammten von Patienten der Thorax- und Kardiovaskulären Chirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, bei denen eine elektive Bypass-Operation im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit durchgeführt wurde. Das Einverständnis der Ethikkommission lag vor, ebenso wie das präoperativ eingeholte schriftliche Einverständnis der Patienten nach einem Aufklärungsgespräch. Eine Differenzierung der Venen nach Erkrankung und Medikation des Spenders wurde nicht vorgenommen.

2.2. Chemikalien, Pharmaka, Reagenzien

2.2.1. Stimulator der löslichen Guanylatcyclase: BAY 41-2272

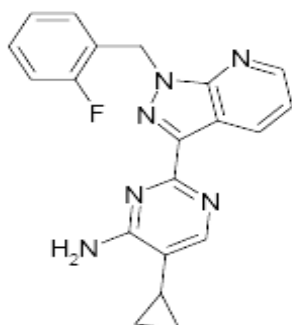
BAY 41-2272 (BAY [3-(4-Amino-5-cyclopropyl)pyrimidine-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine]

Molekulargewicht: 360,397

Löslichkeit in DMSO: 1 mg/ml

Firma: Bayer, Wuppertal

Bay 41-2272



2.2.2. Vasodilatoren

Acetylcholin (ACh)

Firma: Sigma, Deishofen

Material und Methoden

2.2.3. Vasokonstriktoren

Kaliumchlorid (KCl)

Firma: Sigma, Deishofen

Phenylephrin (PE)

Firma: Sigma, Deishofen

2.2.4. Andere

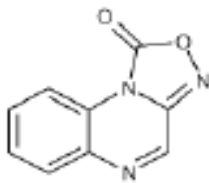
DMSO

Firma: Sigma, Deishofen

2.2.5. Inhibitor der sGC: ODQ

ODQ

[1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]



2.2.6. Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer 6 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer;
pH: 7,4

Fixierlösung K₂SO₅ 10 g/l, Na₂S₂O₃* 5H₂O 200 g/l

Hepes-Puffer (in mM) 4,69 KCl; 1,03 KH₂PO₄; 99,01 NaCl; 25 NaHCO₃;
1,87 CaCl₂ • 2H₂O; 1,2 MgSO₄ • 7H₂O;
20 Na-Hepes; 11,1; D-Glukosemonohydrat;
pH 7,35-7,45

Material und Methoden

<i>Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer; in mM)</i>	K ⁺ 5,87; Na ⁺ 143,07; Cl ⁻ 125,96; Ca ²⁺ 1,6; Mg ²⁺ 1,18; HCO ₃ ⁻ 25; H ₂ PO ₄ ⁻ 1,18; SO ₄ ²⁻ 1,18; Glukose 5,05; pH 7,09; Der pH-Wert der mit Carbogen (O ₂ /CO ₂ , 95/5, V/V) begasten Nährlösung lag zwischen 7,35 und 7,40; die Organbadtemperatur wurde bei 37 °C konstant gehalten
<i>PBS-Puffer (in mM)</i>	2,7 KCl; 1,8 KH ₂ PO ₄ ; 140 NaCl; 10 Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; pH 7,4
<i>Probenpuffer</i>	440 µl Probenpuffer (50 mM Tris, 2 % SDS), 60 µl β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau
<i>RIPA-Puffer (in mM)</i>	50 Tris/HCl; 150 NaCl; 1 % NP 40; 0,25 % Natriumdeoxycholat; 1 EDTA; 1 Natriumvanadat; 1 NaF; 1 PMSF; 1 Na-Orthovanadat; 2 µg/ml Leupeptin, Pepstatin, 5 µg/ml Aprotinin oder Proteaseninhibitorcocktail (Roche, Basel), pH 7,4
<i>4,5 % Sammelgelpuffer</i>	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
<i>Stripping-Puffer</i>	5 mM TRIS (2 % SDS), 150 µl β-Mercaptoethanol
<i>Tank-Blotting-Puffer (1 l)</i>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
<i>TBST-Puffer (1 l)</i>	20 mM Tris, 8 g/l NaCl, 1 ml Tween 20; pH: 7,6
<i>10 % Trenngelpuffer</i>	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
<i>Western-Blot-Puffer</i>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % MeOH; pH 8,5 (MeOH wurde erst am Versuchstag hinzugegeben), Der Puffer wurde bis zum Gebrauch kalt gelagert.

2.2.7. Antikörper

VASP P-Ser239 Antikörper:

- Primärer Antikörper: Anti-VASP P-Ser239
(16 C2, Alexis Biochemicals, ALX 804-240), 1:1000
- Sekundärer Antikörper: Goat anti-mouse IgG, POD-konjugiert
(BioRad 170-6516), 1:5000

Gesamt VASP Antikörper:

- Primärer Antikörper: Anti-total VASP
(Alexis Biochemicals, ALX-210-880), 1:2000
- Sekundärer Antikörper: Goat anti-rabbit IgG, POD-konjugiert
(Calbiochem. 401315)

2.2.8. Gele

- 10 % Trenngel:* 30 % Acrylamid, Trenngelpuffer (4 x), A. bidest,
10 % APS, TEMED
- 4,5 % Sammelgel:* 30 % Acrylamid, Sammelgelpuffer (10 x), A. bidest,
10 % APS, TEMED

2.3. Versuchsaufbau

Die isolierte Organbadapparatur (IOA-5301; Fa. Föhr Medical Instruments, Seeheim) bestand aus folgenden Teilen (Abb. 3):

- Vier doppelwandige Organbäder aus Glas (10 ml Füllvolumen)
- Ein Umlaufthermostat (Typ DC 3, Fa. Haake) mit Wasserbad (Typ W 13, Fa. Haake), das die Temperatur der Nährlösung bei konstant 37 °C hielt
- Vier Fritten zur Begasung der Organbäder
- Eine Fritte in der 37 °C warmen, doppelwandigen, gläsernen Vorratssäule zur Begasung der Nährlösung
- Eine individuell regelbare Oxigenierung für jedes Organbad über Ventile
- Ein Mikroprozessor Handschaltpult für die Regulierung der Badspülung im Leersaug- oder Durchlaufverfahren
- Ein Vorratskanister (10 l) mit Nährlösung
- Eine Förderpumpe

Material und Methoden

- Ein Abwasserbehälter (10 l), in dem verbrauchte oder mit Versuchssubstanzen vermischte Nährlösung mit Hilfe einer Vakuumpumpe aus den Organbädern abgelassen wurde
- Vier höhenverstellbare Positionierelemente für Organarm mit Haken (Messung isotonisch und isometrisch) und Transducer
- Vier Kraftaufnehmer mit Haken, die mit dem Transducer verbunden waren, zum Einspannen der Gefäße
- Ein PC mit dem Programm Chart 5.2.1 (Chart, Power Lab, ADInstruments) zur graphischen Darstellung, Aufzeichnung und Auswertung der Messungen

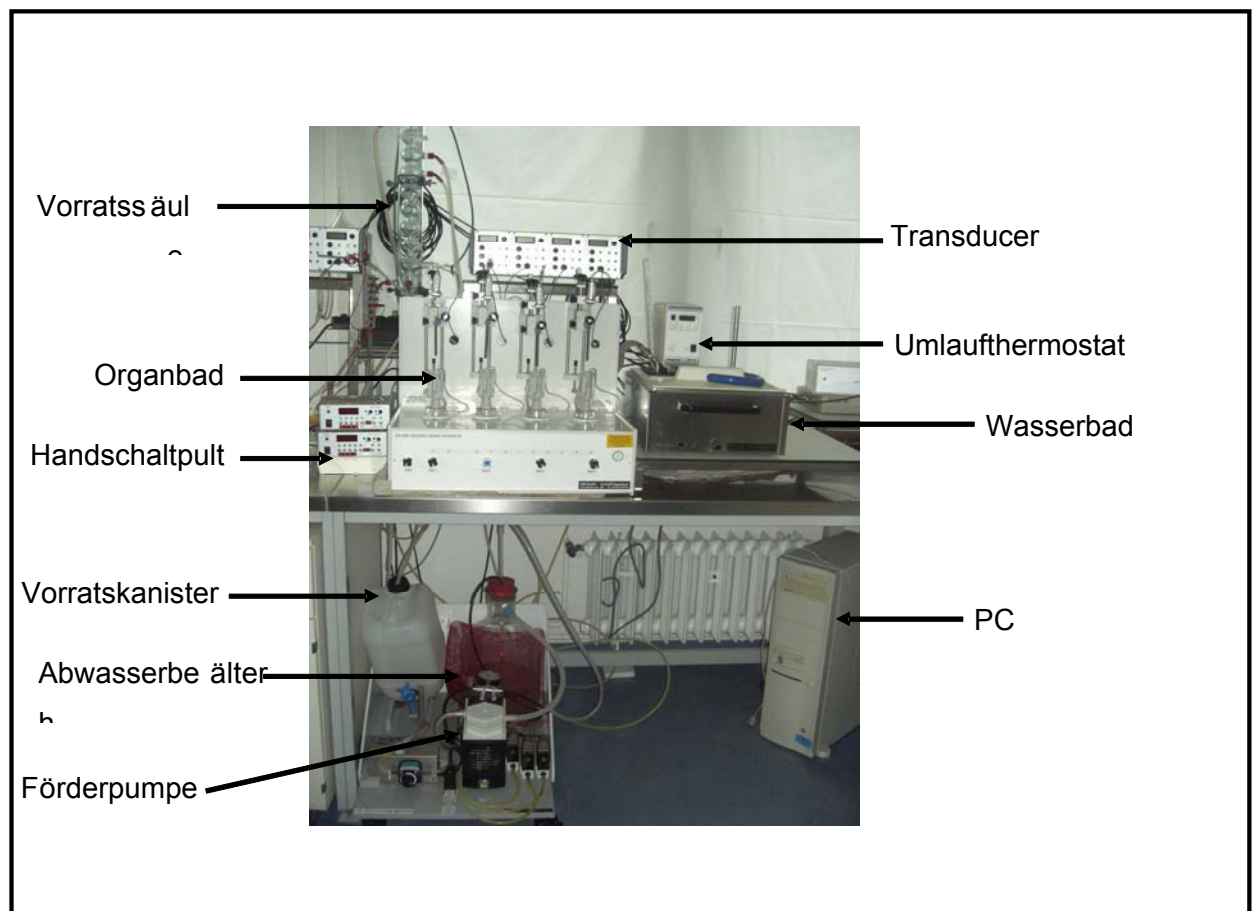


Abb. 3: Foto der isolierten Organbadapparatur IOA 5301 der Firma FMI

2.4. Versuchsablauf

Vor dem Gang in den Operationssaal wurde die Organbadanlage für den Versuchstag vorbereitet. Damit wurde u.a. eine physiologische Temperatur von 37 °C für das Wasserbad und die Nährlösung (Krebs-Henseleit-Puffer; KHP) sicher gestellt. Der KHP wurde für jeden Versuchstag neu angesetzt, in das Organbad

gefüllt und mit Carbogen begast. So erreichte der Puffer die ideale Temperatur (37 °C), den idealen pH (7,4) und einen idealen Begasungszustand.

Danach erfolgten für jede Versuchsreihe die gleichen Abläufe. Sie werden im Folgenden beschrieben.

2.4.1. Präparation

Die linke Vena saphena magna wurde von kaudal, am Malleolus medialis beginnend, nach kranial bis maximal zum Hiatus saphenus von einem Herzchirurgen herauspräpariert. Die Vene wurde mit heparinierter Kochsalzlösung gespült und bis zu ihrem Einsatz am Herzen in dieser gekühlten Lösung aufbewahrt. Nachdem vom jeweiligen Herzchirurgen die für den aorto-koronar-venösen Bypass benötigte Länge festgelegt war, wurden die nicht benötigten Reststücke (1 - 5 cm) unmittelbar im gekühlten PBS-Puffer in das Versuchslabor transportiert. Hier wurden sie in Hepes-Puffer gelegt, anhängende Gewebereste wurden abpräpariert, vermessen und in 3 bis 5 mm breite Ringe geschnitten.

2.4.2. Kalibrierung

An jedem neuen Versuchstag wurden die Transducer kalibriert. Das Auswertungsprogramm (Chart 5.2.1; Power Lab; California) zeigte von jedem Kraftaufnehmer die aktuelle Ausgangskraft an. Diese wurde zunächst mit Hilfe des Programms auf den Ausgangswert '0' korrigiert. Danach wurde an jeden Kraftaufnehmer ein Gewicht von 1 g gehängt. Diese Gewichtskraft wurde 10 mN gleichgesetzt und im PC abgespeichert.

2.4.3. Einhängen und Äquilibration

Die Gefäßringe wurden zwischen Kraftaufnehmer und dem Haken des Organarms eingespannt und sofort in die mit KH-Puffer befüllten, begasten und erwärmten Organbäder eingelassen (Abb. 4). Das Einspannen und das vorherige Präparieren geschahen mit größter Vorsicht, um das Endothel der Venen nicht zu beschädigen. Danach erfolgte eine 30- bis 45-min Äquilibrationsphase an eine Ausgangskraft von 12,5 mN. Dieses Vorgehen galt einheitlich für alle folgenden Versuchsreihen. Die Äquilibrationsphase wurde beendet und mit den Versuchen begonnen, wenn die Kraft von 12,5 mN konstant über 3 min eingehalten wurde.

Zudem wurde die Ausgangskraft nach jedem Versuch und jeder Spülung des Organbads mit frischem KH-Puffer nachjustiert.

2.5. Funktionstests

2.5.1. Kontraktionstest mit Kaliumchlorid

Die Venenringe wurden im Anschluss an die Äquilibrationsphase zunächst auf ihre glattmuskulären kontraktile Eigenschaften überprüft. Dafür wurde die KCl-Konzentration im Organbad auf 80 mM erhöht. Durch die Depolarisation erfolgte eine Kontraktion. Gefäße, die keine Kontraktion zeigten, wurden verworfen ($n = 20$). Die Venen mit einer positiven Reaktion wurden nach zweimaliger Durchführung des Kontraktionstestes mehrmals mit KH-Puffer gespült und erneut an die Ausgangskraft von 12,5 mN äquilibriert.

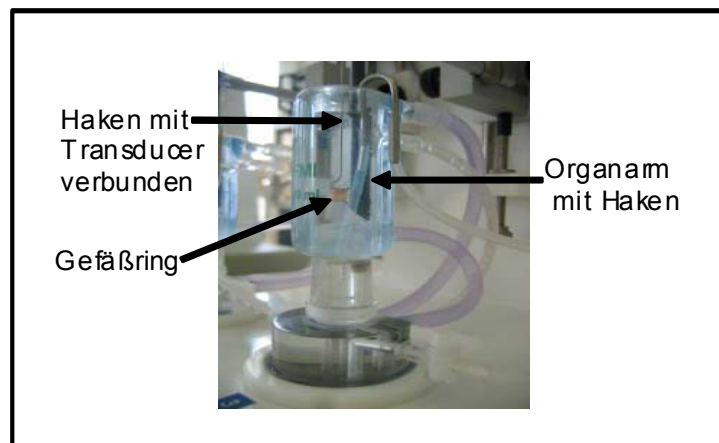


Abb. 4: Einzelnes Organbad mit eingespannter Vene

2.5.2. Kontraktionstest mit Phenylephrin

Die mit KCl getesteten Venen wurden nun mit 1 μ M Phenylephrin (PE) stimuliert, das über glattmuskuläre α_1 -Rezeptoren eine Kontraktion auslöst. Die Venen, die keine Kontraktion zeigten, wurden ebenfalls von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Dies traf auf 5 von 32 Venen zu.

2.5.3. Dilatationstest mit Acetylcholin

Im Anschluss an die Vorkontraktion mit 1 μ M PE wurden an insgesamt 15 Venen kumulative Dosiswirkungskurven mit ACh (1 nM – 1 mM) durchgeführt, um für den

Endotheltest eine halbmaximale Dilatation nach Vorkontraktion (EC_{50}) mit PE bestimmen zu können.

2.5.4. Endotheltest mit Acetylcholin

Die endothelabhängige Dilatation wurde mit $1 \mu\text{M}$ ACh getestet. ACh vermittelt über die Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor die Freisetzung von NO aus intaktem Endothel und damit eine Dilatation. Die Gefäße wurden zuerst mit $1 \mu\text{M}$ PE vorkontrahiert, um die anschließende Dilatation durch ACh sichtbar zu machen. Gefäße, die keine Dilatation oder sogar eine Kontraktion zeigten, wurden von weiteren Versuchsreihen ausgeschlossen. Dies traf auf 7 von 32 Venen zu.

2.5.5. Dilatationstest mit BAY 41-2272

Die dilatative Wirkung von BAY 41-2272 wurde kumulativ von $0,01 \text{ nM}$ bis $10 \mu\text{M}$ getestet, wobei insgesamt 4-6 Ringe einer Vene drei Protokollen zugeteilt wurden. In der ersten Gruppe erfolgte an zwei Ringen die Entfernung des Endothels (Denudation), indem sie ca. 30 s in A. destillata geschwenkt wurden. Die Effektivität der Denudation wurde durch Mitarbeiter der Tierversuchsanstalt Düsseldorf bestätigt, die die Ringe lichtmikroskopisch untersuchten. In der zweiten Gruppe wurden zwei Ringe in ihrer Ausgangssituation belassen, und in der dritten Gruppe wurden zwei weitere Ringe 30 min vor BAY 41-2272 mit ODQ ($10 \mu\text{M}$), einem irreversiblen Blocker der sGC inkubiert. In weiteren Versuchen diente der Dilatationstest mit $1 \mu\text{M}$ ACh der Überprüfung des Endothelstatus, d.h. Venen verfügten über kein funktionsfähiges Endothel, wenn sie nach ACh keine Dilatation zeigten.

Nach Durchführung der Funktionstests (KCl-Test \rightarrow PE-Test \rightarrow ACh-Test) erfolgten die weiteren Versuche mit BAY 41-2272 an intakten ($n=12$), denudierten ($n=7$) oder mit ODQ inkubierten intakten ($n=7$) Gefäßen (Abb. 5). Dabei wurden die Ringe wieder mit $1 \mu\text{M}$ PE vorkontrahiert, um die durch BAY 41-2272 hervorgerufene Dilatation als Kraftabnahme sichtbar zu machen.

2.6. Western Blot

Zusätzlich zu den Funktionstests im Organbad wurde eine quantitative Proteinanalyse an den humanen Venen durchgeführt. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob die BAY 41-2272-Effekte über den NO-sGC-cGMP-PKG I-Signaltransduktionsweg vermittelt werden. Dazu wurde mittels Western Blot das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) nachgewiesen, das u.a in der glatten Gefäßmuskulatur vorkommt (Schulz et al, 2002).

Dieses Protein stellt ein Produkt des NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweges dar. Es wird sowohl durch die Proteinkinase A als auch durch die Proteinkinase G I phosphoryliert (Schäfer et al, 2003). Dabei wird die vermehrte Aktivität der Proteinkinase A durch die VASP-Phosphorylierung an Serin 157 im SDS-Polyacrylamid Gel sichtbar, während die Aktivierung der Proteinkinase G I durch die Phosphorylierung von VASP an Serin 239 gemessen und durch einen monoklonalen Antikörper (16C2) sichtbar gemacht werden kann (Smolenski et al, 1998). Der 16C2 Antikörper wurde in dieser Arbeit benutzt, um die Aktivierung des NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweges durch BAY 41-2272 in humaner Vena saphena magna nachzuweisen.

2.6.1. Durchführung

Die quantitative Proteinanalyse erfolgte an 9 Venen. Auch diese Venen wurden in gekühltem PBS-Puffer aus dem Operationssaal direkt in das Labor transportiert. Anhängende Gewebeteile wurden ebenfalls abpräpariert und die Vene in zwei bis vier Ringe unterteilt. Ein bis zwei der Ringe wurden 30 min lang in den mit KH-Puffer gefüllten, 37 °C warmen und mit Carbogen begasten Organbädern mit 3 µM BAY 41-2272 inkubiert. Parallel dazu wurden ein bis zwei Ringe als Kontrolle eingespannt, d.h. ohne Inkubation mit BAY 41-2272 (Vehikel). Anschließend wurden sie in mit 'BAY 41-2272' oder 'Vehikel' gekennzeichneten Eppendorfgefäßen in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Insgesamt wurde so mit 18 Proben (n=9 inkubiert vs. n=9 nicht inkubiert) aus 9 Gefäßen vorgegangen.

2.6.2. Lyse und Homogenisierung der Venen

In einem ersten Arbeitsschritt erfolgte die Lyse und Homogenisierung aller bis dahin tiefgefrorenen Venen-Proben (n=18). Dazu wurde das Gewebe in Aluminiumpapier eingewickelt und dann mit einer in Stickstoff vereisten Zange in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff für 1 min inkubiert, mechanisch homogenisiert und in 500 µl RIPA-Puffer inkubiert. Unter Verwendung eines Ultraturrax (IKA-Werke, Neu-Isenburg) wurden die Proben 6 • 10 s homogenisiert, wobei zwischen jeder Behandlung mit dem Ultraturrax 20-s Pausen eingelegt wurden, um das Gewebe nicht zu erwärmen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Homogenat wurde für 30 min in ein Ultraschallbad gehängt und anschließend für 30 min bei 100 • g und 4 °C (Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf) zentrifugiert, um das Proteinlysate (Überstand) von der Rohmembranfraktion (Pellet) zu trennen. Der Überstand wurde anschließend in Eppendorf-Gefäße abpipettiert.

2.6.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem BioRad-Proteintest-Verfahren (BioRad, München) nach Bradford (Bradford, 1976). Zunächst wurde die Standard-Konzentrations-Reihe mit Rinderserumalbumin (1 mg / ml, reinst, Behring, Mannheim) erstellt. Die Proben, wie auch die Standardkurven-Reihe, wurden mit 200 µl BioRad-Reagenz versetzt. Nach einer 10-min Inkubationszeit wurde die Extinktion gemessen ($\lambda = 595 \text{ nm}$) und die daraus resultierende Proteinkonzentration unter Berücksichtigung von Verdünnungsfaktoren berechnet.

2.6.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen in einer Gelapparatur (Mini Protean III Cell; Bio-Rad, München) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Zur Proteintrennung wurde ein 4,5 % Sammelgel und ein 10 % Trenngel verwendet. Die Proteinkonzentration auf die einzelnen Slots ergab sich aus ermittelten Größen der Versuchsreihen, die ein effizientes Signal zur Auswertung zuließen. Dabei ergaben sich Auftragungen von 50 µg. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über 3 h bei 120 V. Zum Größenabgleich diente der Precision Plus Protein Prestained Standard (BioRad, München).

2.6.5. Transfer der Proteine (Western Blot)

Die Blotkammer mit den wassergefüllten Kühltanks wurde bei -4 °C kaltgestellt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte in einer gekühlten Tank-Blotting-Apparatur (BioRad, München) auf Hybond PVDF-Membranen (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Amersham Pharmacia). Die Membranen wurden erst 15 s in MeOH getaucht, dann 2 min in A. destillata rehydriert und anschließend für 5 min in Western Blot Puffer voräquiliert. Zwei Filterpapiere (Mukoll) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und mit zwei Transfer-Schwämmen kurz in Western Blot Puffer voräquiliert. Das Gel wurde auf ein Filterpapier, und auf das Gel wurde eine PVDF-Membran gelegt, die wiederum mit einem Filterpapier bedeckt wurde. Dieses Paket wurde zwischen die puffergetränkten Schwämme luftblasenfrei gelegt und in die Kassette eingesetzt. Die Kassette und ein Kühlelement wurden in die Kammer eingesetzt und der Blot 1,5 h bei 90 V und 300 mA bei 4 °C transferiert.

2.6.6. Im mundetektion

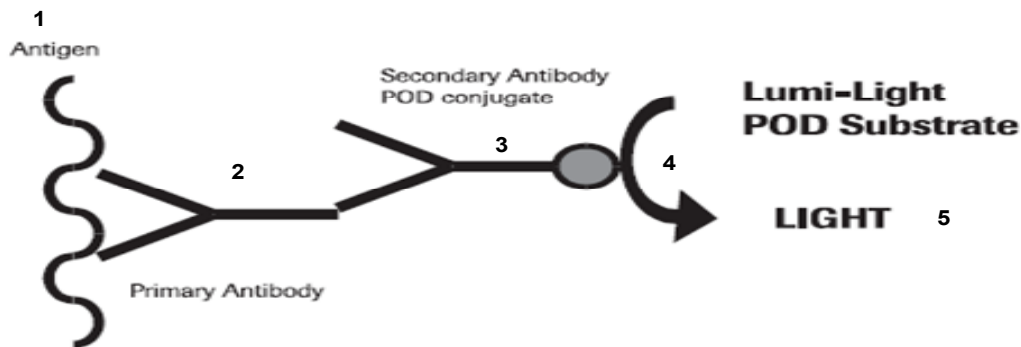
Nach Ablauf des Transfers wurden die Membranen luftgetrocknet, anschließend mit Methanol reaktiviert und einmal mit TBST-Puffer ausgewaschen. Anschließend wurde die Blotmembran für 3 h blockiert. Als Blockierlösung diente 6 % Magermilchpulver in TBST-Puffer-Lösung. Dadurch wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Blotmembran inhibiert. Danach wurde die Blotmembran kurz mit TBST-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation der Blotmembran mit dem ersten spezifischen Antikörper: für VASP-gesamt mit Anti-total VASP und für VASP P-Ser239 mit Anti-VASP P-Ser239 in 3 % Magermilchpulver in TBST-Puffer-Lösung für 16 h bei 4 °C auf einer Wippe. Am Folgetag wurden die inkubierten Blotmembranen viermal für 5 min mit TBST-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit den Sekundärantikörpern für VASP P-Ser239 mit goat anti-mouse IgG und für VASP-gesamt mit goat anti-rabbit IgG in 3 % Magermilchpulver TBST-Puffer-Lösung für 1 h inkubiert. Schließlich wurden die Blotmembranen viermal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen, um nicht-gebundene Sekundärantikörper zu entfernen.

2.6.7. Detektion mit Chemilumineszenz

Die Membran wurde für die Quantifizierung der gebundenen Proteine mit spezifischen Lumineszenzlösungen (Roche, Basel) versetzt. Die Entwickler Lumi-Light-Verstärker und Lumi-Light-Peroxidlösung wurden, nachdem sie auf Raumtemperatur aufgewärmt waren, in einem Volumenverhältnis von 1:1 auf die sich in der Fotokassette befindlichen Membranen pipettiert und für ca. 1 min inkubiert. Danach erfolgte im abgedunkelten Fotolabor die Auflage eines Röntgenfilms (Kodak, Stuttgart) für 1 bis zu 60 min (Abb. 5). Die Röntgenfilme wurden nach Ablauf der Entwicklerzeit zuerst in Entwicklerlösung, danach in Wasser und anschließend in Fixierlösung getaucht. Nach dem Entwickeln wurden die Stellen der Antikörperbindung als schwarze Banden sichtbar. Nach diesen Arbeitsschritten wurden die entwickelten Röntgenfilme zum Trocknen aufgehängt. Die entwickelten Filme wurden mit einer Kamera (BioRad, München) fotografiert und mit dem Programm GelDoc (BioRad, München) die optische Dichte der einzelnen Banden gemessen.

2.6.8. Strippen der Membranen

Analysierte Membranen wurden zur Wiederverwendung mit einem Strippingpuffer zur Abtrennung des primären Antikörpers behandelt. Die Membranen wurden 15 min in dieser Antikörper-Stripp-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in TBST-Puffer ausgewaschen, 15 min in Methanol bei Raumtemperatur inkubiert und danach wieder mit TBST-Puffer ausgewaschen. Zur erneuten Blockierung wurden die Membranen in TBST mit 3 % Milch über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden zur Überprüfung noch vorhandener Konjugate mit dem ECL-Reagenz inkubiert. Die fertig gestrippten Membranen wurden mit dem Anti VASP-P Ser239 Primärantikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die erneute Detektion mit Chemilumineszenz.



1. Protein/ Antigen befindet sich auf der geblotteten Membran
2. Protein/ Antigen wird durch den Primärantikörper gebunden
3. POD- konjugierter Sekundärantikörper bindet den Primärantikörper
4. Die Horseradish- Peroxidase katalysiert das Lumi- Light Substrat und Licht wird emittiert
5. Das emittierte Licht wird auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht

Abb.5: Ablauf der Lumineszenzreaktion. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Horseradish- Peroxidase wird das Lumi- Light Substrat katalysiert und Licht wird emittiert. Das emittierte Lichtsignal wird auf dem aufliegenden Röntgenfilm als dunkle Bande sichtbar.

2.6.9. Funktionstests (Organbad)

Die Auswertung der durch Vasokonstriktion und Vasodilatation bewirkten Tonusänderungen der Gefäße erfolgte für jeden Venen-Ring individuell über die Kraftänderung von der Ausgangskraft ausgehend. Dafür wurde das Programm Chart 5.1 (Power Lab, California) eingesetzt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM für eine Vene angegeben. Die Berechnung der Dosiswirkungskurven erfolgte auf der Basis prozentualer Änderungen, wobei die stabile Kraft der jeweiligen Vorkontraktion oder der erzielten Maximalkontraktion, dem Wert 100 % entsprach.

2.6.10. Proteinanalyse (Western Blot)

Die Quantifizierung der gebundenen Proteine erfolgte anhand einer densitometrischen Messung der einzelnen auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden. Die optische Dichte der VASP-Total Banden wurde mit 100 % gleichgesetzt, die optische Dichte der äquivalenten VASP P-Ser239 Banden wurde dazu ins Verhältnis gesetzt und als prozentuale Änderung angegeben.

2.7. Daten und Statistik

2.7.1. Funktionstests

Die Vasorelaxation durch ACh und BAY 41-2272 wird als prozentuale Änderung von der am Anfang des Experiments durch Phenylephrin bewirkten Vorkontraktion angegeben, die mit 100 % gleichgesetzt wurde.

2.7.2. Proteinanalyse

Die Phosphorylierung an VASP Ser239 wurde als prozentuales Verhältnis zu VASP-Total angegeben.

2.7.3. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Statistikanwendung des Computerprogramms 'Graph Pad Prism' (Graph Pad Software; La Jolla, Ca) durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Messdaten als Mittelwerte \pm SEM für ACh (n=7), für BAY 41-2272 intakt (n=12), für BAY 41-2272 denudiert (n=7) und für BAY 41-2272 mit ODQ (n=7) präsentiert. Die statistische Signifikanz wurde mit Student's t-Test überprüft. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0,05 festgesetzt.

3. Ergebnisse

Die untersuchten Venen stammten von Patienten, bei denen eine elektive Bypass-Operation im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit durchgeführt wurde. Es wurden insgesamt 60 Venae saphenae magnaе untersucht (Tab. 2).

Versuchsreihen erhalten		auswertbar	
		ja	nein
Endothel-unabhängiger Kontraktionstest mit KCl	51	31	20
Rezeptor-abhängiger Kontraktionstest mit Phenylephrin	32	27	5
Endothel-abhängiger Dilatationstest mit Acetylcholin	32	25	7
Dilatationstest mit BAY 41-2272 an intakten Venen	12	12	0
Dilatationstest mit BAY 41-2272 an denudierten Venen	7	7	0
Dilatationstest mit BAY 41-2272 nach ODQ	7	7	0
Proteinanalyse mittels Western Blot	9	8	1

Tab. 2: Übersicht über die Anzahl der einzelnen Versuche

3.1. Endothelabhängige dilatative Eigenschaften der Venen

Zur Überprüfung der Endothelfunktion der Gefäßringe wurde nach submaximaler Vorkontraktion (1 μ M PE) eine kumulative ACh-Applikation (1 nM bis 1 mM) angeschlossen. Es wurden insgesamt 15 Venen untersucht. Davon waren 8 auswertbar. Die restlichen 7 Venen dilatierten auf ACh nicht oder kontrahierten sogar. Diese Venen wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Die endothelabhängige dilatative Antwort fiel schwach aus. Die durchschnittliche Kraftabnahme betrug 20 % der zuvor durch 1 μ M PE erreichten Maximalkraft (Abb. 6). Zudem kam es ab einer ACh-Dosis von 10 μ M zu einer dosisabhängigen Vasokonstriktion. Die ACh-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Inhibition

Ergebnisse

der Vorkontraktion durch 1 μM PE führte (EC_{50}) betrug 1 μM . Diese Dosis wurde in allen folgenden Versuchen benutzt, um die Funktionsfähigkeit des Endothels zu überprüfen.

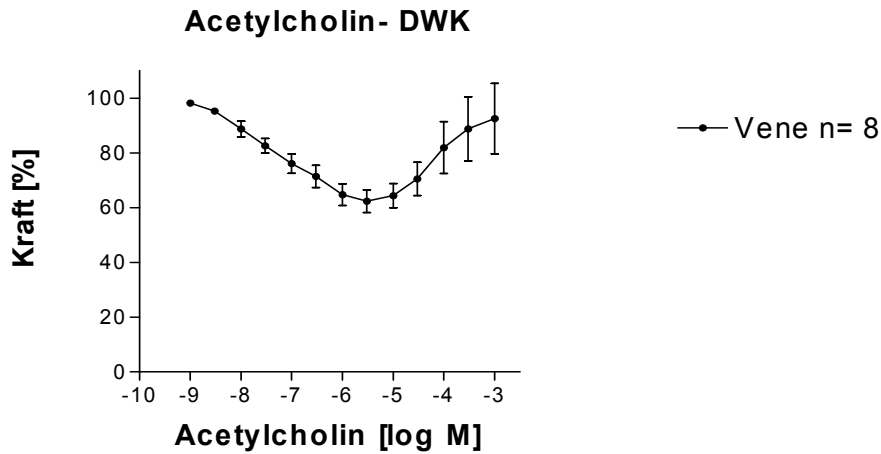


Abb. 6: Kumulative Dosiswirkungskurve mit ACh von 1 nM bis 1 mM. Dargestellt ist der Verlauf der Kraft mit steigender ACh-Konzentration. Die Kraft nahm von der durch 1 μM PE bewirkten Maximalkraft, die mit 100 % gleichgesetzt wurde, auf $80 \pm 12\%$ (Mittelwert \pm SEM) ab. Die ACh-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion durch PE führte (EC_{50} -Wert), wurde anhand dieser Dosiswirkungskurve berechnet und betrug $6,0 \pm 1,3$ [-logM].

3.2. Dilatative Wirkung von Acetylcholin an intakten und denudierten Venen

Mit dem Endotheltest (1 μM ACh) wurde die Funktionsfähigkeit und die Intaktheit des Endothels überprüft. Es wurden insgesamt 25 Venen untersucht, 8 Venen wurden verworfen, weil sie im Kontraktionstest mit KCl oder mit PE keine Reaktion zeigten. 7 Venen wurden denudiert. Dabei wurde jede einzelne Vene in 4 Ringe unterteilt. Zwei Ringe wurden in ihrem Ausgangszustand belassen, zwei wurden denudiert, indem sie 30 s lang in A. destillata geschwenkt wurden. Danach erfolgte der Endotheltest mit 1 μM ACh. Dabei dilatierten die durch A. destillata denudierten Ringe nicht auf 1 μM ACh. Die durchschnittliche 2 %ige Kraftabnahme wurde als normale Kraftabnahme über die Versuchsdauer interpretiert. Bei den intakten Venen (n = 19) nahm die Kraft nach Zugabe von 1 μM ACh durchschnittliche um 20 % der zuvor durch 1 μM PE erreichten Maximalkraft ab (Abb. 7).

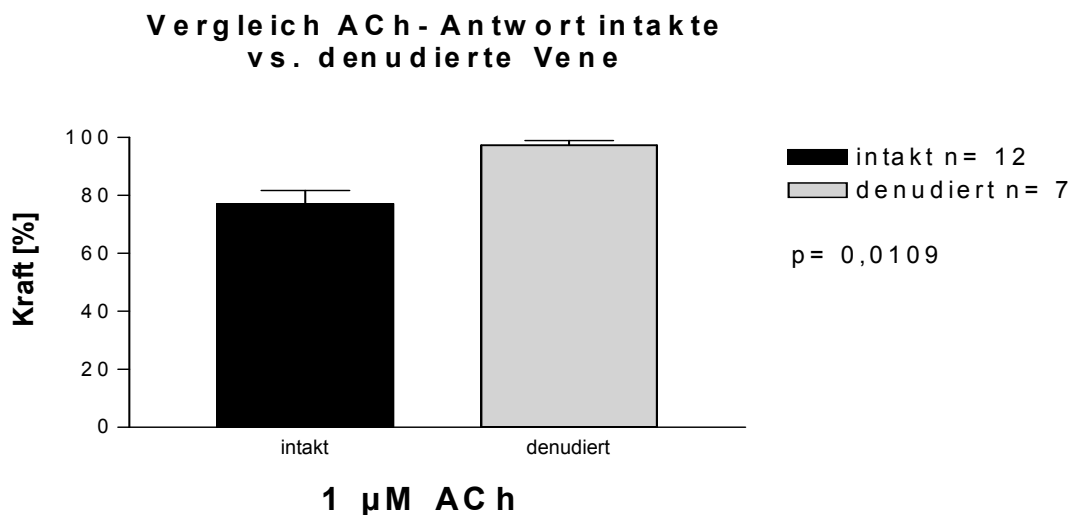


Abb. 7: Vergleich der Dilatation an intakter und denudierter Vene durch 1 μM ACh. Die Kraft der intakten Venen nahm auf $77,1 \pm 15,9$ % (Mittelwert \pm SEM) von der durch 1 μM PE erreichten Maximalkraft, die 100 % entsprach, ab. Bei den denudierten Gefäßen bewirkte der ACh-Stimulus keine Kraftabnahme (die Kraftabnahme auf $97,3 \pm 4,3$ % entsprach einer normalen Kraftabnahme während des Versuches).

Versuchsanzahl	intakt (n = 12)	denudiert (n = 7)
Spannweite	44,0 - 94,0 [mN]	89,0 - 100,6 [mN]
Mittelwert	77,1 [mN]	97,3* [mN]
SEM	15,9 [mN]	4,3 [mN]

Tab. 3: Die durch 1 μ M ACh erfolgte Dilatation war in den denudierten Venen, im Vergleich zu den intakten Venen, signifikant geringer * $p < 0,05$ vs. intakt

3.3. Dilatative Wirkung von BAY 41-2272 an intakten und denudierten Venen

Die dilatativen Eigenschaften von BAY 41-2272 wurden in kumulativen Dosiswirkungsversuchen an insgesamt 12 Venen getestet. Die Dosiswirkungsversuche erfolgten an denudierten und intakten Gefäßen.

Durch den Endotheltest mit 1 μ M ACh wurde überprüft, ob die denudierten Venen ein dysfunktionelles und die als intakt eingruppierten Venen ein funktionelles Endothel besaßen (Abb. 7). Anschließend wurden kumulative Dosiswirkungskurven mit BAY 41-2272 von 10 • 10 nM bis 1 mM durchgeführt. BAY 41-2272 dilatierte die intakten Venen maximal um 60 %. In den denudierten Venen fiel die dilatative Antwort mit maximal 33 % um die Hälfte geringer aus. Folglich war die dilatative Potenz von BAY 41-2272 in denudierten Venen signifikant herabgesetzt (Abb. 8, Tab. 4). Die Dosiswirkungsversuche mit BAY 41-2272 wurden in einer maximalen Zeitspanne von 30 min durchgeführt. Während dieser Zeit konnte keine Wirkungsabschwächung von BAY 41-2272 im Sinne einer Toleranzentwicklung bzw. einer Tachyphylaxie beobachtet werden.

Wirkung von BAY 41-2272 an intakten und denudierten humanen Venen

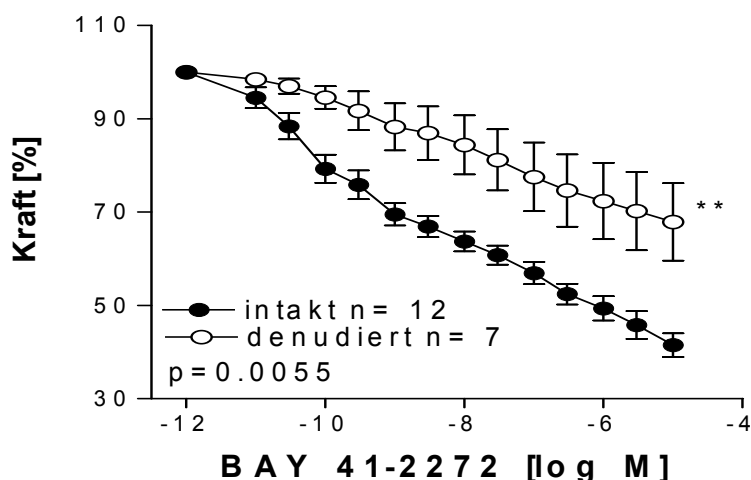


Abb. 8: Vergleich der dilatativen Wirkung von BAY 41-2272 an intakten und denudierten Venen in kumulativen Dosiswirkungsversuchen. Die vasodilatatorische Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion angegeben (SEM jeweils als Balken). Der signifikante Unterschied zwischen denudiert und intakt ist mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).

BAY 41-2272	Intakt	Denudiert
EC ₅₀ - Wert [-logM]	9,17 ± 0,11	7,99 ± 0,35
Mittelwerte ± SEM	67,51 ± 18,2	84,67 ± 10,92
Differenz der Mittelwerte	17,16 ± 5,67	

Tab.4: EC₅₀-Werte und Mittelwerte ± SEM von BAY 41-2272 an isolierten intakten und denudierten humanen Venen. Die EC₅₀-Werte stellen die mittlere Konzentration dar, die in 7 bzw. 12 individuellen Experimenten an Venenringen zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion durch 1 μM PE führte [-logM]. Die Wirksamkeit von BAY 41-2272 war bei intakten vs. denudierten Venen signifikant höher ($p < 0,005$).

3.4. Dilatative Eigenschaften von BAY 41-2272 nach Zugabe des löslichen Guanylatcyclase-Inhibitors ODQ

Die dilatative Potenz von BAY 41-2272 wurde zusätzlich nach Zugabe des irreversiblen Inhibitors der löslichen Guanylatcyclase ODQ untersucht. Dabei wurden insgesamt 7 intakte Venen ungefähr 30 min vor BAY 41-2272 Zugabe mit 10 μ M ODQ inkubiert. Anschließend erfolgten die kumulativen Dosiswirkungsversuche mit BAY 41-2272 von 10 nM bis 1 mM. Dabei zeigte sich, dass ODQ die dilatative Wirkung von BAY 41-2272 vollständig aufhob (Abb. 9).

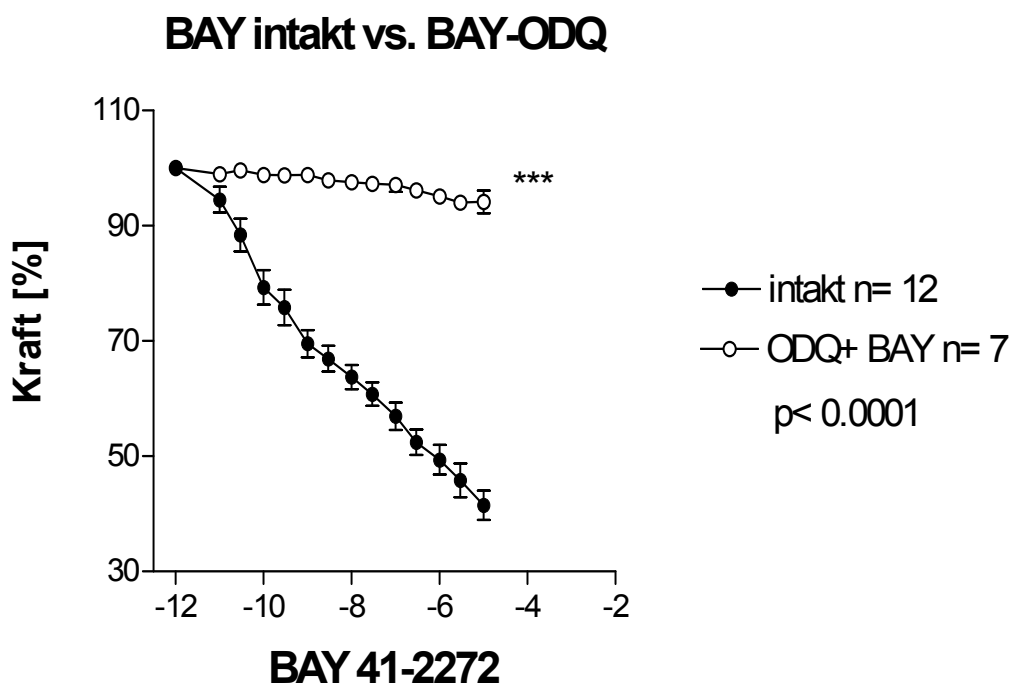


Abb.9: Die dilatative Antwort auf BAY 41-2272 ist durch Zugabe des sGC- Inhibitors ODQ vollständig aufgehoben. Die durchschnittliche Dilatation liegt um 3 % und kann auf einen konstanten, kontinuierlichen Kraftabbau während den Messungen bezogen werden. Die vasodilatatorische Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion angegeben (SEM jeweils als Balken). Der signifikante Unterschied zwischen mit ODQ- inkubiert und intakt ist mit *** gekennzeichnet ($P < 0,05$).

3.5. Proteinanalyse mittels Western Blot

Bei 8 von insgesamt 9 Venen wurde eine Proteinanalyse durchgeführt. Jede Vene wurde zwei Gruppen zugeteilt. Eine Gruppe enthielt die nicht inkubierten Venen (Vehikel), die andere die mit 3 μ M BAY 41-2272 inkubierten Venen. Die Inkubation mit BAY 41-2272 führte zu einer deutlichen Zunahme der VASP-Phosphorylierung an Serin 239. Sie war durchschnittlich 40 % höher als bei den nicht inkubierten Venen (Abb. 10, 11). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es durch BAY 41-2272 zu einer deutlichen Mehr-Aktivierung des sGC-cGMP-Signalwegs kommt und somit auch zur Aktivierung der Proteinkinase G I, denn die Phosphorylierung der Serinstelle 239 des VASP erfolgt zum größten Teil durch die PKG I (Butt et al, 1994).

VASP P- Ser 239 ohne und nach BAY- Inkubation

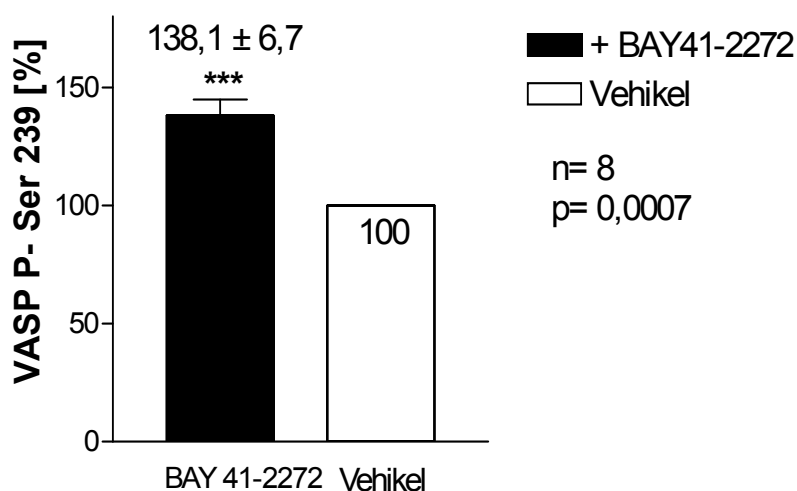


Abb.10: Die VASP- Phosphorylierung an Serin 239, die bei den nicht inkubierten Venen gemessen worden ist, dient als Basiswert und wird mit 100 % gleichgesetzt. Die vermehrte VASP- Phosphorylierung bei den mit BAY inkubierten Venen wird als prozentuale Veränderung vom Basiswert angegeben und beträgt 38,1 ± 18.87 % (Mittelwert ± SEM).

VASP- Western Blot Analyse

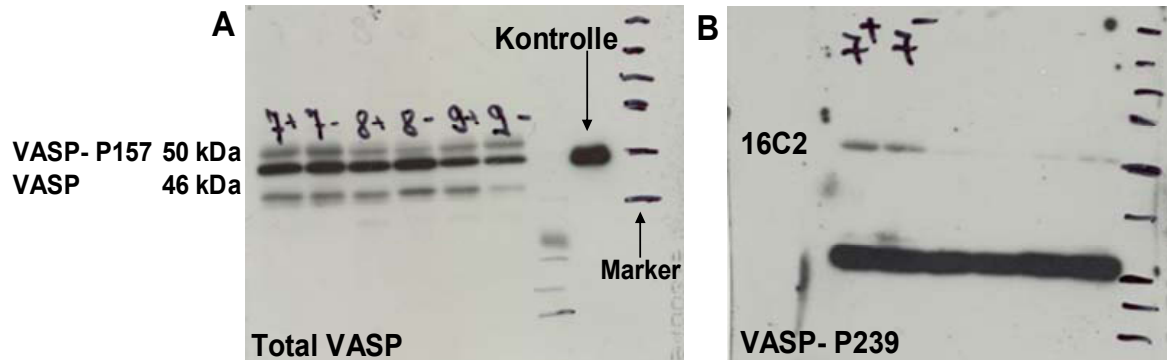


Abb.11: Analyse der VASP- Phosphorylierung nach Inkubation mit 3 μ M BAY 41-2272 in humaner Vena saphena magna. (A) zeigt den Gesamtteil des VASP, dabei wird die Phosphorylierung an Serin 157 durch den 46 kDa/ 50 kDa Shift dargestellt. Die Phosphorylierung an VASP Serin 239, die für die Aktivierung der PKG I spezifisch ist, wird durch den 16C2- Antikörper gegen Serin 239 angezeigt (B). Die (+) Proben stellen, die mit 3 μ M Bay inkubierten Venen dar, die (-) Proben die Vehikel. Dabei zeigt sich eine deutlich vermehrte Phosphorylierung an VASP- P 239 bei den mit BAY inkubierten Proben.

4. Diskussion

Pharmaka, mit welchen sich die lösliche Guanylycyclase NO-unabhängig aktivieren und damit eine Gefäßdilatation erreichen läßt, sind relativ neu. Ein früher Vertreter dieser Gruppe ist YC-1 (Mülsch et al, 1997). In einer Reihe von Studien wurden die Effekte einer Nachfolgesubstanz - BAY 41-2272 - an arteriellen Gefäßen untersucht (Straub et al, 2002) (Bawankule et al, 2005) (Stasch et al, 2006) (Boerrigter & Burnett, 2007) (Teixeira et al, 2006) (Teixeira et al, 2006). Schon in der allerersten Arbeit zu BAY 41-2272 wird die vasodilatorische Wirkung auf das arterielle System beschrieben (Stasch et al, 2001). In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig die Wirkung von BAY 41-2272 an humanen Venen untersucht. Diese Untersuchungen an intakten und denudierten Venen ergänzen somit die bisherigen Arbeiten zur Wirkung von BAY 41-2272 auf arterielle Gefäße.

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Technische Begrenzung der Organbadversuche

Organbadversuche stellen weltweit eine gut etablierte und häufig benutzte Methode dar, um die Wirkung pharmakologischer Substanzen z.B. an Gefäßen, Trabekeln des Herzens oder Muskulatur zu untersuchen. Trotz relativ einfacher und unkomplizierter Versuchsdurchführung können technische Störungen auftreten, die die Gefäßpräparate in ihren Reaktionen beeinträchtigen. Dazu zählen:

1. inkonstanter pH der Nährlösung
2. inkonstante Temperatur der Nährlösung
3. schädigende Vorspannung in der Äquilibrationsphase auf das Gefäßendothel
4. instabile mechanische Aufhängung der Gefäßringe
5. mechanische Erschütterungen in der Umgebung der Organbadanlage

Für die vorliegende Untersuchung wurden die fünf genannten Störungen weitgehend ausgeschlossen.

4.1.2. Materialqualität

Die Gefäße waren Reststücke der Vena saphena magna, die nicht für koronarvenöse Bypässe benötigt wurden. Im Rahmen des operativen Geschehens (z.B.

beim Schneiden, Präparieren oder der Prüfung der Intaktheit des Gefäßes durch Dilatation mit NaCl-Lösung) könnte es zu einer mechanischen Beeinträchtigung der Venen gekommen sein.

Wegen der Vorerkrankungen der Patienten - arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Koronare Herzkrankheit - könnte bei den untersuchten Venen das Endothel beeinträchtigt oder der NO-sGC-cGMP-Signalweg gestört gewesen sein. Eine Einordnung in 'gesund' oder 'krank' war nicht möglich. Damit es nicht zu einer Verwertung von Venen mit dysfunktionellem Endothel kam, wurde der gut etablierte Endotheltest mit Acetylcholin (1 μ M) durchgeführt (Furchgott, 1980). Dabei fiel die Antwort der durch PE vorkontrahierten Venen auf ACh im Mittel relativ schwach aus (Abb. 6). Das könnte darauf hindeuten, dass das Gefäß-Endothel nicht vollkommen intakt war. Eine Differenzierung und Graduierung eines möglichen Schadens konnte durch den ACh-Test nicht vorgenommen werden. Die lichtmikroskopische Untersuchung ergab allerdings keine deutlichen Zeichen eines Gefäßwand- bzw. Endothelschadens.

4.1.3. Denudation

Die Denudation erfolgte durch 30 s Schwenken in A. destillata. Die Möglichkeit der Schädigung der glattmuskulären Funktion durch die Denudationsmethode lässt sich hinterfragen. In früheren Versuchen ist jedoch gezeigt worden, dass diese Methode der Denudation weder Auswirkungen auf die glatte Gefäßmuskulatur besitzt noch einen Funktionsverlust auslöst (Schipke et al, 1985).

4.1.4. Materialwahl

Die hier vorliegenden Untersuchungen wären auch an arteriellen humanen Gefäßen von großer Bedeutung, v.a im Hinblick auf die bedeutendere klinische Relevanz der arteriellen Strombahn bei zahlreichen Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt. Die Wahl des zu untersuchenden Materials war in dieser Arbeit u.a durch ihre Verfügbarkeit bestimmt. Die Verfügbarkeit humaner Venen stellt sich deutlich größer dar, als die Verfügbarkeit humaner arterieller Gefäße, so dass die Wahl auf humane Vene fiel um eine ausreichend hohe Zahl an untersuchten Gefäßen zu erreichen und dadurch eine repräsentative Untersuchung von BAY 41-2272 an humanen Gefäßen aufzeigen zu können.

4.2. Wirkung von BAY 41-2272 an isolierten humanen Venen

BAY 41-2272 ist bei einer Dosierung zwischen 10^{-11} M bis 10^{-3} M ein potenter Dilatator intakter humaner Venen. Der EC_{50} -Wert liegt bei 9,2 [-logM]. An denudierten Venen ist die vasodilatorische Potenz von BAY 41-2272 stark vermindert. Es kommt zu einer Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve, und der EC_{50} -Wert ändert sich auf 7,9 [-logM] (Abb. 8; Tab. 4).

Andere *in-vitro* Untersuchungen beschrieben das Wirkungsprofil von BAY 41-2272 an intakten und denudierten arteriellen Gefäße (Priviero et al, 2005) (Straub et al, 2002) (Teixeira et al, 2006) (Teixeira et al, 2006). Hier löste BAY 41-2272 eine starke dilatorische Wirkung an intakten Arterien und eine abgeminderte, aber dennoch potente Wirkung, an denudierten Arterien aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen und bestätigen diese Daten, die bis jetzt für arterielle Gefäße erhoben wurden. Dabei erstrecken sich die hier vorliegenden Untersuchungen über ein größeres Dosisspektrum und zeigen einen geringeren EC_{50} -Wert für die Wirkung an intakten als auch an denudierten Gefäßen (Tab. 5). Es zeigt sich, dass BAY 41-2272 auch intakte und denudierte Venen relaxiert .

Arbeit Gew	ebe	Dosisspektrum	intakt [-logM]	denudiert [-logM]
eigene Daten	V. saphena magna Mensch	10^{-11} - 10^{-3} M	9,16±0,11	7,99±0,35
Priviero et al, 2005	Aorta Kaninchen	10^{-8} - 10^{-5} M	6,59±0,05	6,19±0,04
Teixeira et al, 2006	A. basilaris Ratte	10^{-10} - 10^{-6} M	8,13±0,03	7,63±0,05
Teixeira et al, 2006	A. mesenterica Ratte	10^{-10} - 10^{-6} M	8,21±0,05	6,75±0,06

Tab. 5: Die Wirkung von BAY 41-2272 in humanen Venen (Ergebnisse dieser Arbeit) im Vergleich zur Wirkung in Arterien

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wird BAY 41-2272 in einer Studie an Hunden mit chronischer Herzinsuffizienz als rein arterieller Dilatator beschrieben (Boerrigter, 2003). Der sGC-Stimulator führte zu einer Reduktion des mittleren arteriellen Blutdruckes, des pulmonalarteriellen Druckes und des systemischen Gesamtwiderstandes. Der pulmonalkapilläre Verschlussdruck wurde in diesem Modell ebenfalls gesenkt, aber ohne, wie nach Glyceroltrinitrat, den pulmonalen Widerstand oder den rechtsatrialen Druck zu reduzieren. Folglich wurde BAY 41-2272 eine rein arterielle Wirkung zugeschrieben und eine potentielle Wirkung an venösen Gefäßen nur bei unphysiologisch hohen Dosen eingeräumt.

BAY 41-2272 wird in den meisten Arbeiten als arterieller Dilatator beschrieben (Stasch et al, 2001) (Priviero et al, 2005) (Straub et al, 2002) (Teixeira et al, 2006) (Bawankule et al, 2005) (Stasch et al, 2006) (Boerrigter, 2003). Eine einzige Arbeit beschreibt BAY 41-2272 auch als potenten venösen Dilatator bei Rattenvenen. Die EC_{50} von 0,06 μ M war insbesondere im Vergleich zu der Wirkung von Glyceroltrinitrat mit einer EC_{50} von 23 μ M viel niedriger (Hobbs, 2002).

Im Folgenden soll der Unterschied zwischen der aktuellen Literatur und den eigenen Ergebnissen diskutiert werden. Bei der vorliegenden Arbeit geht es um *in-vitro* Versuche an isolierten Venen. Die Arbeit von Boerrigter erfolgte an *in-vivo* Hunden (Boerrigter, 2003). Damit handelt es sich um zwei unterschiedliche Modelle, wobei im vorliegenden Modell über den pH (= 7,4), die Temperatur (= 37 °C) und einen physiologischen Puffer physiologische Bedingungen angenähert wurden. Dennoch handelt es sich um denervierte, einzelne Venen, bei denen allerdings multifaktorielle Einflüsse, wie sie in einem *in-vivo* Modell zum Tragen kommen, ausgeschlossen werden können.

Vergleichbare *in-vitro* Organbadversuche erfolgten an isolierten Arterien (Priviero et al, 2005) (Teixeira et al, 2006). Der Vergleich mit diesen Arbeiten zeigt eindeutig, dass BAY 41-2272 auch ein potenter Dilatator intakter und denudierter arterieller wie auch venöser Gefäße von verschiedenen Spezies ist (Tab. 5).

BAY 41-2272 ist ein Stimulator der NO-sensitiven löslichen Guanylatcyclase. Die Stimulation erfolgt nach Bindung an die α_1 -Untereinheit unabhängig von NO, aber abhängig von der prosthetischen Hämgruppe des Enzyms (Stasch et al, 2001). Daraufhin kommt es zur Katalysierung von cGMP und zur Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen und damit zu zahlreichen Effekten in der Zelle, wie zur Relaxation glatter Gefäßmuskulatur (Pfeifer et al, 1998). Die lösliche Guanylat-

cyclase ist das Schlüsselenzym für die BAY 41-2272-Effekte, welches ubiquitär in seiner α_1 , β_1 -Untereinheit vorkommt (Hobbs, 1997), vor allem aber in hoher Konzentration im Cytosol glatter Muskelzellen und in Thrombozyten (Mullershausen et al, 2003). Diese Tatsache könnte teilweise erklären, warum BAY 41-2272 ein überwiegend arterieller Dilatator ist. Venen enthalten weniger glatte Muskelzellen als Arterien, und somit ist auch die Konzentration der löslichen Guanylatcyclase geringer. Die Tatsache, dass BAY 41-2272 die lösliche Guanylatcyclase nur aktiviert, wenn das zentrale Eisen der Hämgruppe im zweiwertigen Zustand vorliegt, könnte ebenfalls die bevorzugte arterielle Wirkung erklären. Kommt es zu einer Oxidierung des zentralen Eisenatoms, wie z.B. durch ODQ (Garthwaite et al, 1995) (Schrammel et al, 1996), so wird die Dosiswirkungskurve nach rechts verschoben (Stasch et al, 2001) oder die BAY 41-2272-vermittelte Dilatation vollständig aufgehoben (Abb. 9).

In kleinen Mesenterialarterien liegt die sGC vor allem in Zuständen oxidativen Stresses in unterschiedlichen Redoxformen vor und ist somit unempfindlich gegenüber NO oder auch BAY 41-2272 (Kemp-Harper et al, 2007). Die sGC könnte auch in anderen Gefäßarten, also z.B. Venen, in einem BAY 41-2272 unempfindlichen Zustand vorliegen und somit das geringere Ansprechen der Venen auf BAY 41-2272 erklären. Das Problem der veränderten Redoxformen der sGC greifen auch Stasch und Mitarbeiter auf. Diese Autoren beschreiben, dass dieser Aspekt auch eine Stärke von BAY 41-2272 sein könnte, indem es den sensitiven Anteil der nicht oxidierten sGC für NO anheben und somit trotz teilweise geänderter Redoxformen einen NO- oder sGC-Effekt in der Zelle auslösen könnte (Stasch et al, 2006).

BAY 41-2272 und NO wirken synergistisch (Stasch et al, 2001). Die NO-Produktion in venösen Endothelzellen (De Mey, Vanhoutte, 1982) und in venösen Gefäßen, wie z.B. der Vena cava (Mulsch et al, 1995) (Kojda et al, 1998), ist um ein Vielfaches geringer als in arteriellen Endothelzellen oder in arteriellen Gefäßen. Das könnte erklären, warum BAY 41-2272 bevorzugt Arterien dilatiert. Dieses Argument schließt nicht aus, dass BAY 41-2272 auch Venen dilatiert, denn obwohl die endogene NO-Produktion in Venen im Vergleich zu Arterien geringer ist, kommt es auch in Venen zur NO-Produktion. Da BAY 41-2272 die NO-abhängige sGC-Stimulierung verstärkt, könnte dieser Umstand erklären, warum BAY 41-2272 in der vorliegenden Arbeit Venen dilatiert.

Die Denudation der Venen führte zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der BAY 41-2272 Dosiswirkungskurve. Dieses Ergebnis macht die Abhängigkeit der Wirkung von BAY 41-2272 von der NO-Bioverfügbarkeit im Gefäß deutlich. Die Abhängigkeit der Wirkung vom Endothelstatus war bereits für arterielle Gefäße beschrieben (Priviero et al, 2005) (Teixeira et al, 2006). Die deutlich reduzierte Wirkung in denudierten venösen Gefäßen im Vergleich zu arteriellen Gefäßen (Tab. 5) könnte damit erklärt werden, dass die generell geringere endogene NO-Konzentration in Venen durch die Denudation auf ein Minimum oder vollkommen reduziert wird. Dieser Effekt ist in Arterien mit ihrer deutlich höheren endogenen NO-Bioverfügbarkeit vermutlich geringer ausgeprägt.

Im Folgenden soll die differierende Wirkung von BAY 41-2272 in Venen und Arterien relativ zu organischen Nitraten angesprochen werden. Unterschiede der Wirksamkeit von Pharmaka zwischen Arterien und Venen, die den NO-sGC-cGMP-Weg betreffen, wurden vor allem für organische Nitrate umfangreich beschrieben und mit zahlreichen Modellen wurde versucht, die im therapeutischen Bereich bevorzugte Venodilation durch organische Nitrate zu erklären (Kojda et al, 1998), (Barba et al, 1999).

Organische Nitrate geben NO direkt in die Gefäßwand ab. Sie werden enzymatisch v.a. durch die CYP3A4, ein P 450 Enzym, denitriert, und NO sowie denitrierte Abbauprodukte werden freigesetzt (Minamiyama et al, 1999). Das durch organische Nitrate freigesetzte NO findet sich in vaskulären Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen und führt über die sGC-Aktivierung mit konsekutiver cGMP-Produktion über die Aktivierung mehrerer cGMP-abhängiger Proteinkinasen zu vielfachen Effekten in der Zelle, wie auch zur Gefäßrelaxation (Lincoln et al, 2001). Organische Nitrate führen zu einer Drucksenkung im venösen Teil des Kreislaufsystems. Eine Erklärung für die Venoselektivität organischer Nitrate besteht darin, dass ihre Bioaktivierung in Venen weniger als in Arterien gehemmt wird, denn endogenes NO kann sowohl die Bioaktivierung (Kojda et al, 1998) als auch die sGC-Sensibilität für NO vermindern (Papapetropoulos et al, 1996). Barba und Mitarbeiter lieferten interessante Erklärungsansätze, warum NO-Donoren in Venen und Arterien unterschiedlich wirken (Barba et al, 1999). Diese Autoren untersuchten in Venen und Arterien systematisch, in Abhängigkeit von der basalen NO-Konzentration, die sGC-Aktivität, die Aktivität der PKG I und der PDE V, die cGMP in vaskulärer glatter Muskulatur und Thrombozyten abbaut (Maurice et al,

2003). Dabei stellten sie fest, dass die Sensibilität der sGC gegenüber NO-Donoren in Venen am höchsten war, da diese die geringste basale NO-Freisetzung hatten.

Die sGC-Expression kann durch endogenes NO gedrosselt (Papapetropoulos et al, 1996), die Expression der Proteinkinase G in glatter Gefäßmuskulatur vermindert (Soff et al, 1997) und die Aktivität der PDE V erhöht (Mullershausen et al, 2006) werden. Diese Ergebnisse können die Unterschiede zwischen Arterien und Venen in Bezug auf ihre Sensibilität gegenüber organischen Nitraten erklären.

Dieser Exkurs soll erklären helfen, warum BAY 41-2272 Venen dilatieren kann, denn soweit bekannt ist, ist der Signaltransduktionsweg nach der sGC-Aktivierung für organische Nitrate und für BAY 41-2272 nahezu identisch. So könnte man sich vorstellen, dass gerade im venösen Gefäßbett durch die niedrige endogene NO-Konzentration die Aktivität der sGC und der Proteinkinase G weniger durch endogenes NO gehemmt wird und die PDE V-Aktivität weniger angehoben wird. BAY 41-2272 könnte also trotz einer geringeren NO- und sGC-Konzentration in venösen Gefäßen effektiv wirken.

4.3. Wirkung von BAY 41-2272 an isolierten humanen Venen nach Zugabe des löslichen Guanylatcyclase-Inhibitors ODQ

Der selektive Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase [1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one] (= ODQ) (Garthwaite et al, 1995) oxidiert die Hämgruppe der sGC irreversibel und macht sie dadurch für NO unempfindlich (Schrammel et al, 1996). Inkubation mit ODQ inhibiert die BAY 41-2272 vermittelte Stimulation der sGC vollständig (Stasch et al, 2001). Anhand dieses Ergebnisses wurde BAY 41-2272 als NO-unabhängiger, aber Häm-abhängiger Stimulator der sGC charakterisiert. BAY 41-2272 bindet zwar nicht an die Hämgruppe der sGC, braucht aber die reduzierte (Fe^{2+}) Form des Enzyms, um an die α_1 -Untereinheit der sGC zu binden und sie aktivieren zu können (Stasch et al, 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ODQ zu einer vollständigen Inhibierung der BAY 41-2272 vermittelten Dilation venöser Gefäßringe führt. BAY 41-2272 löst also mittels sGC-Aktivierung eine Dilatation bei Venen aus. Bei *in-vitro* Versuchen hemmte ODQ ebenfalls die BAY 41-2272-vermittelte Dilation von Arterien (Priviero et al, 2005) (Teixeira et al, 2006) (Bawankule et al, 2005). Diese war aber, im

Gegensatz zu unseren Ergebnissen, nicht vollständig, sondern nur um etwa den Faktor 10 reduziert (Teixeira et al, 2006). Obwohl der cGMP-Anstieg durch BAY 41-2272 nach ODQ-Gabe um 90 % vermindert war, kam es dennoch zu einer nur teilweise reduzierten Relaxation (Priviero et al, 2005). Diese Beobachtungen ließen an cGMP-unabhängige Mechanismen von BAY 41-2272 denken. So relaxierte BAY 41-2272 sowohl über die Aktivierung einer sarkolemmalen Na^{2+} -Pumpe als auch über einen cGMP-abhängigen Mechanismus Pulmonalarterien vom Schaf (Bawankule et al, 2005). Die Beobachtung, dass BAY 41-2272 im Corpus cavernosum des Menschen und der Ratte auch nach ODQ eine Relaxation auslöste (Baracat et al, 2003), unterstreicht die Aussage, dass BAY 41-2272 über sGC-unabhängige Mechanismen verfügt. Auch die verminderte, aber doch vorhandene Relaxation bei $\text{sGC}\alpha_1^{-/-}$ Mäusen lässt vermuten, dass die Relaxation auch über die $\text{sGC}\alpha_2\beta_1$ vermittelt wird, oder / und durch vollkommen cGMP-unabhängige Mechanismen (Nimmegeers et al, 2007). In den vorliegenden Versuchen deutet die vollständige Inhibierung der Relaxation nach ODQ-Gabe darauf hin, dass BAY 41-2272 ausschließlich über die sGC-Aktivierung zu einer Relaxation der humanen Venen führt.

4.3.1. Aktivität der PK G I nach Zugabe von BAY 41-2272

Nach Inkubation humaner Venen mit BAY 41-2272 kam es zu einer deutlichen Phosphorylierung von VASP Ser239, die um 40 % höher als bei den Vehikeln war (Abb. 10; 11). Dieses Ergebnis und die vollständige Hemmung der sGC und damit die Hemmung der vasodilatorischen Potenz von BAY 41-2272 durch ODQ legen nahe, dass BAY 41-2272 über eine Aktivierung des sGC-cGMP-PKG I-Signalweges vasodilatierend bei humaner Vena saphena magna wirkt.

4.3.2. Vasodilator-stim uliertes Phosphoprotein (VASP)

Die Phosphorylierung des VASP an Serin 239 wird von der PKG I bevorzugt (Butt et al, 1994) und kann als geeigneter Marker zur Darstellung der PKG I Aktivität genutzt werden (Smolenski et al, 1998).

Tatsächlich wurde in zahlreichen Arbeiten VASP P-Ser239 eingesetzt, um die PKG I-Aktivität in unterschiedlichen Geweben und bei unterschiedlichen pathophysiologischen Zuständen nachzuweisen. Dabei wurde übereinstimmend beob-

achtet, dass VASP P-Ser239 die Aktivität und Integrität des NO-cGMP-PKG I-Signalweges zuverlässig widerspiegelt (Mulsch et al, 2001) (Schulz et al, 2002) (Schäfer et al, 2003). Letztlich wurde sogar der Gehalt von VASP P-Ser239 indirekt mit der NO-Bioverfügbarkeit in der Gefäßwand gleich gesetzt (Oelze et al, 2000). Bei hohem oxidativen Stress, bei denudierten Gefäßen oder auch bei eNOS-Mangel, also bei pathologischen Zuständen, die zu einer stark verminderten NO-Bioverfügbarkeit führen, kam es zu einer starken Abnahme des VASP P-Ser239. Wurden diese pathologischen Zustände aufgehoben, so erhöhte sich VASP P-Ser 239 signifikant.

4.3.3. VASP-Phosphorylierung an Serin 239 nach Zugabe von BAY 41-2272

Der Nachweis von VASP P-Ser239 nach BAY 41-2272-Zugabe wurde bisher nur in Thrombozyten erbracht (Hobbs, 2003). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass BAY 41-2272 auch in humanen Venen zu einer verstärkten VASP-Phosphorylierung an Serin 239 führt. Damit liegt nahe, dass VASP P-Ser239 auch in Venen als Marker der Aktivität der Proteinkinase G I benutzt werden kann. Zieht man die oben genannten Arbeiten heran, so könnte man VASP P-Ser239 auch benutzen, um einen Hinweis auf die NO-Bioverfügbarkeit und die Integrität des sGC-cGMP-PKG I in Venen zu bekommen und sie zu überprüfen.

5. Endotheliale Dysfunktion

Krankheiten wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz, Koronare Herzkrankheit und Angina pectoris, sowie pathologische Zustände im Körper wie Hypercholesterinämie und Arteriosklerose sind mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert (Ruetten et al, 1999) (Kinlay, Ganz, 1997) (Guzik et al, 2000). Dieser Terminus wird für die Beeinträchtigung der endothelabhängigen Relaxation durch den Verlust der NO-Bioaktivität in der Gefäßwand verwendet (Cai & Harrison, 2000). Allgemeiner formuliert kann man auch von einer Störung des NO-sGC-cGMP-PKG I Signalweges sprechen, denn die NO-vermittelte Vasorelaxation kann an unterschiedlichen Stellen beeinträchtigt sein. So kann es zu einer erniedrigten NO-Bioverfügbarkeit durch die verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase kommen (Wilcox et al, 1997). Freie Radikale wie O_2^- können zu einer Verminderung von NO führen. In Tiermodellen mit Hypertonie, Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz und Hypercholesterinämie konnte mehrfach gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert werden, die zu einer NO-Abnahme im Gefäß führen (Cai, Harrison, 2000). In humanen Venen von Arteriosklerosepatienten kam es zur Produktion von freien Radikalen mit Abnahme der NO-Freisetzung und somit zur endothelialen Dysfunktion (Guzik et al, 2000). Bei einer endothelialen Dysfunktion ist die Hämgruppe der sGC entfernt oder kann oxidiert vorliegen. Sie ist somit unempfindlich gegenüber der Aktivierung von NO (Stasch et al, 2006). Die endotheliale Dysfunktion kann also durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden.

Die Behandlung der Hypertonie, des Diabetes mellitus, der Herzinsuffizienz, der Koronaren Herzkrankheit, der Angina pectoris und der Hypercholesterinämie besteht aus mehreren Behandlungssäulen mit nicht-medikamentösen und medikamentösen Maßnahmen. Die Behandlung der Koronaren Herzkrankheit und der Angina pectoris erfolgt regelmäßig mit organischen Nitraten oder anderen Nitrovasodilatoren. Diese Therapie beinhaltet mehrere Probleme. Chronische Anwendung ist mit einer Toleranzentwicklung assoziiert, die den Einsatz vieler Nitrate limitiert. Zudem können Nitrate zum oxidativen Stress beitragen (Stasch et al, 2006) und somit die endotheliale Dysfunktion verstärken.

Alternative Therapeutika aktivieren die sGC ohne Toleranzentwicklung. Die vorliegende Untersuchung mit BAY 41-2272 an humanen Venen bietet zu den bereits vorliegenden Daten zur Wirkung am arteriellen System einen ergänzenden Beitrag (Tab. 5). Dabei unterstützt die vorliegende Untersuchung die Vorstellung, dass BAY 41-2272 ein potenter Vasodilatator ist. Obwohl die Wirkung in denudierten Venen abgemindert ist, erfolgt doch eine Relaxation um 33 %. BAY 41-2272 scheint damit potentiell einsetzbar bei Erkrankungen mit endothelialer Dysfunktion. Es wird aber betont, dass die Wirkung von BAY 41-2272 bei Zuständen, in denen die Hämgruppe der sGC oxidiert oder entfernt ist, z.B. bei oxidativem Stress, deutlich vermindert oder wie nach ODQ- Zugabe sogar aufgehoben ist. Man könnte BAY 41-2272 daher einsetzen, um den Anteil der nicht oxidierten oder hämfreien sGC zu stimulieren und sie wieder sensibler für NO zu machen. Eine Kombination mit organischen Nitraten wäre auch denkbar, um die Vorlast- und Nachlast-senkende Wirkung beider Stoffgruppen in Kombination in der Therapie der Koronaren Herzkrankheit, der Angina pectoris oder der Hypertonie anzuwenden.

6. Zusammenfassung

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, vor allem die Koronare Herzkrankheit, führen in den westlichen Industrieländern nach wie vor die Todesursachenstatistik an. Die konventionelle und seit über 140 Jahren etablierte Therapie mit organischen Nitraten bietet neben allen ihren Vorzügen im Wirkungsprofil auch Nebenwirkungen, wie die Entwicklung einer Nitrattoleranz oder des Nitratkopfschmerzes. Mit der Entwicklung von BAY 41-2272, einem NO-unabhängigen und Häm-abhängigen Stimulator der löslichen Guanylatcyclase, wurde eine Substanz entwickelt, die ein ähnliches hämodynamisches Profil wie organische Nitrate aufweist. Es wurde als potentes Relaxans in intakten und denudierten arteriellen Gefäßen beschrieben.

Die vorliegende Arbeit sollte erstmalig die Hypothese prüfen, ob BAY 41-2272 humane intakte und denudierte Venen zu dilatieren vermag. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob BAY 41-2272 in humaner Vene über die Aktivierung des NO-sGC-cGMP-PKG I Signalweges wirkt.

6.1. Material und Methoden

Die Untersuchungen erfolgten an humanen Venen. Diese wurden in mit Krebs-Henseleit Puffer befüllten, 37 °C warmen und mit Carbogen begasten Organbädern untersucht. Zunächst wurde die glattmuskuläre Intaktheit mit 80 mM KCl untersucht. Venen ohne kontraktile Antwort wurden verworfen. Anschließend erfolgte der Kontraktionstest mit 1 µM PE. Die Venen, die sich kontrahierten wurden im Anschluss mit 1 µM ACh auf die Intaktheit ihres Endothels überprüft. Venen ohne eine dilatative Antwort auf ACh wurden ebenfalls verworfen.

Humane Venen wurden im Organbad kumulativen Dosiswirkungsversuchen mit BAY 41-2272 unterzogen. Die Versuche erfolgten an intakten und denudierten Venen. Zur Prüfung, ob BAY 41-2272 über den NO-sGC-cGMP-PKG I Signalweg an humanen Venen wirkt, wurden zusätzliche Dosiswirkungskurven nach ODQ-Gabe erstellt. Außerdem wurde VASP P-Ser239, ein Produkt der NO-sGC-cGMP-PKG I-Signalkaskade, im Western Blot-Verfahren analysiert. Dazu wurde VASP P-Ser 239 in nicht-inkubierten und mit BAY 41-2272 inkubierten Venen bestimmt und das Verhältnis der Phosphorylierung beider Gruppen miteinander verglichen.

6.2. Ergebnisse

1. BAY 41-2272 dilatiert humane intakte Venen potent von 10^{-11} M bis 10^{-3} M mit einer EC_{50} von 9,16 [-logM].
1. BAY 41-2272 dilatiert humane denudierte Venen von 10^{-11} M bis 10^{-3} M signifikant schwächer mit einer EC_{50} von 7,99 [-logM].
2. Die herabgesetzte vasodilatorische Potenz an isolierten denudierten Venen limitiert teilweise die Anwendung bei Zuständen mit endothelialer Dysfunktion.
3. BAY 41-2272 zeigte in den Versuchsreihen keine Toleranzentwicklung oder Tachyphylaxie bezüglich seiner dilatativen Wirkung an humanen Venen.
4. Die vollständige Inhibierung der BAY 41-2272 Wirkung an humanen Venen durch 10 μ M ODQ deutet darauf hin, dass in der Vene keine cGMP-unabhängigen Mechanismen von BAY 41-2272 zur Dilatation vorhanden sind.
5. Die Inhibierung durch ODQ bestätigt die Annahme, dass BAY 41-2272 in humaner Vene über eine Aktivierung der sGC wirkt.
6. Die quantitative Analyse von VASP P-Ser239 zeigt eine deutliche Mehrphosphorylierung von 40 % bei den mit BAY 41-2272 inkubierten Venen im Vergleich zu den Vehikel und erlaubt die Aussage, dass BAY 41-2272 über eine Aktivierung der NO-sGC-cGMP-PKG I-Signalkaskade wirkt.
7. Die quantitative Analyse von VASP P-Ser239 könnte auch bei humanen Venen verwendet werden, um einen Hinweis auf die NO-Bioverfügbarkeit und die Integrität des sGC-cGMP-PKG I-Signalweges in Venen zu bekommen oder sie zu überprüfen.

6.3. Schlussfolgerung

BAY 41-2272 ist ein potenter Dilator humaner Venen. Die dilatative Potenz ist in denudierten Venen vermindert und limitiert teilweise die Anwendung bei Zuständen mit endothelialer Dysfunktion. Die komplette Inhibierung der BAY 41-2272 Wirkung durch ODQ legt nahe, dass BAY 41-2272 an humanen Venen ausschließlich über den NO-sGC-cGMP-Signalweg wirkt.

Zusammenfassung

Die quantitative VASP- Ser239 Analyse könnte bei humanen Venen zum Nachweis der NO-Bioverfügbarkeit und der Integrität des sGC-cGMP-PKG I-Signalweges verwendet werden.

7. Literatur

1. Abel K, Mieskes G, Walter U. Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets. *FEBS Lett.* 1995; 370 (3):184-188
2. Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S, Hobbs AJ. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; 101 (5):1386-1391
3. Artz JD, Schmidt B, McCracken JL, Marletta MA. Effects of nitroglycerin on soluble guanylate cyclase: implications for nitrate tolerance. *J.Biol.Chem.* 2002; 277 (21):18253-18256
4. Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 1999; 18 (1):37-48
5. Baracat JS, Teixeira CE, Okuyama CE, Priviero FB, Faro R, Antunes E, de NG. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur.J.Pharmacol.* 2003; 477 (2):163-169
6. Barba G, Mullen MJ, Donald A, MacAllister RJ. Determinants of the response of human blood vessels to nitric oxide donors in vivo. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1999; 289 (3):1662-1668
7. Bawankule DU, Sathishkumar K, Sardar KK, Chanda D, Krishna AV, Prakash VR, Mishra SK. BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyridin-4-ylamine]-induced dilation in ovine pulmonary artery: role of sodium pump. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2005; 314 (1):207-213
8. Becker EM, onso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC.Pharmacol.* 2001; 1:13
9. Boerrigter G, Burnett JC, Jr. Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase with BAY 41-2272 in cardiovascular disease. *Cardiovasc.Drug Rev.* 2007; 25 (1):30-45
10. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Tsuruda T, Harty GJ, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC, Jr. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. *Circulation* 2003; 107 (5):686-689

11. Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90 (19):9191-9194
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72:248-254
13. Brunton TL. Use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet* 1867;
14. Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J.Biol.Chem.* 1994; 269 (20):14509-14517
15. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ.Res.* 2000; 87 (10):840-844
16. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; 99 (12):8306-8311
17. Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ.Res.* 1999; 84 (2):210-219
18. De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ.Res.* 1982; 51 (4):439-447
19. Evgenov OV, Kohane DS, Bloch KD, Stasch JP, Volpato GP, Bellas E, Evgenov NV, Buys ES, Gnoth MJ, Graveline AR, Liu R, Hess DR, Langer R, Zapol WM. Inhaled agonists of soluble guanylate cyclase induce selective pulmonary vasodilation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2007; 176 (11):1138-1145
20. Feil R, Kemp-Harper B. cGMP signalling: from bench to bedside. Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications. *EMBO Rep.* 2006; 7 (2):149-153
21. Friebe A, Schultz G, Koesling D. Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.* 1996; 15 (24):6863-6868
22. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci.Rep.* 1999; 19 (4):235-251
23. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989; 3 (9):2007-2018

24. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288 (5789):373-376
25. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991; 14 (2):60-67
26. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol.Pharmacol.* 1995; 48 (2):184-188
27. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc.Res.* 2002; 55 (2):250-260
28. Gori T, Parker JD. Nitrate tolerance: a unifying hypothesis. *Circulation* 2002; 106 (19):2510-2513
29. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ.Res.* 2000; 86 (9):E85-E90
30. Halbrugge M, Walter U. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur.J.Biochem.* 1989; 185 (1):41-50
31. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005; 6 (2):150-166
32. Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br.J.Pharmacol.* 2002; 136 (5):637-640
33. Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol.Sci.* 1997; 18 (12):484-491
34. Hobbs AJ, Moncada S. Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. *Vascul.Pharmacol.* 2003; 40 (3):149-154
35. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J.Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 10):1671-1676
36. Ibarra-Alvarado C, Galle J, Melichar VO, Mameghani A, Schmidt HH. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol.Pharmacol.* 2002; 61 (2):312-319
37. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1999; 34 (6):879-886

38. Kemp-Harper B, Luk J, Favalaro J, Stasch JP, Schmidt H. Oxidised sGC: a novel therapeutic target in the vasculature. *BMC.Pharmacol.* 2007; 7(Supp I)
39. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am.J.Cardiol.* 1997; 80 (9A):111-161
40. Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 1994; 84 (12):4226-4233
41. Koesling D, Friebe A. Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 1999; 135:41-65
42. Koglin M, Stasch JP, Behrends S. BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002; 292 (4):1057-1062
43. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc.Res.* 1999; 43 (3):562-571
44. Kojda G, Patzner M, Hacker A, Noack E. Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Mol.Pharmacol.* 1998; 53 (3):547-554
45. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (5259):680-685
46. Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J.Appl.Physiol* 2001; 91 (3):1421-1430
47. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol.Rev.* 2000; 52 (3):375-414
48. Markert T, Krenn V, Leebmann J, Walter U. 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.* 1996; 91 (5):337-343
49. Masuyama H, Tsuruda T, Kato J, Imamura T, Asada Y, Stasch JP, Kitamura K, Eto T. Soluble guanylate cyclase stimulation on cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertension* 2006; 48 (5):972-978
50. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Msol.Pharmacol.* 2003; 64 (3):533-546

51. Minamiyama Y, Takemura S, Akiyama T, Imaoka S, Inoue M, Funae Y, Okada S. Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett.* 1999; 452 (3):165-169
52. Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koesling D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J.Cell Biol.* 2003; 160 (5):719-727
53. Mullershausen F, Koesling D, Friebe A. Negatives 'Feed- back' innerhalb der NO/ cGMP Signalkaskade. *Biospektrum* 2003; (6)
54. Mullershausen F, Lange A, Mergia E, Friebe A, Koesling D. Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Mol.Pharmacol.* 2006; 69 (6):1969-1974
55. Mullershausen F, Russwurm M, Friebe A, Koesling D. Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. *Circulation* 2004; 109 (14):1711-1713
56. Mulsch A, Bara A, Mordvintcev P, Vanin A, Busse R. Specificity of different organic nitrates to elicit NO formation in rabbit vascular tissues and organs in vivo. *Br.J.Pharmacol.* 1995; 116 (6):2743-2749
57. Mulsch A, Bauersachs J, Schafer A, Stasch JP, Kast R, Busse R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 120 (4):681-689
58. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Munzel T. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 2001; 103 (17):2188-2194
59. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci.Rep.* 1999; 19 (3):133-154
60. Nimmegeers S, Sips P, Buys E, Brouckaert P, Van d, V. Functional role of the soluble guanylyl cyclase alpha(1) subunit in vascular smooth muscle relaxation. *Cardiovasc.Res.* 2007; 76 (1):149-159
61. Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Munzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ.Res.* 2000; 87 (11):999-1005
62. Papapetropoulos A, bou-Mohamed G, Marczin N, Murad F, Caldwell RW, Catravas JD. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. *Br.J.Pharmacol.* 1996; 118 (6):1359-1366

63. Papapetropoulos A, Go CY, Murad F, Catravas JD. Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* 1996; 117 (1):147-155
64. Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro. *Br.J.Pharmacol.* 1992; 107 (1):178-184
65. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 1998; 17 (11):3045-3051
66. Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 1999; 135:105-149
67. Pickard RS, Powell PH, Zar MA. Nitric oxide and cyclic GMP formation following relaxant nerve stimulation in isolated human corpus cavernosum. *Br.J.Urol.* 1995; 75 (4):516-522
68. Priviero FB, Baracat JS, Teixeira CE, Claudino MA, de NG, Antunes E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 2005; 32 (9):728-734
69. Reinhard M, Halbrugge M, Scheer U, Wiegand C, Jockusch BM, Walter U. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* 1992; 11 (6):2063-2070
70. Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ.Res.* 1999; 85 (6):534-541
71. Schafer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Munzel T, Walter U, Smolenski A. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem.Pharmacol.* 2003; 65 (3):397-405
72. Schipke JD, Heusch G, Deussen A, Thamer V. Acetylcholine induces constriction of epicardial coronary arteries in anesthetized dogs after removal of endothelium. *Arzneimittelforschung.* 1985; 35 (6):926-929
73. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim.Biophys.Acta* 1993; 1178 (2):153-175
74. Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. 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.* 1996; 50 (1):1-5

75. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmuller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Munzel T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 2002; 105 (10):1170-1175
76. Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J.Biol.Chem.* 1998; 273 (32):20029-20035
77. Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, Walter U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1998; 358 (1):134-139
78. Soff GA, Cornwell TL, Cundiff DL, Gately S, Lincoln TM. Smooth muscle cell expression of type I cyclic GMP-dependent protein kinase is suppressed by continuous exposure to nitrovasodilators, theophylline, cyclic GMP, and cyclic AMP. *J.Clin.Invest* 1997; 100 (10):2580-2587
79. Stasch JP, Becker EM, onso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; 410 (6825):212-215
80. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, AK HS, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Muller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Muller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J.Clin.Invest* 2006; 116 (9):2552-2561
81. Straub A, et-Buckholz J, Frode R, Kern A, Kohlsdorfer C, Schmitt P, Schwarz T, Siefert HM, Stasch JP. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg.Med.Chem.* 2002; 10 (6):1711-1717
82. Straub A, Stasch JP, onso-Alija C, et-Buchholz J, Ducke B, Feurer A, Furstner C. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 2001; 11 (6):781-784
83. Teixeira CE, Priviero FB, Todd J, Jr., Webb RC. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms **B**. *Hypertension* 2006; 47 (3):596-602

84. Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole] *A. J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2006; 317 (1):258-266
85. Toque HA, Antunes E, Teixeira CE, de NG. Increased Cyclic Guanosine Monophosphate Synthesis and Calcium Entry Blockade Account for the Relaxant Activity of the Nitric Oxide-Independent Soluble Guanylyl Cyclase Stimulator BAY 41-2272 in the Rabbit Penile Urethra. *Urology* 2008;
86. Waldmann R, Nieberding M, Walter U. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur.J.Biochem.* 1987; 167 (3):441-448
87. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997; 17 (11):2479-2488
88. Zanfolin M, Faro R, Araujo EG, Guaraldo AM, Antunes E, de NG. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2006; 47 (3):391-395

Danksagung

An erster Stelle möchte mich bei meinem akademischen Lehrer und Doktorvater Professor Schipke bedanken, der mir dieses Dissertationsthema gegeben und mich über die ganze Zeit als mein Doktorvater unterstützt hat. Seine Impulse sowie sein Vertrauen haben mich immer wieder angespornt. Er hat es mir ermöglicht, meine Arbeit auf Tagungen und Seminaren vorzustellen. Ich habe viel hinzugelernt und mich im wissenschaftlichen Bereich weiterentwickeln können.

Ich möchte auch Herrn Professor Kojda und seiner ganzen Arbeitsgruppe danken, mir ermöglicht zu haben, unter der fachlich kompetenten und stets freundlichen Führung Western Blot-Analysen durchzuführen. Auch viele weitere Kollegen haben zur Überwindung der einen oder anderen wissenschaftlichen und praktischen Hürde beigetragen. Besonders erwähnen möchte ich gern Dr. David Calvo Sanchez und Martina Stuff. Ganz besonderer Dank gilt dabei vor allem Stephanie Han-Whei Kumpf, die das Entstehen der Arbeit ausgesprochen positiv beeinflusst hat.

Ich danke Herrn Professor Hohlfeld für seine Zeit und Aufmerksamkeit für Korrekturen und Anregungen, die Dissertation besser zu gestalten.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Bereitstellung eines Laborplatzes durch Herrn Prof. Gams an der Klinik für Kardiovaskuläre- und Thoraxchirurgie in der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie ermöglicht.

Frau Rummel möchte ich für die präzise Korrektur der Arbeit und Hilfe beim Layout herzlichst danken.

Schließlich möchte ich meiner ganzen Familie, besonders meinen Eltern, als auch meinen Freunden für ihren Einsatz und die Unterstützung danken.

Eva Debowski

Kongressbeiträge

- 3rd International Symposium of the Collaborative Research Center (SFB) 553 vom 04.-06. Oktober 2007, Mainz

Posterpräsentation am 04. Oktober 2007:

‘Action of a novel NO-independent activator of the guanylylcyclase on human veins’

- XIII. Kardiologisch - Hämostaseologischen Workshop vom 11.-12. November 2007, Langenfeld:

Vortrag am 12. November 2007:

‘A novel activator of the guanylylcyclase and its effects on human veins’

- 32. Herbsttagung und 19. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Herzschrittmacher und Arrhythmie, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, vom 09.-11. Oktober 2008, Hamburg

Posterpräsentation am 09. Oktober 2008:

Wirkung und Potenz eines Stimulators der löslichen Guanylatcyclase an humaner Vene

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Debowski
Vorname: Eva
Geburtsdatum: 21.09.1982
Geburtsort: Sensburg, Polen

Schulischer Werdegang

08/89 -06/93 Maria Montessori Grundschule - Düsseldorf
08/93 - 07/02 Quirinus-Gymnasium - Neuss, Abitur mit 1,8

Studium der Humanmedizin

10/02 **Studium der Humanmedizin** an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
05/02- 07/04 **Krankenpflegepraktikum** im Lukaskrankenhaus Neuss
09/04 **Ablegung der Vorärztliche Prüfung** mit 1,6 (gut)
02/05- 03/05 **Famulatur** in der unfallchirurgischen Ambulanz,
Lukaskrankenhaus Neuss
08/05- 09/05 **Famulatur** in der medizinischen Klinik, Sana Krankenhaus
Bergen auf Rügen
08/06- 07/06 **Famulatur** in der Praxis Neurologie und Psychiatrie,
Düsseldorf
02/07- 03/07 **Famulatur** in der chirurgischen Klinik,
Western Health Hospital, Melbourne, Australia

Lebenslauf

- 08/07- 07/08 **Praktisches Jahr** an der Universitätsklinik Düsseldorf,
Wahlfach Gynäkologie
- 11/08 **Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung** mit 2,0 (gut)
- 12/08 **Approbation als Ärztin**
- Seit 01/09 **Beschäftigung als Assistenzärztin** in der Frauenklinik,
Klinikum Leverkusen

Klinische Nebentätigkeit

- 09/03- 09/05 studentische Hilfskraft am Institut für Hämostaseologie und
Transfusionsmedizin, insbesondere im Laborbereich der
Klinischen Chemie, Universitätsklinikum Düsseldorf
(Kontrolle und Eingabe von Messwerten und Patientendaten,
Durchführung von Blutausstrichen und Auswertung; Durch-
führung von Blutgasanalysen)
- 09/05- 07/07 studentische Hilfskraft am Institut für Hämostaseologie und
Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf
(Erfassung von Patientendaten im Rahmen einer internatio-
nalen Studie zu venösen thromboembolischen Ereignissen
(Improve), Aktualisierung und Pflege der Datenbank, die der
Düsseldorfer Thrombophilie-Studie zugrunde liegt; Mithilfe
bei der Erstellung von Publikationen; Bedienung des Rota-
tionsthrombo-Elastogramms (ROTEM); selbständige Erhe-
bung von Daten gesunder Kontrollpersonen für Fall-Kontroll-
Studien)