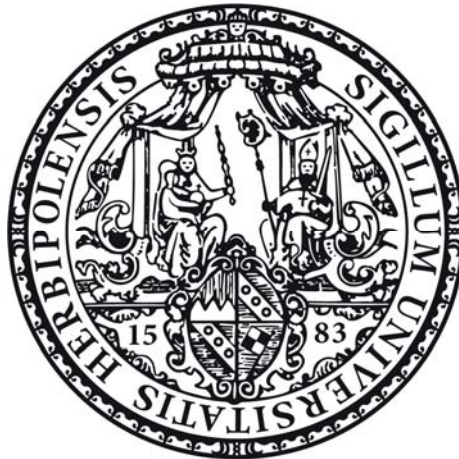


# Funktion der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in der glatten Muskulatur

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von  
Dieter Groneberg

aus Belo Horizonte (Brasilien)

Würzburg 2011

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

\_\_\_\_\_

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

\_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am

\_\_\_\_\_

Für meine geliebten Eltern. Mit all meiner  
Liebe und Dankbarkeit für alles, was sie für  
mich getan und mir ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1. Die cGMP-vermittelte Signaltransduktion	6
1.1.1. Stickstoffmonoxid (NO)	8
1.1.2. NO-Synthasen (NOS)	8
1.1.3. cGMP als sekundärer Botenstoff	9
1.2. Guanylyl-Cyclasen (GC)	9
1.2.1. Peptid-aktivierte Guanylyl-Cyclasen (pGC)	9
1.2.2. NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen (NO-GC)	10
1.3. cGMP-Effektorproteine	11
1.3.1. cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG)	12
1.3.2. cGMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDE)	12
1.3.3. cGMP-regulierte Ionenkanäle	13
1.4. Glatte Muskulatur	13
1.5. Modellsystem der glatten Muskulatur	15
1.6. Interstitielle Zellen von Cajal	16
1.7. Pharmakologische Beeinflussung der intrazellulären cGMP-Spiegel	17
1.8. Transgene Mausmodelle	18
1.8.1. KO-Mausmodelle für die NOS	18
1.8.2. KO-Mausmodelle für die NO-GC	19
1.8.3. KO-Mausmodelle für die PKG	20
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1. Chemikalien	24
3.2. Antikörper für Western-Blot	24
3.3. Verwendete Geräte	25
3.4. Routinemethoden	25
3.4.1. Proteinbestimmung	25
3.4.2. Gelelektrophorese	25
3.4.3. Western-Blot	25
3.4.4. Gewinnung der Western-Proben	26
3.5. Immunhistochemische Analyse	27
3.6. Radioimmunoassay	27
3.6.1. Herstellung von radioaktiv markiertem cGMP (Tracer)	27
3.6.2. Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung von cGMP	28
3.6.3. Messung der cGMP-Antwort in Aortenringen	29

3.7. Tiere und Präparation	29
3.7.1. Haltung und Zucht	29
3.7.2. Induktion des KOs mittels Tamoxifen-Injektion	31
3.7.3. Lyse des Gewebes zur Isolierung von genomischer DANN	31
3.7.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.7.5. Agarose-Gelelektrophorese	32
3.8. Organbad	33
3.8.1. Lösungen, Puffer	33
3.8.2. Präparation der Gewebestücke	33
3.8.3. Einspannen und Messung der Proben im Organbad	34
3.8.4. Elektrische Feldstimulation der Fundus-Streifen	35
3.9. In vivo Messungen	35
3.9.1. Messung des Blutdrucks	35
3.9.2. Darm-Passagezeit	36
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1. Die Funktion der NO-GC der glatten Muskulatur im vaskulären System	37
4.1.1. Generierung der SM-GCKO-Mäuse	37
4.1.2. Zeitverlauf der NO-GC-Deletion	38
4.1.3. Analyse der mRNA der NO-GC-Untereinheiten in der Aorta mittels PCR	40
4.1.4. Messung der NO-induzierten cGMP-Produktion mittels RIA	40
4.1.5. Immunhistochemie der glatten Gefäßmuskulatur	43
4.1.6. Nachweis der NO-GC-Expression in Thrombozyten-Lysat und Hirn-Homogenat	43
4.1.7. Relaxation der Aortenringe im Organbad	43
4.1.7.1. NO-induzierte Relaxation der glatten Aortenmuskulatur	43
4.1.7.2. Zeitabhängige Verminderung der endogenen NO-Relaxation	46
4.1.7.3. Sildenafil-induzierte Relaxation der glatten Muskulatur von Aorten	49
4.1.7.4. Relaxation der glatten Muskulatur durch 8-Br-cGMP und ANP	49
4.1.8. Vergleich des zeitlichen Verlaufs von NO-GC-Expression, cGMP-Produktion und NO-induzierter Relaxation nach Tamoxifen-Injektion	52
4.1.9. Messung des Blutdrucks	55
4.1.9.1. Messung des systolischen Blutdrucks mittels Schwanz-Plethysmographie	55
4.1.9.2. Blockade der NO-Synthase mittels L-NAME	55
4.2. Die Funktion der NO-GC der glatten Muskulatur im gastrointestinalen System	58
4.2.1. Messung der Transportzeit der Nahrung durch den GIT	58
4.2.2. Messung der Relaxation verschiedener darmabschnitte von GCKO-Tieren im Organbad	60
4.2.2.1. NO-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen von GCKO-Tieren	60
4.2.2.2. NO-induzierte Relaxation der LES von GCKO-Tieren	62
4.2.2.3. NO-induzierte Relaxation der Duodenum-Ringe von GCKO-Tieren	62
4.2.3. Relaxation gastrointestinaler Gewebe von SM-GCKO-Tieren	62
4.2.3.1. NO-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen von SM-GCKO>50d-Tieren	64
4.2.3.2. 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen und LES	64
4.2.3.3. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen von SM-GCKO-Tieren unter NANC-Bedingungen	66

4.2.3.4. DEA-NO-induzierte Relaxation von LES	66
4.2.3.5. Cyclische Kontraktion des Dünndarms	66
4.2.3.6. NO-induzierte Relaxation der Duodenum-Ringe von SM-GCKO>50d –Tieren	70
4.2.3.7. NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen in der Anwesenheit von Nifedipin	70
4.2.3.8. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen in der Anwesenheit von Nifedipin	73
4.2.4. Immunhistochemie des Fundus der GCKO- und SM-GCKO>50d-Tiere	73
<b>4.3. Die Funktion der NO-GC der glatten Muskulatur im gastrointestinalen System von ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tieren</b>	<b>75</b>
4.3.1. Immunhistochemie des Fundus der ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tiere	77
4.3.2. In vitro Messung der Relaxationsfähigkeit gastrointestinaler Gewebe von ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tieren	77
4.3.2.1. DEA-NO-induzierte Relaxation des Fundus von ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tieren	77
4.3.2.2. Konzentrations-Wirkungs-Kurven an LES für DEA-NO	80
4.3.2.3. DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen in Anwesenheit von Nifedipin	80
4.3.2.4. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen unter NANC-Bedingungen	80
4.3.2.5. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen ohne NANC-Bedingungen	81
4.3.3. Messung der Transportzeit durch den GIT	81
<b>5. Diskussion</b>	<b>86</b>
5.1. Bedeutung der NO-GC in der glatten Muskulatur für den Blutdruck	86
5.2. Bedeutung der NO-GC der glatten Muskulatur für die Motilität	89
5.2.1. Glattmuskel-spezifische KOs der NO-GC	89
5.2.2. Cajal-spezifische- und Cajal + Glattmuskel-spezifische-KOs der NO-GC	91
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6. Summary</b>	<b>95</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>8. Eigene Publikationen</b>	<b>108</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>111</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	=	$\alpha$ -Glattmuskel-Aktin
ANP	=	atriales natriuretisches Peptid
BKCa-Kanal	=	kalziumaktivierter Kaliumkanal
BNP	=	B-Typ natriuretisches Peptid
cAMP	=	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAK	=	cAMP-abhängige Proteinkinase
CCh	=	Carbachol
CFTR-Kanal	=	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	=	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNG-Kanäle	=	cGMP-abhängige Ionenkanäle
CNP	=	C-Typ natriuretisches Peptid
CreER <sup>T2</sup>	=	Cre-Recombinase mit einer modifizierten Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne
DAG	=	Diacylglycerol
EDRF	=	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	=	endotheliale NOS
EFS	=	elektrische Feldstimulation
ES	=	embryonale Stammzellen
FLC	=	fibroblast-like cells
FITC-AK	=	Fluoresceinisothiocyanat-markierter-Antikörper
GC	=	Guanylyl-Cyclase
GCKO	=	Guanylyl-Cyclase Knockout
GPCR	=	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
IBMX	=	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICC	=	Interstitielle Zellen von Cajal
ICC-IM	=	intramuskuläre ICC
iNOS	=	induzierbare NOS
IRAG	=	IP <sub>3</sub> -receptor-associated cGMP-dependent kinase-substrate
IP <sub>3</sub>	=	Inositol-1,4,5-triphosphat
K-H-Lösung	=	Krebs-Henseleit-Lösung
LES	=	Lower Ösophagussphinkter
L-NAME	=	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester
MLC	=	leichte-Myosin-Kette
MLCK	=	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	=	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
NANC	=	nicht-adrenerge-nicht-cholinerge
NO	=	Stickstoffmonoxid
NO-GC	=	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
NOS	=	NO-Synthase
nNOS	=	neuronale NOS
p42/p44 Erk	=	Extracellular-signal regulated kinase
PAGE	=	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	=	Phosphodiesterase
pGC	=	Partikuläre Guanylyl-Cyclase
PIP <sub>2</sub>	=	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	=	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	=	cGMP-abhängigen Proteinkinasen
PLC <sub><math>\beta</math></sub>	=	Phospholipase C <sub><math>\beta</math></sub>
PRP	=	plättchenreiches Plasma
PS	=	Pylorusphinkter
ODQ	=	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
RIA	=	Radioimmunoassay
ROK	=	Rho-Kinase
SBP	=	Systolischer Blutdruck
SM-GCKO	=	Glattmuskel spezifischer Guanylyl-Cyclase Knockout
SMMHC	=	smooth muscle myosin heavy chain
TxA <sub>2</sub>	=	Thromboxan A <sub>2</sub>
VIP	=	vasoaktives intestinales Peptid

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Die NO/cGMP-Signalkaskade .....	7
<b>Abb. 2:</b>	Kontrahierende und relaxierende Signalwege in der glatten Muskulatur.....	14
<b>Abb. 3:</b>	Generierung der KO-Mausmodelle .....	30
<b>Abb. 4:</b>	Zeitschema der Erzeugung der SM-GCKO-Mäuse .....	39
<b>Abb. 5:</b>	mRNA-Expression der $\beta_1$ -Untereinheit .....	41
<b>Abb. 6:</b>	DEA-NO-induzierte cGMP-Produktion in der Aorta von SM-GCKO-Mäusen ...	42
<b>Abb. 7:</b>	Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression .....	44
<b>Abb. 8:</b>	Expression der NO-GC in Hirn-Homogenaten und Thrombozyten .....	45
<b>Abb. 9:</b>	NO-vermittelte Aorten-Relaxation im Organbad .....	47
<b>Abb. 10:</b>	NO-induzierte Relaxation der Aorten im Organbad .....	48
<b>Abb. 11:</b>	Verlust der Relaxation der glatten Aortenmuskulatur durch endotheliales NO ..	50
<b>Abb. 12:</b>	Sildenafil-induzierte Relaxation von Aortenringen.....	51
<b>Abb. 13:</b>	Relaxation von Aorta-Ringen durch 8-Br-cGMP und ANP .....	53
<b>Abb. 14:</b>	Vergleich des zeitlichen Verlaufs von NO-GC-Expression, cGMP-Produktion und NO-induzierter Relaxation nach Tamoxifen-Injektion .....	54
<b>Abb. 15:</b>	Entstehung der Hypertonie in SM-GCKO-Mäusen .....	56
<b>Abb. 16:</b>	L-NAME-induzierte Hemmung der NOS in vivo .....	57
<b>Abb. 17:</b>	Messung der Transportzeit durch den GIT .....	59
<b>Abb. 18:</b>	NO-induzierte Relaxation von Fundus- und LES-Glattmuskel-Gewebe der GCKO-Tiere .....	61
<b>Abb. 19:</b>	NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen der SM-GCKO- und WT-Tiere..	63
<b>Abb. 20:</b>	8-Br-cGMP-induzierte Relaxation von LES und Funden aus GCKO- und SM- GCKO-Tieren .....	65
<b>Abb. 21:</b>	Relaxation der Fundus-Streifen mittels EFS .....	67
<b>Abb. 22:</b>	NO-induzierte Relaxation des LES .....	68
<b>Abb. 23:</b>	Cyclische Kontraktion des Dünndarms .....	69
<b>Abb. 24:</b>	NO-induzierte Relaxation des Duodenums der SM-GCKO <sub>&gt;50d</sub> -Tiere .....	71
<b>Abb. 25:</b>	NO-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen in Anwesenheit von Nifedipin ...	72
<b>Abb. 26:</b>	EFS-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen in Anwesenheit von Nifedipin..	74
<b>Abb. 27:</b>	Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression im Fundus von WT-, GCKO- und SM-GCKO <sub>&gt;d50</sub> -Tieren .....	76
<b>Abb. 28:</b>	Immunhistochemische Analyse des Fundus der WT- und dbl-GCKO-Tiere .....	78
<b>Abb. 29:</b>	NO-induzierte Relaxation von GIT-Gewebe von ICC-GCKO- und dbl-GCKO- Tieren.....	79
<b>Abb. 30:</b>	EFS-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen unter NANC-Bedingungen.....	82
<b>Abb. 31:</b>	EFS von Fundus-Streifen ohne NANC-Bedingungen .....	83
<b>Abb. 32:</b>	Gastrointestinale Transportzeit .....	84
<b>Abb. 33:</b>	Model der nitrogenen Relaxation .....	93



# Einleitung

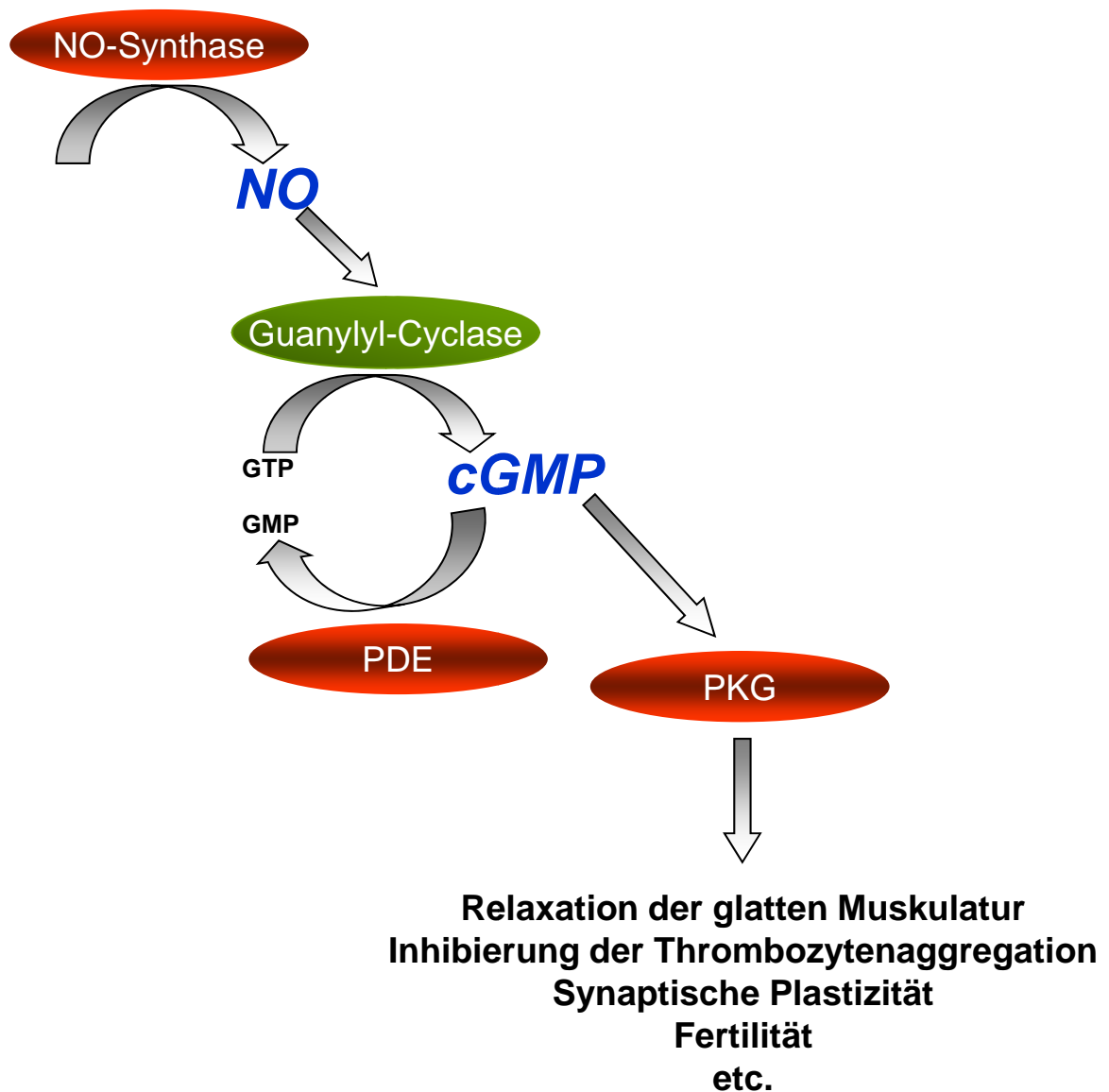
## 1.1. Die cGMP-vermittelte Signaltransduktion

Das intrazelluläre Signalmolekül cGMP reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen. In der glatten Muskulatur führt die Aktivierung der NO/cGMP-Kaskade zu einer Relaxation des Gewebes. Diese relaxierende Funktion ist besonders wichtig im kardiovaskulären System (Diamond *et al.*, 1978; Schultz *et al.*, 1978; Axelsson *et al.*, 1979). Ebenfalls führt die NO/cGMP-Signalkaskade in allen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts zu einer Relaxation der glatten Muskulatur (Bult *et al.*, 1990; Moncada *et al.*, 1991; Murty *et al.*, 2006). Die NO/cGMP-Signalkaskade ist dabei ein wichtiger Bestandteil der fein ausbalancierten Peristaltik, die durch ständige Kontraktion und Relaxation die gerichtete Propulsion der Nahrung gewährleistet.

In der Retina ist cGMP entscheidend an der Übertragung des Lichtreizes beteiligt (Stryer *et al.*, 1981; Fesenko *et al.*, 1985; Nakatani und Yau, 1985), auch in verschiedenen Zellen des ZNS konnte das Signalmolekül cGMP nachgewiesen werden. In Thrombozyten führt die Kaskade zu einer Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation (Böhme *et al.*, 1974; Haslam *et al.*, 1978; Mellion *et al.*, 1981; Walter und Gambaryan, 2004).

cGMP wird durch die Guanylyl-Cyclasen (GC) gebildet. Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) wird durch Bindung des membrangängigen Stickstoffmonoxids (NO) aktiviert (Schultz *et al.*, 1977; Murad *et al.*, 1978; Böhme *et al.*, 1978), während die partikuläre Guanylyl-Cyclase durch natriuretische Peptide aktiviert wird (Flynn *et al.*, 1983; Waldman *et al.*, 1984; Winkquist *et al.*, 1984).

Die physiologischen Effekte von cGMP werden durch verschiedene Effektorproteine vermittelt. Dazu gehören cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDE), cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) und cGMP-abhängige Ionenkanäle (CNG-Kanäle). Das sowohl von der NO-GC als auch von der partikulären-GC (pGC) gebildete cGMP wird durch PDEs abgebaut. Die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktion ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Die einzelnen Komponenten dieser Signalkaskade sollen im Folgenden näher beschrieben werden.



**Abb. 1: Die NO/cGMP-Signalkaskade**

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet. Die NO-induzierte Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclasen (NO-GC) führt zur gesteigerten cGMP-Synthese. Der sekundäre Botenstoff cGMP bewirkt eine Aktivierung von cGMP-Effektorproteinen (z.B. cGMP-abhängige Proteinkinase, PKG). Die Aktivierung der PKG führt zu etlichen physiologischen Effekten. Der Abbau des entstandenen cGMPs zu GMP wird in Geweben durch Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert.

### 1.1.1. Stickstoffmonoxid (NO)

Das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal, welches aufgrund seiner Lipophilie und geringen Größe in der Lage ist, in cytosolische und membranöse Kompartimente zu diffundieren und somit als intra- und interzelluläres Signalmolekül zu wirken. Die Halbwertszeit des NO im Gewebe beträgt nur wenige Sekunden, wodurch NO nur lokal Effekte hervorruft. Schon 1980 zeigten Furchgott und Zawadzki, dass der vasodilatierende Effekt von Acetylcholin durch einen labilen endothelabhängigen Faktor (endothelium-derived relaxing factor (EDRF)) hervorgerufen wird. 1987 konnte durch Ignarro und Palmer gezeigt werden, dass NO dieser endothelabhängige Faktor ist (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Die physiologische Bedeutung von NO als Signalmolekül konnte unter anderem im kardiovaskulären, neuronalen und gastrointestinalen Gewebe gezeigt werden (Gibaldi *et al.*, 1993; Garthwaite und Boulton 1995; Murad *et al.*, 1996; Ignarro *et al.*, 1999).

Für die Aufklärung, dass es sich bei EDRF um NO handelt und dass es durch NO zur Stimulation der NO-GC und somit zur Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP kommt, erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Physiologie.

### 1.1.2. NO-Synthasen (NOS)

Die Aminosäure Arginin führt zu einer Stimulation der cGMP-Bildung. Dieser Effekt wurde bereits in den achtziger Jahren in Neuroblastomzellen beschrieben (Deguchi und Yoshioka, 1982). Dieser Befund erklärt sich dadurch, dass die NOS die Umsetzung von Arginin zu Citrullin und NO katalysiert. Mittlerweile konnte die Produktion von NO in verschiedenen Zelltypen und Geweben gezeigt werden (Knowles *et al.*, 1989; Schmidt und Murad, 1991; Wei *et al.*, 1995).

Es sind drei Isoformen der NOS bekannt, wovon zwei konstitutiv exprimiert werden: die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Eine weitere NOS wird induzierbar exprimiert (iNOS) (Förstermann *et al.*, 1994). Als Kofaktoren enthalten diese Enzyme FAD, FMN, NADPH, Tetrahydrobiopterin und eine prosthetische Häm-Gruppe (Mayer *et al.*, 1990; Klatt *et al.*, 1992).

Die nNOS kommt hauptsächlich im Gehirn und in neuronalen Geweben vor, wurde aber auch in epithelialen Zellen (Schmidt und Walter, 1994) sowie in glatten Muskelzellen (Loesch und Burnstock, 1995) nachgewiesen. Die eNOS ist in Endothelzellen lokalisiert (Gyurko *et al.*, 2000), wurde aber auch in Nervenzellen gefunden (Kantor *et al.*, 1996). Die Stimulation dieser beiden konstitutiv exprimierten NOS (eNOS, nNOS) erfolgt durch Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexes, der bei Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels in der Zelle entsteht (Bredt und Snyder, 1990). Die iNOS

wird im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr hauptsächlich in Makrophagen induziert exprimiert (Stuehr *et al.*, 1991). Man nimmt allerdings an, dass die iNOS in fast allen Zellen des Körpers exprimiert werden kann (Nathan und Hibbs, 1991; Schmidt und Walter, 1994; Loscalzo *et al.*, 2001). Die iNOS produziert dabei sehr hohe cytotoxische NO-Konzentrationen.

### **1.1.3. cGMP als sekundärer Botenstoff**

Nach der Entdeckung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) als sekundärer Botenstoff wurde nach weiteren cyclischen Nukleotiden gesucht. cGMP wurde schließlich im Rattenurin (Ashman *et al.*, 1963) und später in fast allen Säugetiergeweben nachgewiesen (Goldberg *et al.*, 1969). Die Synthese von cGMP wird durch die Familie der Guanylyl-Cyclasen katalysiert, dabei wird unter Abspaltung von Pyrophosphat eine Cyclisierung des GTP zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) vollzogen. Das gebildete cGMP aktiviert mehrere Effektorproteine (cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und cGMP-regulierte Ionenkanäle) und vermittelt so das extrazelluläre Signal (Lucas *et al.*, 2000).

## **1.2. Guanylyl-Cyclasen (GC)**

Es existieren zwei unterschiedliche GC die entweder von NO oder Peptiden aktiviert werden können. Historisch wurden sie als membrangebundene und cytosolische GC bezeichnet. Da aber auch für das als `cytosolisch` bezeichnete Enzym eine Assoziation an die Plasmamembran nachgewiesen werden konnte, ist diese Nomenklatur nicht mehr haltbar (Russwurm *et al.*, 2001). In dieser Arbeit sollen daher im Folgenden die GC entsprechend ihrer Aktivierungsmechanismen unterteilt werden. Daher werden die membrangebundene GC als Peptid-aktivierte GC (pGC) und die cytosolische GC als NO-sensitive GC (NO-GC) bezeichnet. Beide Cyclase-Formen werden im Weiteren näher beschrieben.

### **1.2.1. Peptid-aktivierte Guanylyl-Cyclasen (pGC)**

Peptid-aktivierte GC sind Transmembranproteine, deren Primärstruktur in drei Abschnitte unterteilt werden kann: Eine N-terminale extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine die Zellmembran durchspannende Domäne und eine C-terminale katalytische Domäne. Durch die Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung der pGC, was eine Aktivierung der intrazellulären Guanylyl-Cyclase-Domäne der pGC und damit eine gesteigerte cGMP-Bildung zur Folge hat.

Bekannt sind sieben verschiedene pGC, die mit GC-A bis GC-G bezeichnet werden (Kuhn *et al.*, 2009). Sie unterscheiden sich in erster Linie in ihrer Ligandenbindungsdomäne, die die Spezifität der jeweiligen Isoform bestimmt. Nur für GC-A, GC-B und GC-C wurden bislang physiologische Liganden identifiziert (Bennett *et al.*, 1991). Die GC-A wird hauptsächlich in der Niere, der glatten Gefäßmuskulatur, der Nebenniere und anderen Geweben exprimiert (Lowe *et al.*, 1989). An die GC-A binden die Peptidhormone ANP (atriales natriuretisches Peptid) und BNP (natriuretisches Peptid Typ B). ANP wird von atrialen Myokardzellen bei Dehnung des Vorhofgewebes ausgeschüttet und ist funktioneller Antagonist des blutdrucksteigernden Aldosterons. Eine ANP-Ausschüttung führt zur Diurese und Natriurese sowie zu einer Vasodilatation. Darüber hinaus führt ANP über Stimulation der auf dem Endothel exprimierten GC-A zu einer erhöhten Permeabilität des mikrovaskulären Endothels und somit zu Hypovolämie (Schreier *et al.*, 2008). Damit wirken die durch ANP hervorgerufenen Effekte einem erhöhten Blutdruck und Blutvolumen entgegen.

Die GC-B wird in vielen Geweben exprimiert. Besonders starke Expression ist in Fibroblasten vorhanden (Schulz *et al.*, 1989). Der Aktivator des Rezeptors GC-B ist das C-Typ natriuretische Peptid (CNP). CNP wird in Endothelzellen, in Neuronen und in Makrophagen synthetisiert. Die Aktivierung der GC-B resultiert in einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Die GC-C wird durch Guanylin aktiviert und vornehmlich im Intestinaltrakt, aber auch in Niere, Hoden, Plazenta und Leber exprimiert (Kuhn *et al.*, 2009). Als erster Ligand wurde das hitzestabile Enterotoxin STa identifiziert, das von *E. coli*-Bakterien gebildet werden kann (Schulz *et al.*, 1990; Forte und Currie, 1995). Die STa-vermittelte Aktivierung der GC-C führt beim Menschen zu schweren sekretorischen Diarrhöen. Die physiologische Rolle der beiden endogenen Liganden Guanylin und Uroguanylin ist bislang nicht vollständig geklärt. Für die anderen pGC sind die aktivierenden Liganden unbekannt.

### **1.2.2. NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen (NO-GC)**

Eine NO-induzierte Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels wurde schon Ende der siebziger Jahre gezeigt (Kimura *et al.*, 1975; Arnold *et al.*, 1977; Böhme *et al.*, 1978). Das verantwortliche Enzym für diesen Effekt, die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase, wurde erstmals 1981 aus Rinderlunge gereinigt (Gerzer *et al.*, 1981a) und als Häm-haltiges Protein identifiziert. Die NO-GC stellt den wichtigsten Rezeptor für das von den NOS gebildete NO dar (Mergia *et al.*, 2006; Friebe *et al.*, 2007). Es wurde eine bis zu 200-fache Aktivierung des Enzyms durch NO gezeigt (Gerzer *et al.*, 1981b; Humbert *et al.*, 1990; Stone und Marletta, 1995), die auf die

Bindung von NO an die prosthetische Häm-Gruppe als Aktivierungsmechanismus zurückzuführen ist. Die NO-GC ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Neben den Sequenzen der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit (Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1988; Koesling *et al.*, 1990; Nakane *et al.*, 1990) wurden durch Homologiescreening zwei weitere Untereinheiten, die  $\alpha_2$ - und die  $\beta_2$ -Untereinheit, identifiziert (Harteneck *et al.*, 1991; Yuen *et al.*, 1990).

Der Vergleich der Primärstruktur aller Untereinheiten erlaubt eine Unterteilung in drei Bereiche. Die N-terminale Region beinhaltet die regulatorische hämbindende Domäne und weist geringe Homologien zwischen den verschiedenen Isoformen auf. Sowohl die zentrale Region als auch Bereiche des N-Terminus werden zur Dimerisierung benötigt (Wagner *et al.*, 2005). Die größte Homologie der Isoformen weist die katalytische C-terminale Region auf. Diese Region ist auch in den pGC und den Adenylyl-Cyclasen stark konserviert (Koesling *et al.*, 1990; Friebe und Koesling, 2003; Sinha und Sprang, 2006). Studien zur Koexpression zeigten, dass die einzelnen Untereinheiten keine katalytische Aktivität besitzen, nur eine Kombination aus  $\alpha$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit ergibt ein funktionelles Enzym, welches cGMP nach NO-Stimulation bildet (Harteneck *et al.*, 1990; Buecheler *et al.*, 1991; Foerster *et al.*, 1996). Es sind bisher zwei Isoformen der NO-GC bekannt, die sich in der  $\alpha$ -Untereinheit unterscheiden ( $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$ ). Die  $\alpha_1\beta_1$ -Isoform ist im Cytosol zu finden. Im Gegensatz dazu kann die  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform auch membranassoziiert vorliegen (Russwurm *et al.*, 2001). Die vorherrschende Isoform der glatten Muskulatur ist die  $\alpha_1\beta_1$ -Isoform, die  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform wird in größeren Mengen im Gehirn gefunden (Mergia *et al.*, 2003).

Der physiologische Aktivator der NO-GC ist das von den NOS gebildete NO, aber auch so genannte NO-Donatoren, die NO freisetzen, führen zu einer Stimulation der NO-GC. Von diesen Donatoren sind einige als Medikamente zugelassen. So werden z.B. die Nitrovasodilatoren schon seit Jahrzehnten zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Der bekannteste Vertreter dieser Medikamentengruppe ist das Nitroglycerin.

### 1.3. cGMP-Effektorproteine

Die Signalübertragung über cGMP spielt in vielen physiologischen Abläufen eine bedeutende Rolle. Dabei gibt es unterschiedliche Effektoren, die durch den cGMP-Spiegel beeinflusst werden. Dazu gehören, wie schon erwähnt, cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG), cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und cGMP-regulierte Ionenkanäle.

### 1.3.1. cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG)

Die PKG ist der Haupteffektor des durch die NO-GC gebildeten cGMPs in der glatten Muskulatur. Proteinkinasen katalysieren die Übertragung eines Phosphat-Restes an Aminosäureseitenketten, wodurch z.B. die Aktivität von Enzymen und Ionenpumpen verändert werden kann. Die PKG gehört zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen und wird durch die Bindung von cGMP aktiviert. Die PKG lässt sich in drei funktionelle Domänen unterteilen: N-terminale Domäne, regulatorische Domäne und katalytische Domäne. Die beiden cGMP-Bindungsstellen, die in der regulatorischen Domäne lokalisiert sind, führen nach Bindung von cGMP zu einer Veränderung der Sekundärstruktur (Landgraf *et al.*, 1990). In der katalytischen Domäne befinden sich eine Substrat- und eine Mg-ATP-Bindungsstelle. Die N-terminale Domäne enthält ein Leuzin-Zipper-Motif (Atkinson *et al.*, 1991), welches die Dimerisierung und die Interaktion mit Substratproteinen vermittelt.

Bislang wurden zwei Gene identifiziert, welche für die PKG kodieren, die PKGI (Wernet *et al.*, 1989) und die PKGII (Jarchau *et al.*, 1994). Die PKGI liegt löslich vor, es gibt sie in zwei Spleißvarianten, PKGI $\alpha$  und PKGI $\beta$ , die sich nur im N-terminalen Abschnitt unterscheiden. Die PKGI wird sehr stark in Thrombozyten und in glatter Muskulatur exprimiert (Keilbach *et al.*, 1992), wo sie die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie die Relaxation in der glatten Muskulatur vermittelt (Birschmann und Walter, 2004; Hofmann *et al.*, 2006). Die PKGII ist über eine N-Myristoylierung in der Plasmamembran verankert (Hofmann *et al.*, 2000); sie wird im Gehirn, in der Dünndarm-Mukosa, in der Niere, in Chondrozyten und in der Lunge exprimiert (Lohmann *et al.*, 1997). Ein wichtiger Effektor der PKGII ist der CFTR-Kanal (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), der durch Phosphorylierung aktiviert wird (Vaandrager *et al.*, 1998).

### 1.3.2. cGMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDE)

Die PDE fungieren als Gegenspieler zu den Cyclasen und bauen cGMP zu GMP ab. Somit wird die Dauer und Intensität eines cGMP-Signals nicht nur durch die Bildung, sondern auch durch die Aktivität der jeweils vorhandenen Phosphodiesterasen mitbestimmt. Es sind 11 PDE-Familien bekannt, die sich aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Gruppen einteilen lassen. Man unterscheidet cAMP-spezifische PDE-Familien, PDE-Familien mit gemischter Spezifität und cGMP-spezifische PDE-Familien (Bender und Beavo, 2006).

Die PDE5 nimmt eine zentrale Rolle bei der Terminierung des cGMP-Signals ein. Die als Homodimer im Cytosol vorliegende PDE5 wird vorwiegend in der glatten Gefäßmuskulatur, der Lunge, der Niere, im Corpus cavernosum und in Thrombozyten

exprimiert (Corbin und Francis, 1999; Bender und Beavo, 2006). Für die PDE5 sind mehrere Inhibitoren entwickelt worden. Die wichtigste medizinische Bedeutung besitzt das Sildenafil, welches zur Therapie der erektilen Dysfunktion sowie der pulmonalen Hypertonie zugelassen ist.

### 1.3.3. cGMP-regulierte Ionenkanäle

Die cyclisch Nukleotid-gesteuerten Kationen-Kanäle (CNG-Kanäle; cyclic nucleotide-gated channels) wurden zuerst in Photorezeptorzellen (Fesenko *et al.*, 1985; Yau und Nakatani, 1985) und olfaktorischen Neuronen (Nakamura und Gold, 1987) nachgewiesen. Jedoch wurden CNGs auch in anderen Geweben, wie z.B. dem Darmepithel, Hoden, Ovar, Niere, Gehirn und im Herz nachgewiesen (Distler *et al.*, 1994). Bei diesen Kanälen handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle die nach ihrer Aktivierung durch intrazelluläres cGMP den Einstrom von Calcium- und Natrium-Ionen in die Zelle ermöglichen. Diese Ionen setzen als tertiäre Botenstoffe weitere Signalkaskaden in der Zelle in Gang (Biel *et al.*, 1999).

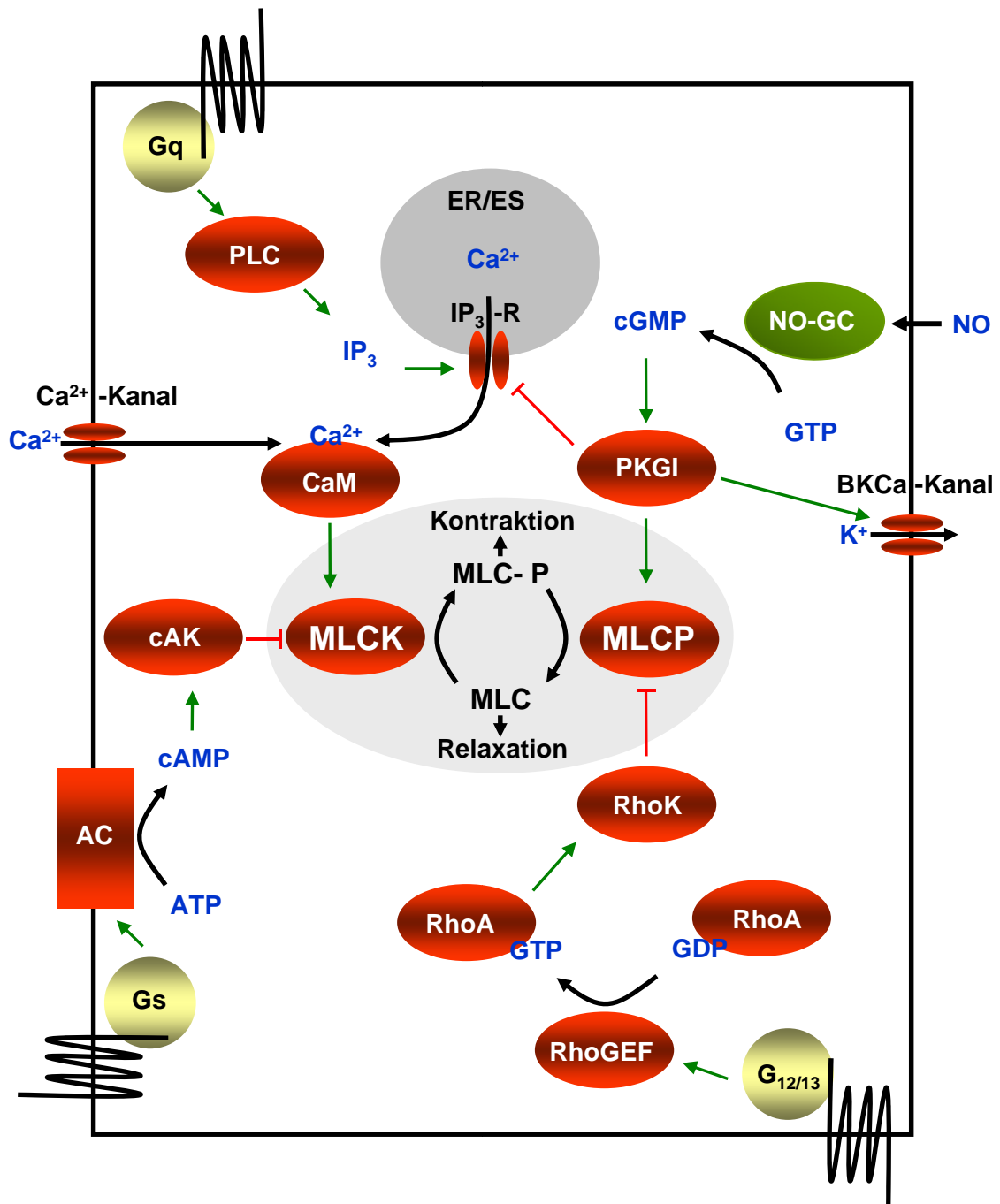
## 1.4. Glatte Muskulatur

Viele physiologische Prozesse werden über die glatte Muskulatur reguliert, dazu gehören z.B. die Peristaltik des Gastrointestinaltraktes und die Regulation des Blutdrucks. Aufgrund der wichtigen Rolle der NO-cGMP-Kaskade für die Relaxation der glatten Muskulatur soll kurz auf diese eingegangen werden (Abb. 2).

Aktivierungen von Rezeptoren, die an das Gq-Protein koppeln, können zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur führen. Dabei sind Endothelin und Histamin Beispiele für Liganden an den jeweiligen Rezeptoren. Nach Bindung der Liganden und Konformationsänderung der Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C<sub>β</sub> (PLC<sub>β</sub>) (Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004), welche wiederum das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Das so erzeugte IP<sub>3</sub> aktiviert den IP<sub>3</sub>-Rezeptor, der ein Ca<sup>2+</sup>-permeabler Ionenkanal ist, und führt zu einem vermehrten Ausstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol (Bootman *et al.*, 2002; Hisatsune *et al.*, 2005). Das nun im Cytosol vorhandene Ca<sup>2+</sup> bildet mit Calmodulin einen Komplex, der die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) aktiviert. Die MLCK phosphoryliert die regulatorische leichte-Myosin-Kette (MLC) (Somlyo und Somlyo, 2003). Diese Phosphorylierung der MLC ermöglicht eine Interaktion von Aktin und Myosin, die zur Kontraktion führt (Webb *et al.*, 2003).

Neben dieser Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kaskade existiert aber auch ein Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger Weg der MLC-Phosphorylierung (Klages *et al.*, 1999), der zu einer Kontraktion führt.





**Abb. 2: Kontrahierende und relaxierende Signalwege in der glatten Muskulatur**  
 Die Kontraktion glatter Muskulatur beruht auf der Interaktion von Myosin und Aktin. Diese kann nur erfolgen, wenn Myosin an den leichten Ketten phosphoryliert ist („MLC-P“). Die Kontraktion wird durch Bindung von Agonisten an GPCRs induziert und erfolgt Calcium-abhängig durch MLCK-Aktivierung bzw. Calcium-unabhängig über eine durch Phosphorylierung des Enzyms vermittelte Hemmung der MLCP. Für weitere Erklärung siehe Text.

So aktivieren verschiedene Hormone (z.B. Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)) auch G-Proteine der G<sub>12/13</sub>-Familie. Diese stimulieren die kleine GTPase RhoA, die daraufhin die Rho-Kinase (ROK) aktiviert (Somlyo und Somlyo, 2003). Die ROK phosphoryliert die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP). Die Phosphorylierung der MLCP führt zur Inaktivierung des Enzyms, wodurch der Anteil des phosphorylierten Myosins steigt und es zu einer Kontraktion kommt.

Die Signalmoleküle cAMP und cGMP vermitteln eine Relaxation durch Stimulation jeweils einer spezifischen Kinase. cAMP stimuliert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), vermittelt die Hemmung der MLCK und führt zu einer verringerten MLC-Phosphorylierung. Das für diese Arbeit wichtige Signalmolekül cGMP stimuliert die PKGI (Lincoln *et al.*, 1994). Eine Aktivierung der PKGI durch cGMP kann über unterschiedliche Kaskaden zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führen. Die PKGI phosphoryliert die MLCP und aktiviert diese. Die MLCP dephosphoryliert die MLC, wodurch die Aktin-Myosin-Interaktion reduziert wird. Des Weiteren kann das Protein IRAG (IP<sub>3</sub>-receptor-associated cGMP-dependent kinase-substrate) von der PKGI phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von IRAG durch die PKGI vermittelt dabei eine Hemmung der IP<sub>3</sub>-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR (Schlossmann *et al.*, 2000).

Auch der kalziumaktivierte Kaliumkanal (BK<sub>Ca</sub>-Kanal) dient als Substrat der PKG. So erhöht die Phosphorylierung die Offen-Wahrscheinlichkeit dieses Kanals, wodurch es über einen vermehrten K<sup>+</sup>-Ausstrom zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran kommt. Diese Hyperpolarisation führt zu einer Hemmung spannungsabhängiger L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, welche den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> verringert und so eine Relaxation vermittelt (Alioua *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 1999; Sausbier *et al.*, 2000).

### 1.5. Modellsystem der glatten Muskulatur

Die Kontraktion der glatten Muskulatur wird durch Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels in der Zelle und/oder der Aktivierung der Rho-Kinase vermittelt. Diese Kontraktion wird sowohl im kardiovaskulären System als auch im Gastrointestinaltrakt durch NO inhibiert. Dabei ist die Herkunft des gebildeten NO aber unterschiedlich. Im Gastrointestinaltrakt wird NO durch die neuronale NOS (nNOS) gebildet. Im kardiovaskulären System ist die endotheliale NOS (eNOS), die in den Endothelzellen exprimiert wird, für die Produktion des NO verantwortlich. In beiden Fällen bewirkt das gebildete NO eine Stimulation der NO-GC und die daraus resultierende Relaxation. Bei beiden Systemen wird von der direkten Wirkung des durch NO-GC gebildeten cGMP auf die zuvor beschriebenen Effektoren ausgegangen (BK<sub>Ca</sub>-Kanal, PKG und IRAG). Der Unterschied zwischen den beiden Systemen besteht darin, dass im

Gastrointestinaltrakt noch andere Zelltypen mit starker NO-GC Expression vorhanden sind, die ebenfalls an der nitrogenen Relaxation beteiligt sein sollen. Dabei handelt es sich um interstitielle Zellen von Cajal (ICC) sowie Fibroblasten-ähnliche Zellen (fibroblast-like cells, FLC; Iino *et al.*, 2008). Die Beteiligung insbesondere der ICC an der nitrogenen Relaxation wird allerdings derzeit noch sehr kontrovers diskutiert (Sivarao *et al.*, 2001; Goyal und Chaudhury, 2010).

### **1.6. Interstitielle Zellen von Cajal**

Schon 1893 beobachtete Cajal sternförmige Zellen, die variköse Ausläufer aufwiesen (Cajal *et al.*, 1893). Sie liegen zwischen Nervenendigungen und glatten Muskelzellen und bilden ein Netzwerk aus. Cajal postulierte, dass diese Zellen Neurone seien. Sie wurden in der Folge als interstitielle Zellen von Cajal (ICC) bezeichnet. Später konnte gezeigt werden, dass diese Zellen keine Neurone sind (Taxis *et al.*, 1969), aber dennoch eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission spielen.

Die interstitiellen Zellen exprimieren das Proto-Onkogen c-Kit, das für den Tyrosinkinaserzeptor Kit kodiert (Burns *et al.*, 1997). Antikörper gegen c-Kit können als Oberflächenmarker zur Identifizierung der ICC genutzt werden. Mit Hilfe dieses Antikörpers wurden mehrere ICC-Typen in verschiedenen Zellschichten und -arten gefunden (myenterische, intramuskuläre, mucosale ICC etc.). Diese verschiedenen ICC erfüllen unterschiedliche Aufgaben (Schrittmacher-Funktion, Neurotransmission oder Mechanosensoren). Da sich diese Arbeit mit den intramuskulären ICC (ICC-IM) befasst, werden diese im Folgenden genauer beschrieben.

Bei den ICC-IM wird vermutet, dass sie als primäres Ziel für die Neurotransmission im Gastrointestinaltrakt fungieren (Ward *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2004). Sie liegen zwischen Neuronen und glatten Muskelzellen und besitzen eine Spindelform. Sie sind sowohl in der longitudinalen als auch in der zirkulären glatten Muskulatur vorhanden. Die ICC-IM haben dabei engen Kontakt zu den Nerven-Varikositäten und besitzen Synapsen-assoziierte Proteine (Beckett *et al.*, 2005), die für eine Neurotransmission zuständig sein können. Der Kontakt zu den glatten Muskelzellen besteht aus gap junctions, die für die Übertragung elektrischer Impulse verantwortlich gemacht werden. Neben den glatten Muskelzellen wurden vermutet, dass auch die ICC-IM als primäres Ziel der nitrogenen Relaxation durch nicht-adrenerge nicht-cholinerge Neurone (NANC-Neurone) dienen (Burns *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1998). Es wurden schon einige Proteine der nitrogenen Signaltransduktion in den ICC gefunden. Die nNOS wurde in Neuronen des myenterischen Plexus und in den Nerven-Varikositäten nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigen ICC keine nNOS-Expression, aber sie liegen stets eng an den nNOS-positiven Nerven-Varikositäten (Salmhofer *et al.*, 2001).

NO-GC und PKGI werden in ICC stark exprimiert, wohingegen im direkten Vergleich die glatten Muskelzellen nur schwache Signale für die genannten Enzyme zeigt (lino *et al.*, 2008).

### **1.7. Pharmakologische Beeinflussung der intrazellulären cGMP-Spiegel**

Die intrazelluläre cGMP-Konzentration wird durch cGMP-bildende Enzyme, den Guanylyl-Cyclasen, und cGMP-abbauende Enzyme, den PDE, kontrolliert. Durch die Anwendung von Aktivatoren bzw. Inhibitoren dieser beiden Enzyme kann der cGMP-Spiegel einer Zelle gezielt erhöht oder erniedrigt werden. Somit kann über die NO/cGMP-Kaskade beispielsweise in der glatten Gefäßmuskulatur eine Kontraktion bzw. eine Relaxation durch den Einsatz entsprechender Pharmaka hervorgerufen werden.

Eine Erhöhung des cGMP-Spiegels kann zum Beispiel durch NO-Donatoren herbeigeführt werden. Die verfügbaren NO-Donatoren unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit und freisetzenden NO-Spezies. Darüber hinaus gibt es Substanzen die NO-unabhängig, durch direkte Aktivierung der NO-GC, zu einer erhöhten cGMP-Konzentration führen. Einer der bekanntesten Vertreter ist das YC-1 (Friebe *et al.*, 1998). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind die Substanzen BAY 41-2272 und BAY 58-2667 (Stasch *et al.*, 2002). Der genaue Mechanismus, mit dem diese Substanzen die NO-GC stimulieren, konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden. Durch Inhibierung der abbauenden Phosphodiesterasen (PDE) kann ebenfalls eine Erhöhung des cGMP-Spiegels herbeigeführt werden. Hierbei ist insbesondere das bereits in 1.3.2. erwähnte Sildenafil (Viagra) zu nennen, welches spezifisch die PDE5 hemmt.

Eine Erniedrigung des cGMP-Spiegels kann durch Hemmung der NO-GC mittels des spezifischen Hemmstoffes ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) erreicht werden. ODQ wirkt über die Oxidation des zentralen Eisenatoms der Häm-Gruppe (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996), führt aber in hohen Konzentrationen auch zur Oxidation der Häm-Gruppe anderer Proteine (Feelisch *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Ein weiterer Ansatz zur Senkung intrazellulärer cGMP-Spiegel im intakten Gewebe ist die Hemmung der NOS durch verschiedene Arginin-Analoga, wie z.B. N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME), die das Enzym kompetitiv hemmen und damit zu einer verminderten NO-Produktion führen.

Der intrazelluläre cGMP-Spiegel kann auch unabhängig von NO-GC durch die pGC beeinflusst werden, dazu können die natriuretischen Peptide ANP, BNP oder CNP sowie Guanylin eingesetzt werden.

## 1.8. Transgene Mausmodelle

Die Maus als Modellorganismus hat sowohl wissenschaftliche als auch praktische Vorteile. Dazu gehören der geringe räumliche Anspruch, relativ geringe Kosten der Tierhaltung, eine hohe Reproduktionsrate und eine schnelle Generationenfolge. Die genetische Manipulation wird dadurch erleichtert, dass murine embryonale Stammzellen (ES) in Kultur gehalten werden können (Capecchi *et al.*, 1989 a, b). 99% des Genoms der Maus besitzen einen entsprechenden Pendanten im menschlichen Erbgut und 96% liegen sogar in ähnlichen Nachbarschaften vor (Houdebine *et al.*, 2007). Für das Verständnis der Funktion eines Genes *in vivo* ist die Inaktivierung oder Veränderung eines Genes durch Deletion bzw. Mutation und die Analyse der Auswirkungen auf den Organismus ein wichtiger Ansatz. Man verspricht sich, die erhobenen Daten der Tiermodelle auf den Menschen übertragen zu können.

Es existieren mehrere KO-Mauslinien, in welchen Komponenten der NO/cGMP-Signalkaskade ausgeschaltet sind. Diese werden im Folgenden kurz unter dem Aspekt der Glattmuskelrelaxation vorgestellt.

### 1.8.1. KO-Mausmodelle der NOS

Es sind drei Isoformen der NOS bekannt, die durch separate Gene kodiert werden (Tsutsui *et al.*, 2009). Für jede der drei Isoformen konnten KO-Mausmodelle generiert werden. Die dadurch hervorgerufenen Phänotypen lassen Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung der jeweiligen Isoformen zu.

Für die nNOS existieren zwei KO-Linien. Bei der ersten wurde das Exon 2 genomisch deletiert. Diese Mäuse zeigen ein aggressives Verhalten (Nelson *et al.*, 1995) und einen stark vergrößerten Magen mit einer Hypertrophie des Pylorus-Sphinkters (Huang *et al.*, 1993), was zur Bildung von Bezoaren führt (Sivarao *et al.*, 2008). Bei diesen Mäusen stellte sich aber heraus, dass eine nNOS-Spleißvariante noch in verschiedenen Organen (z.B. Gehirn und Darm) vorhanden ist (Eliasson *et al.*, 1997). Daher wurde eine zweite nNOS-KO-Mauslinie erzeugt, in der das Exon 6 deletiert wurde. Diese Mäuse zeigen in keinem der untersuchten Gewebe nNOS-Aktivität. In Übereinstimmung mit der ersten nNOS-KO-Linie zeigt diese KO-Linie eine Pylorusstenose (Gyurko *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten auf die wichtige Rolle des von der nNOS produzierten NOs als Neurotransmitter inhibitorischer NANC-Neuronen hin, die an der Regulation der gastrointestinalen Motilität und der Sphinkteren-Relaxation beteiligt sind.

Weiterhin wurde durch Huang *et al.* eine eNOS-defiziente Mauslinie erzeugt (Huang *et al.*, 1995). Diese NOS-Isoform wird in Endothelzellen exprimiert, kommt aber auch in hippocampalen Neuronen, mehreren Epithelzell-Typen und Myozyten vor

(Förstermann *et al.*, 1998). In Aorten von eNOS-KO Mäusen führt die Stimulation mit Acetylcholin nicht mehr zu einer Relaxation. Zusätzlich zeigen diese Mäuse einen stark erhöhten Blutdruck. Auch bei der Angiogenese und Arteriogenese weisen eNOS-defiziente Mäuse Defekte auf (Dai *et al.*, 2010), was eine antiproliferative Wirkung von endotheliale NO auf die glatten Gefäßmuskelzellen unterstreicht (Moroi *et al.*, 1998; Rudic *et al.*, 1998; Yogo *et al.*, 2000).

Es gibt mehrere iNOS-KO Mauslinien, die aber alle keine großen Auffälligkeiten im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen zeigen. Sie lassen eine erhöhte Infektionsanfälligkeit, aber auch eine höhere Resistenz gegen septischen Schock beobachten (Mashimo und Goyal, 2000).

### 1.8.2. KO-Mausmodelle für die NO-GC

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Mauslinie generiert, bei der durch Deletion der  $\beta_1$ -Untereinheit ein vollständiger Knockout der NO-GC (GCKO) erzeugt wurde (Friebe *et al.*, 2007). Diese GCKOs zeichnen sich durch eine verminderte Lebenserwartung und eine starke Wachstumsretardierung aus. Über 80% der Mäuse sterben innerhalb der ersten zwei Lebensstage. Die restlichen Tiere sterben zwischen der 3. und 5. Woche, parallel zur Nahrungsumstellung von Muttermilch auf Festnahrung. Es zeigte sich, dass diese Mäuse eine stark verlängerte Darmpassagezeit aufweisen, was auf eine reduzierte gastrointestinale Motilität hinweist. Durch Umstellung der Nahrung auf eine ballaststoffarme Diät konnte die Überlebensrate gesteigert werden. Adulte Tiere der GCKOs besitzen einen im Vergleich zu den WT-Geschwistertieren um 30 mmHg erhöhten systolischen Blutdruck. Organbad-Versuche mit isolierten Aortenringen zeigten ein vollständiges Ausbleiben der NO-vermittelten Relaxation.

In unserer Arbeitsgruppe erhobene Daten an GCKO-Tieren zeigten, dass NO, im Gegensatz zu WT, nicht die Thrombin-induzierte Aggregation von GCKO-Thrombozyten hemmt. Ebenfalls beeinflussen NO-Donatoren weder die ADP-induzierte Adhäsion noch die Thrombin-induzierte Calcium-Ausschüttung in den GCKO-Thrombozyten. Diese *in vitro* Daten werden durch eine reduzierte Blutungszeit der GCKO-Tiere untermauert. NO-GC stellt somit den einzigen NO-Rezeptor in murinen Thrombozyten dar, der die Inhibition der Calcium-Ausschüttung, Adhäsion und Aggregation vermittelt (Dangel *et al.*, 2010).

Ebenfalls wurden in unserer Arbeitsgruppe KO-Mäuse für die  $\alpha_1$ - bzw. die  $\alpha_2$ -Untereinheit ( $\alpha_1$ -KO und  $\alpha_2$ -KO) der NO-GC hergestellt (Mergia *et al.*, 2006). Dabei führt in beiden Modellen der Verlust einer Untereinheit nicht zur gesteigerten Expression der anderen und damit zu keiner Kompensation der Deletion. Es zeigte sich, dass im vaskulären System die noch vorhandene NO-GC-Isoform die Funktion

der jeweils anderen Isoform übernehmen kann. Die  $\alpha_1$ -KO-Tiere zeigten in der Aorta eine NO-GC Expression von 6% durch die noch vorhandene  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform der NO-GC. Die  $\alpha_2$ -KO-Tiere hingegen zeigten eine 94%-ige Expression der NO-GC durch die  $\alpha_1\beta_1$ -Isoform in der Aorta. Die  $\alpha_2$ -KO-Tiere weisen keinen erhöhten Blutdruck auf, jedoch ist der Blutdruck bei den  $\alpha_1$ -KO-Tieren um 7 mmHg im Vergleich zu den WT-Kontrollen erhöht. Das lässt darauf schließen, dass bereits eine geringe Menge der Cyclo-oxygenase ausreicht, um die Effekte von NO zu vermitteln. Die starke Expression der NO-GC kann demnach als eine NO-Rezeptor-Reserve ('spare receptor') angesehen werden, die die Sensitivität gegenüber NO erhöht.

Eine andere Arbeitsgruppe hat ebenfalls eine  $\alpha_1$ -KO erzeugt und den Phänotyp dieser Mäuse untersucht (Vanneste *et al.*, 2007). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit ist die dominante Form im Gastrointestinaltrakt. Überraschenderweise führt die Deletion nur in männlichen Mäusen zu einer leichten Erhöhung der Darmpassagezeit. Doch in beiden Geschlechtern zeigt sich, dass die nitric oxide Relaxation von zirkulären Muskel-Streifen des Jejunums durch elektrische Feldstimulation und exogenes NO fast vollständig verschwunden ist. Die verbleibende Relaxation in den  $\alpha_1$ -KO konnte durch ODQ unterbunden werden. Diese Relaxation ist wahrscheinlich durch die verbleibende Aktivität der  $\alpha_2$ -Untereinheit zu erklären. NO kann somit in Abwesenheit der  $\alpha_1\beta_1$ -Isoform über die  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform wirken (Dhaese *et al.*, 2008; Dhaese *et al.*, 2009).

Die  $\alpha_1$ -defizienten Mäuse zeigten ebenfalls eine geschlechtsspezifische Erhöhung des Blutdrucks (Buys *et al.*, 2008). Nur männliche Mäuse entwickeln einen im Vergleich zu den Kontrollen um 30 mmHg erhöhten Blutdruck. Diese geschlechtsspezifischen Blutdruckunterschiede waren allerdings bei Mäusen, die auf Black6-Hintergrund zurückgekreuzt waren, verschwunden (Buys *et al.*, persönliche Mitteilung).

### 1.8.3. KO-Mausmodelle für die PKG

Die PKGI wird besonders stark in vaskulärer glatter Muskulatur und Thrombozyten exprimiert. Auch im Gastrointestinaltrakt wird die PKGI ubiquitär in glatten Muskelzellen exprimiert (Magen, Dün- und Dickdarm und dem Caecum; Geiselhöringer *et al.*, 2004). Der Knockout dieses Enzyms in der Maus führt zu deutlichen Veränderungen im Vergleich zu den WT-Kontrollen (Pfeifer *et al.*, 1998). Die KO-Mäuse sterben verfrüht, wahrscheinlich aufgrund gastrointestinaler Dysmotilität. Wie die nNOS-KO-Mäuse zeigen sie auch eine langsamere Passage der Nahrung als WT. Der Gastrointestinaltrakt der Mäuse zeigt dabei eine Dilatation des Magens, Duodenums und Caecums, Stenose und Hypertrophie des Pylorus und Kontraktion der Ileocaecal-Region (Ny *et al.*, 2000).

Aortenringe des PKGI-KOs zeigen im Organbad nach Zugabe von Acetylcholin, keine Relaxation. Darüber hinaus bewirkte pharmakologisch verabreichtes NO eine verminderte Relaxation von KO-Aorten im Vergleich zu WT. Bei hohen NO-Konzentrationen konnte allerdings eine Relaxation beobachtet werden, die aber auf eine durch hohe cGMP-Konzentrationen verursachte Kreuzaktivierung der PKA zurückgeführt werden konnte (Pfeifer *et al.*, 1998). Männliche PKGI-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Reproduktionsfähigkeit, die auf eine erektile Dysfunktion zurückgeführt wurde (Hedlund *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die PKGI der zentrale Mediator für die Wirkung von NO in den glatten Muskelzellen ist.



# Zielsetzung

# 2

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade trägt entscheidend zur Regulation von Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur bei. Die Bildung von NO durch die NOS führt zu einer Aktivierung der NO-GC, welche GTP zu cGMP umwandelt. Eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels führt über die Aktivierung der PKG zu einer Relaxation der glatten Muskulatur.

Vollständige Knockout-Mäuse der Guanylyl-Cyclase zeigen eine Störung der Magen-Darmfunktion, die sich in einer verlangsamten GI-Motilität äußert. Ebenfalls zeigen diese Mäuse einen erhöhten systolischer Blutdruck von ~30 mmHg im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Dabei stellt sich die Frage, ob die NO-GC in den glatten Muskelzellen und/oder in nicht-glattmuskulären Zellen für den erhöhten Blutdruck sowie die verlangsamte Darmpassagezeit verantwortlich ist.

Um diese Frage zu beantworten wurden Glattmuskel-spezifische Knockouts der NO-GC (SM-GCKO) generiert.

## ***Vaskuläres System***

Um die Auswirkung der Glattmuskel-spezifischen Deletion der NO-GC auf das vaskuläre System zu untersuchen, sollten folgende Messungen durchgeführt werden:

- Bestätigung der erfolgreichen NO-GC-Deletion mittels Western-Blot, mRNA-Analyse, Messung der cGMP-Produktion und Immunhistochemie
- Messung der Relaxation von Aorten-Streifen aus WT- und SM-GCKO-Mäusen durch NO, Carbachol, VIP, ANP und Sildenafil
- *In vivo*-Messung des Blutdrucks der WT- und SM-GCKO-Mäuse

## ***Gastrointestinales System***

Um die Auswirkung der vollständigen Deletion der NO-GC auf das gastrointestinale System zu untersuchen, sollten an vollständigen KOs der NO-GC (GCKO) folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Messung der Relaxation von gastrointestinalen Geweben (Fundus, Duodenum und Sphinkteren) aus WT- und GCKO-Mäusen durch NO und elektrische Feldstimulation
- *In vivo*-Messung der Darmpassagezeit der WT und GCKO-Mäuse

Um die Funktion der NO-GC in den verschiedenen Zelltypen des Gastrointestinaltrakts zu untersuchen, sollten KO-Mäuse generiert werden, bei denen das Enzym in glatten Muskelzellen bzw. in interstitiellen-Zellen von Cajal (ICC) ausgeschaltet ist. Durch Kreuzung der beiden Linien sollte darüber hinaus eine Doppel-KO-Linie (ICC + SMC; dbl-GCKO) hergestellt werden. An diesen Mäusen sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Bestätigung der erfolgreichen NO-GC-Deletion mittels Immunhistochemie im Gewebe des Magenfundus
- Messung der Relaxation von gastrointestinalem Gewebe (Fundus, Duodenum und Sphinkteren) aus WT-, SM-GCKO-, ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Mäusen durch NO, 8-Br-cGMP und elektrische Feldstimulation
- *In vivo*-Messung der Darmpassagezeit der WT-, SM-GCKO-, ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Mäuse

# 3

## Material und Methoden

### 3.1. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
8-Br-cGMP	Alexis, Lausen (CH)
Atropine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bay-41-2272	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carbachol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carmin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEA-NO	Alexis, Lausen (CH)
Diclofenac	Cayman Chemical, Michigan (USA)
Guanethidin	ABCR GMBH, Karlsruhe
IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-NAME	Alexis, Lausen (CH)
MIGLYOL 812	Caelo, Hilden
Nifedipin	Alexis, Lausen (CH)
ODQ	Alexis, Lausen (CH)
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sildenafil	Pfizer, Berlin
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
U46619	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VIP	NeOMPS, Strasbourg (FR)

### 3.2. Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
$\beta_1$ -NO-GC	1:1000	eigene Herstellung
$\alpha_1$ -NO-GC	1:1000	eigene Herstellung
$\alpha_2$ -NO-GC	1:1000	eigene Herstellung
ERK	1:500	Cell Signaling, Danvers (USA)
$\beta$ -tubulin	1:1000	Cell Signaling, Danvers (USA)

### 3.3. Verwendete Geräte

Geräte	Gerätebezeichnung	Firma
Organbad	Multi Myograph Model 610M	Danish Myo Technology
PowerLab	PowerLab 4/20	ADInstruments
Booster	Multiplexing Pulse Booster	Ugo Basile
Lichtisolierte Kammer	Biochemi™ GDS 8000 System	UVP
UV-Transilluminator	Fluo-Link	Biometra
CCD-Kamera	QuickStore	MS-Laborgeräte
Blutdruckmessung	Softron BP-98A	Softron

### 3.4. Routinemethoden

#### 3.4.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden mittels der BCA-Methode ('bicinchoninic acid', Smith *et al.*, 1985) gemäß der Herstellerangaben (Pierce) durchgeführt. Alternativ wurde die Methode nach Bradford (1976) benutzt.

#### 3.4.2. Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) wurde nach Angaben von Laemmli (1970) durchgeführt. Der SDS-haltige Probenpuffer für die Gelelektrophorese setzte sich wie folgt zusammen: 10% (v/v) Glycerin, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) Bromphenolblau, 62,5 mM Tris Base, pH 6,6.

#### 3.4.3 Western-Blot

Zur Detektion der Proteine wurden im Anschluss an eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970) Western-Blots (Towbin *et al.*, 1979) in Mini-Gelkammern (Mini-Protean II Cell, Biorad) durch den elektrischen Transfer der Proteine (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) durchgeführt.

Der Transfererfolg wurde mittels Ponceaureagenz (0,2% (w/v) Ponceau S, 10% (v/v) Trichloressigsäure) überprüft. Dafür wurde der Blot für 4 min in die Reagenzlösung bei RT gelegt, so dass die Proteinbanden auf der Membran sichtbar wurden. Daraufhin wurden die Größenstandards markiert und die Membran für 30 min mit Roti-Block (Roth) zur Absättigung unspezifischer freier Proteinbindestellen inkubiert.

Im Anschluss wurden die Blots mit den jeweiligen primären Antikörpern inkubiert und eine zweite Inkubation mit einem sekundären, Immunglobulin-spezifischen Antikörper,

der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, durchgeführt. Als Substrat wurde das 'Super Signal West Dura Extended Duratice Substrate' (Thermo Scientific) verwendet. Die Detektion der an den sekundären Antikörpern entstehenden Chemiluminiszenz erfolgte mit einer 16-bits CCD-Kamera in einer lichtisolierten Kammer (Biochemi™ GDS 8000 System, UVP).

#### **3.4.4. Gewinnung der Western-Proben**

WT und SM-GCKO Mäuse gleichen Alters wurden mit Diethylether narkotisiert. Mit einer Glaskapillare wurde aus dem Orbitalsinus das Blut entnommen (ca. 700 µl) und in einem mit 200 µl Heparin (50 U/ml) gefüllten Reaktionsgefäß gesammelt. Das Blut wurde mit 1 ml PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) versetzt und 10 min zentrifugiert (90 x g, 20°C). Nach dem Abnehmen der oberen Phase Plattenreiches Plasmas (PRP), wurde die untere Phase mit der Menge PBS versetzt, die zuvor abgenommen wurde. Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation (10 min, 90 x g, 20°C) mit dem PRP vereinigt. Das gesammelte PRP wurde daraufhin erneut zentrifugiert (10 min, 700 x g, 20°C) und der Überstand verworfen. Eine Resuspension der sedimentierten Thrombozyten erfolgte in Wasch-Puffer (15 mM NaCl, 0,055 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,7 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0,27 mM KCl, 0,05 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM Glukose). Für Western Untersuchungen wurden die Thrombozyten auf  $1 \times 10^9$  Thrombozyten/ml eingestellt.

Zur Gewinnung der Gehirne wurden Mäuse durch  $\text{CO}_2$ -Inhalation betäubt und in Betäubung dekapitiert. Die Gehirne wurden aus dem Schädel herauspräpariert und sofort mit einem Proteaseinhibitoren-Cocktail (50 mM TEA, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM Benzamidin, 1 µM Pepstatin A, 0,5 mM PMSF, 2 mM DTT) mittels eines Glas-Glas-Homogenisators unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert (800 x g, 10 min, 4°C), um nicht homogenisierte Zellbestandteile zu sedimentieren; der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit zweifachem Laemmli-Puffer versetzt.

Die Aorten wurden sofort nach dem Dekapitieren aus den Mäusen entnommen und in Krebs-Henseleit-Lösung (K-H-Lösung, siehe 3.8.1.) überführt. Danach wurden sie vom Bindegewebe befreit und mit K-H-Lösung durchspült, um Blut und Thromben zu entfernen. Anschließend wurden sie mit Proteaseinhibitoren-Cocktail versetzt und mittels Glas-Glas-Homogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Die Aorten-Homogenate wurden ohne Zentrifugation mit zweifachem Laemmli-Puffer versetzt.

### 3.5. Immunhistochemische Analyse

Die Mäuse wurden durch eine Überdosis Isofluran getötet. Das Gewebe wurde sofort aus den Mäusen präpariert und mit kaltem Isopentan schockgefroren. Alternativ wurden die Mäuse mit 3% Paraformaldehyd (in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4) perfundiert. Das Gewebe wurde mit 20% Saccharose versetzt und schockgefroren. Kryoschnitte (10  $\mu\text{m}$ ) wurden geschnitten, luftgetrocknet und mit Antikörpern gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (1:800, eigene Herstellung) zusammen mit einem Fluoresceinisothiocyanat-markierten-AK (FITC-AK) für anti- $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin-Antikörper (1:500, clone 1A4, Sigma-Aldrich, München) versetzt. Der  $\beta_1$ -Antikörper wurde mit Alexa 555-konjugiertes anti-Hase IgG Antikörper (1:800, Invitrogen, Carlsbad (USA)) für eine Stunde inkubiert. Die Schnitte wurde in Mowiol fixiert und mit einem Auflichtfluoreszenz-Mikroskop mit Filterset für Alexa 555 und FITC ausgewertet.

### 3.6. Radioimmunoassay

#### 3.6.1. Herstellung von radioaktiv markiertem cGMP (Tracer)

Die Herstellung von radioaktiv markierten cyclischen Nukleotiden wurde nach der Chloramin T (N-Chlor-Toluol-Sulfonamid Natrium)-Methode (Hunter *et al.*, 1964; Steiner *et al.*, 1972) durchgeführt. Der Tyrosylmethylester von 2'-Succinyl-cGMP (Sc-cGMP-TME) wird dabei am aromatischen Ring des Tyrosylrests durch eine elektrophile Substitution mit  $^{125}\text{I}$ od markiert. Der Reaktionsansatz enthielt 36,5  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer (500 mM, pH 7,4), 5  $\mu\text{l}$  160  $\mu\text{M}$  Sc-cGMP-TME (800 pmol) und 9,5  $\mu\text{l}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  (37 MBq bzw. 400 pmol). Zum Start der Reaktion wurde 50  $\mu\text{l}$  1,8  $\mu\text{M}$  Chloramin-T (90 nmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) zugegeben (100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen) und nach 45 Sekunden durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  2,6  $\mu\text{M}$  Na-Metabisulfit (260 nmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) gestoppt.

Durch Chloramin T wird das Iodid zu molekularem Iod ( $\text{I}_2$ ) oxidiert, welches an mehreren Positionen des aromatischen Rings elektrophile Substitutionsreaktionen eingehen kann. Reduktion des molekularen Iods zu Iodid durch Zugabe von Na-Metabisulfit stoppte die Reaktion. Die Reinigung des jodierten Produkts (Tracer) erfolgte über eine Anionenaustauschersäule (QAE-25 Sepharose, 0,9 x 5 cm, Amersham). Sie wurde mit 50 mM Ammoniumformiat (pH 6,0) äquilibriert. Die Ionenstärke wurde durch Zugabe von Wasser zum Reaktionsgemisch verringert. Die Elution erfolgte mit 250 mM Ammoniumformiat (pH 6) bei einer Durchflussrate von ca. 2 ml/min. Es wurden 25 Fraktionen mit jeweils 5 ml gesammelt, von denen je 5  $\mu\text{l}$  im  $\gamma$ -Counter gemessen wurden. Die Fraktionen die eine spezifische Aktivität von über 60000 cpm aufwiesen, wurden vereinigt und mit der gleichen Menge n-Propanol

verschnitten, um die Autoradiolyse zu verlangsamen. Danach wurde die Lösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6.2. Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung von cGMP

Die Bestimmung geringer cGMP-Mengen kann durch die immunologische Präzipitation des radioaktiv-markierten cGMP-Analogons  $^{125}\text{I}$ -Sc-cGMP-TME (Tracers) mittels eines spezifischen Antiserums durchgeführt werden. Durch Inkubation des Tracers mit dem Antiserum stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form des Tracers ein. Dieses Gleichgewicht kann durch nicht radioaktiv-markiertes cGMP in Richtung des freien Tracers verschoben werden, wodurch der präzipitierbare gebundene Anteil sinkt. Nach Proteinfällung und Dekantieren des Überstands kann somit die im Präzipitat befindliche gebundene Tracermenge durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden. Durch Verwendung einer Standardkurve mit bekannten Mengen von nicht markiertem cGMP kann der cGMP-Gehalt einer unbekannt Probe ermittelt werden. Die gewählten Bedingungen zur Durchführung der RIA, die Behandlung der Proben und die Antikörperinkubation erfolgten wie beschrieben (Steiner *et al.*, 1972).

Die getrockneten Überstände aus den Aortenringen, die zuvor 30 Sekunden mit einer  $100\ \mu\text{M}$  DEA-NO NaOH Lösung bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und mit flüssigem Stickstoff gestoppt wurden, wurden in  $100\ \mu\text{l}$  Reaktionspuffer ( $100\ \text{mM}$  Natriumacetat, pH 6,0) aufgenommen und mit  $3\ \mu\text{l}$  eines Gemisches aus Triethylamin und Acetanhydrid (2:1) acetyliert. Durch die Acetylierung des in den Proben enthaltenen cGMPs wird die Sensitivität des RIAs um den Faktor 40 vergrößert (Harper *et al.*, 1975).  $50\ \mu\text{l}$  Reaktionspuffer wurden in Polypropylenröhrchen vorgelegt und dazu  $10\ \mu\text{l}$  einer acetylierten Probe hinzugegeben und mit  $100\ \mu\text{l}$  des in Schweine- $\gamma$ -Globulin ( $0,5\ \text{mg/ml}$ ) verdünnten Antiserums (final 1:200.000) versetzt. Anschließend wurden  $40\ \mu\text{l}$  des verdünnten Tracers (in Reaktionspuffer) hinzugefügt und der Ansatz gemischt. Die Inkubation erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 16 - 20 Stunden. Zur Trennung von freiem und gebundenem cGMP wurde das im Reaktionsansatz befindliche Protein durch Zugabe von  $3\ \text{ml}$  Polyethylenglycol-Puffer ( $16\%$  PEG 6000 in  $10\ \text{mM}$  Tris/HCl, pH 7,4) gefällt. Zunächst wurden  $50\ \mu\text{l}$  einer  $0,8\%$ -igen Schweine- $\gamma$ -Globulin-Lösung (in Reaktionspuffer) zugesetzt, um eine ausreichende Proteinmenge für die quantitative Fällung des Antikörpers zu gewährleisten. Danach wurde für eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend 30 min bei  $6000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände wurde die Radioaktivität im Sediment mittels  $\gamma$ -Counter gemessen. Das Verhältnis von Tracermenge ( $7.000 - 10.000\ \text{cpm}$ ) und Antikörperverdünnung (1:200.000) sollte eine Fällung von 30 - 40% der eingesetzten Aktivität ergeben. Dieses

Verhältnis wurde durch den Zusatz von Antikörperverdünnungen zu einer gegebenen Tracermenge bestimmt. Zur Erstellung der Standardreihe wurden neun cGMP-Mengen von 2 - 512 fmol verwendet. Für den cGMP-Standard wurden Lösungen verwendet, deren Konzentration photometrisch bei 252 nm bestimmt wurden.

### **3.6.3. Messung der cGMP-Antwort in Aortenringen**

GCKO Mäuse und Kontrolltiere wurden durch CO<sub>2</sub>-Inhalation betäubt und anschließend dekapitiert. Die Aorta wurde entnommen und sofort in Krebs-Henseleit Lösung (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 7,5 mM Glukose, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, begast mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) überführt. Das Bindegewebe wurde vorsichtig entfernt und die Aorta mit Krebs-Henseleit Lösung durchspült, um Blut und Thromben heraus zu spülen. Die Aorten wurden geviertelt und 30 min bei 37°C äquilibriert. Vor der Inkubation mit dem NO-Donator wurden die Aortenringe mit dem PDE-Hemmstoff Sildenafil (100 µM) für 2 Minuten vorinkubiert. Nach 30 Sekunden Inkubation der Gewebestücke mit DEA-NO (100 µM) wurde die Inkubation durch Schockgefrieren gestoppt. Das Schockgefrieren erfolgte mit einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Metallklammer. Die Extraktion des cGMPs erfolgte durch Homogenisierung des Gewebes in einem Glas-Glas-Homogenisator in 500 µl eisgekühltem 70%-igen Ethanol. Nach Zentrifugation (15 x min, 20.000 x g, 4°C) wurde der cGMP-enhaltende Überstand bei 100°C getrocknet, die cGMP-Bestimmung erfolgte mittels RIA (wie unter 3.6.2. beschrieben). Das Proteinpellet der zentrifugierten Probe wurde mit 0,1 M NaOH und 0,1 M SDS bei 60°C über Nacht unter Schütteln gelöst und mittels BCA-Methode (Pierce) die Proteinkonzentration bestimmt.

## **3.7. Tiere und Präparation**

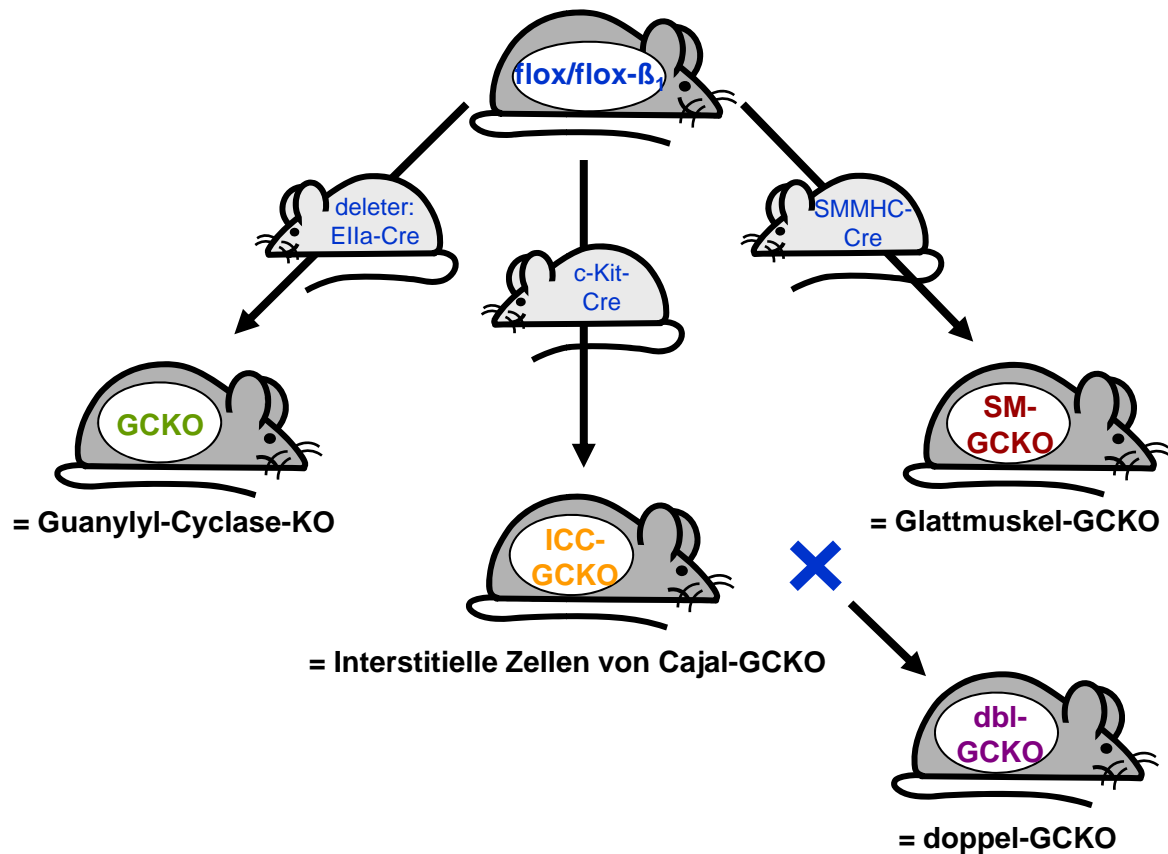
### **3.7.1. Haltung und Zucht**

Die Mäuse wurden in einem Makrolon Typ III (bis 3 adulte Tiere) bzw. Makrolon Typ II (bis 6 adulte Tiere) Käfig den Anforderungen entsprechend gehalten. Die verwendeten Mauslinien (GCKO, SM-GCKO, ICC-GCKO und dbl-GCKO) wurden von Herrn Prof. Dr. A. Friebe zur Verfügung gestellt. Das Kreuzungsschema der verschiedenen Mauslinien zum Erhalt der verschiedenen NO-GC Knockouts ist in Abb. 3 dargestellt.

Die Versuche wurden mit adulten Mäusen im Alter von 8-16 Wochen durchgeführt, wobei als Kontrolltiere wenn möglich Geschwistertiere verwendet wurden. Es wurden Tiere beider Geschlechter untersucht.

GCKO-Tiere wurden ad libitum mit einer ballaststofffreien Diät (Altromin 1013) gefüttert und mit Wasser versorgt. Als Einstreu für die Käfige wurden Holzspäne (Altromin) benutzt. Zur Zucht wurden zwei heterozygote Weibchen im gebärfähigen Alter (8-45





**Abb. 3: Generierung der KO-Mausmodelle**

Die Mäuse mit geflochten Exon 10 der NO-GC (flox/flox- $\beta_1$ ) wurden mit Mäusen, die ubiquitär Cre exprimieren, gekreuzt (Ella-Cre), wodurch vollständige KOs der NO-GC (GCKO) entstanden.

Die flox/flox- $\beta_1$ -Mäuse wurden ebenfalls mit Mäusen verpaart, bei denen die Cre gewebespezifisch exprimiert wurde (Glattmuskel-spezifische Cre, SMMHC-Cre); (Cajal-spezifische Cre, c-Kit-Cre), wodurch gewebespezifische KOs entstanden. Aus diesen Tieren wurden doppel-KOs erzeugt, die sowohl in den Cajalzellen als auch in den glatten Muskelzellen keine NO-GC mehr exprimierten (dbl-GCKO).

Wochen) mit einem heterozygoten Männchen (7 Wochen bis 1 Jahr) zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden im Alter von 18-21 Tagen durch PCR-Analyse von Schwanz- oder Ohrgehörte genotypisiert. Im Alter von 21 Tagen wurden sie von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

Die SM-GCKO, ICC-GCKO und dbl-GCKO Tiere erhielten die Standarddiät (Altromin 1320).

### **3.7.2. Induktion des KOs mittels Tamoxifen-Injektion**

Mäuse (WT, SM-GCKO, ICC-GCKO und dbl-GCKO) im Alter von 6-8 Wochen wurden mit Tamoxifen (1 mg i.p.) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen injiziert. Der letzte Tag der Injektion wurde als Tag null (d0) bezeichnet. Die Mäuse wurden an den jeweiligen Versuchstagen dekapitiert und untersucht (pre, d5, d10, d14, d20, d32, d53, d72, d150). Das SMMHC-Cre Transgen ist auf dem Y-Chromosom lokalisiert, so dass nur männliche Nachkommen das Gen tragen. Somit wurden für die Studien mit den SM-GCKO und dbl-GCKO Tieren nur männliche Mäuse verwendet. In allen Experimenten wurden WT-Wurfgeschwister als Kontrollen verwendet.

### **3.7.3. Lyse des Gewebes zur Isolierung von genomischer DNA**

Die Lyse des Gewebes wurde nach HotSHOT Methode durchgeführt (Truett *et al.*, 2000). Dazu wurden zu Schwanz- oder Ohrgehörte 50 µl Alkalischer Lyse-Puffer hinzugegeben (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) und bei 95°C für 20 Minuten geschüttelt. Zu dem gelösten Gewebe wurden 50 µl Neutralisations-Reagenz (40 mM Tris-Hydrochlorid Salz) gegeben und gevortext. Direkt aus diesem Ansatz wurden 2 µl der Probe in die PCR eingesetzt.

### **3.7.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) können definierte DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen amplifiziert werden (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989). Die PCR besteht aus einer Wiederholung von drei Reaktionsschritten: Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation. Die Oligonukleotide für die PCR wurden in lyophilisierter Form von der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen und auf eine Konzentration von 50 µM mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eingestellt. Die spezifischen Primer zur Bestimmung der Genotypen wurden zur Amplifizierung in einer Multiplex-PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt und enthielt 2 µl Template-DNA (ca. 200 ng genomische DNA), je 500 nM der Primer, je 200 µM der Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 U

Taq-Polymerase (Genecraft), den von der Herstellerfirma des Enzyms mitgelieferten Puffer in einfacher Konzentration und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die PCR wurde in einem Thermocycler nach einem initialen Denaturierungsschritt der doppelsträngigen Template-DNA (3 min bei 94°C) bei folgendem Temperaturverlauf durchgeführt: 1: Denaturierung: 94°C / 30 s

2: Anlagerung der Primer: ermittelte Annealing-Temperatur (Ta) / 45 s

3: Verlängerung der Primer: 72°C

Diese Schritte wurden 30 - 35 mal wiederholt. In der letzten Runde wurde die Zeit des Polymerisationsschrittes auf 7 min verlängert, damit alle Stränge vollständig synthetisiert wurden. Bei allen Amplifikationen wurde eine Negativkontrolle in Form eines PCR-Ansatzes ohne Template-DNA mitgeführt, um mögliche Kontaminationen nachzuweisen.

### **3.7.5. Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente können durch ihre unterschiedliche negative Ladung und Länge elektrophoretisch in horizontalen Agarosegelen getrennt werden. Dabei ist die relative Wanderungstrecke eines DNA-Fragmentes umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus seiner Länge. Durch Verwendung von Größenmarkern kann somit die Länge der unbekanntes DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Es wurden zwei Größenmarker verwendet. Zur Größenbestimmung zwischen 12 kb und 500 bp wurde die „1 kb DNA Ladder“ (Invitrogen, Carlsbad (USA)) eingesetzt. Um kleinere Fragmente zwischen 1,5 kb und 100 bp bestimmen zu können wurde „100 bp DNA Ladder“ (NEB) verwendet.

Um die DNA-Fragmente in den Agarosegelen sichtbar zu machen wurde Ethidiumbromid-Lösung (10 µl einer 1%-igen (10 mg/ml) Ethidiumbromid-Stocklösung ad 100 ml 1-fach TAE-Puffer) zugegeben. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen, absorbiert UV-Licht (254 nm) und gibt diese Energie im sichtbaren Bereich (560 nm) wieder ab. Dabei werden die DNA-Fragmente als rot-orange-farbene Banden sichtbar. Zur Dokumentation der Banden wurden die Agarosegele auf dem UV-Transilluminator (Fluo-Link; Biometra) von unten mit UV-Licht bestrahlt und ein Bild mit einer CCD-Kamera (QuickStore; MS Laborgeräte) erstellt. Bei der semiquantitativen PCR wurden die Banden der β<sub>1</sub>-Untereinheit und der α<sub>1</sub>-Untereinheit normiert, indem sie durch die Intensität der GAPDH-konstitutiv exprimierten Gen-Banden dividiert wurden.

### 3.8. Organbad

#### 3.8.1. Lösungen, Puffer

Die Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Pufferlösung (K-H-Lösung) war wie folgt:

---

<b>Krebs-Henseleit-Pufferlösung:</b>	118,0 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1,2 mM	MgSO <sub>4</sub>
	25,0 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7,5 mM	Glucose

---

pH 7,4 Bei Begasung mit Carbogen

Die K-H-Lösung wurde jeden Tag aus zwei Stammlösungen frisch angesetzt, ständig mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast und durch ein Wärmebad auf 37°C gehalten. Es wurden 40 ml der Stammlösung A mit 920 ml Aqua dest. bei 37°C versetzt und 30 min mit Carbogen begast. Anschließend wurden 40 ml der Lösung B sowie 1,5 g Glucose hinzugefügt.

Die beiden Stammlösungen bestanden aus:

---

<b>Lösung A:</b>	172,50 g	NaCl
	8,75 g	KCl
	9,36 g	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	7,34 g	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	4,05 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		Aqua dest. ad 1000 ml

---

<b>Lösung B:</b>	52,5 g	NaHCO <sub>3</sub>
		Aqua dest. ad 1000 ml

Von den verwendeten Agonisten, NO-Donatoren, Sildenafil, ANP, Carbachol, VIP und 8-Br-cGMP wurden vor jedem Versuch frische Stammlösungen angesetzt und davon ausgehend die Verdünnungsreihen hergestellt.

#### 3.8.2. Präparation der Gewebestücke

Für die Organbadversuche für gastrointestinale Gewebe wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation betäubt und anschließend dekapitiert. Der gesamte Magen-Darm-Trakt wurde durch einen Mittelbauchschnitt entnommen und sofort in K-H-Lösung überführt. Für die Versuche mit Duodenalgewebe wurde der Inhalt des Darms durch sanftes Durchspülen mit K-H-Lösung entfernt, ohne dabei die Mucosa zu beschädigen. Das Duodenum wurde quer geschnitten, so dass Ringe entstanden, die längs ins Organbad

eingespannt wurden. Der Inhalt des Magens wurde durch sanftes Durchspülen mit K-H-Lösung entfernt. Der vom Mageninhalt befreite Fundus wurde längs geschnitten, wodurch man Streifen von der Größe 2 x 8 mm erhielt, die längs eingespannt wurden. Bei diesen Geweben wurde die Längsmuskulatur untersucht.

Der Pylorus- und der untere Ösophagussphinkter (PS und LES (lower esophagus sphincter)) wurden vom Mageninhalt befreit und als Ringe über die Haken des Organbades gezogen, wodurch die Ringmuskulatur untersucht wurde.

Nach der Dekapitierung der Tiere wurde die Aorta herauspräpariert und sofort in K-H-Lösung überführt. Das Gewebe wurde von Bindegewebe befreit und vorsichtig mit K-H-Lösung durchspült, um Blut aus der Aorta zu entfernen. Es wurden Ringe geschnitten (0,2 mm), die über die Haken des Organbades gezogen wurden, wodurch die Ringmuskulatur untersucht wurde.

### **3.8.3. Einspannen und Messung der Proben im Organbad**

Nach den beschriebenen Präparationen wurden die Gewebestücke in den Organkammern des 4-Kanal-Multi-Myographen (Modell 610M, Danish Myo Technology) fixiert. In den Organkammern befanden sich 5 ml K-H-Lösung, welche unter ständiger Carbogen-Begasung standen. Die Fundus-Streifen wurden mit einer Vorspannung von 2 - 4 mN für mindestens 45 min äquilibriert. Dabei wurde die K-H-Lösung alle 10 - 15 min durch frische Lösung ersetzt, um eine Akkumulation von Mucus und Verdauungsenzymen zu verhindern.

Die Duodenum-Ringe wurden ebenfalls für mindestens 45 min äquilibriert und dabei mit 2 - 4 mN vorkontrahiert. Die sofort einsetzenden cyclischen Kontraktionen wurden in Kontraktionen pro Minute gemessen. Die natürliche cyclische Kontraktion und Relaxation des Darmes erschwerte die Auswertung der Messungen mit Dosis-Wirkungs-Kurven der NO-Donatoren. Um verlässliche Werte zu erhalten, wurde der Lösung Nifedipin (ein Calciumantagonist, der den Calciumionen-Einstrom in die Zellen der glatten Muskulatur unterbindet) hinzugegeben, was die spontane cyclische Kontraktion verhinderte. Die Sphinkteren wurden mit einer Vorspannung von 2 mN für 60 min äquilibriert (frische Lösung alle 10 - 15 min). Nach der Äquilibrierungsphase wurden die Gewebestücke kontrahiert. Für die Fundus-Experimente wurde zur Kontraktion Carbachol (CCh) verwendet (0,1  $\mu$ M). Für Duodenum und Sphinkteren wurde ebenfalls CCh (jeweils 1  $\mu$ M) zur Kontraktion verwendet. Um die vollständige Relaxation zu überprüfen, wurde am Ende der Versuche IBMX (100  $\mu$ M) ins Organbad gegeben.

Die Aorten wurden mit Phenylephrin (1  $\mu$ M) in Anwesenheit von Diclofenac (Inhibitor der Cyclooxygenase, 3  $\mu$ M) und L-NAME (Inhibitor der NO-Synthasen, 200  $\mu$ M)

kontrahiert. Die Vorkontraktion wurde auf 5 mN eingestellt. Bei der endogenen Ausschüttung von NO mittels CCh und vasoaktivem intestinalen Peptid (VIP) wurde U46119 (10 nM) zur Kontraktion verwendet, da es bei diesem Agonisten nur zu einer leichten Voraktivierung der NOS kommt. Die Relaxation der Aorten wurde erst nach dem Einstellen eines stabilen Kontraktionsplateaus gestartet. Nach Zugabe von ODQ, einem spezifischen Blocker der NO-GC, wurde 20 min gewartet, um eine vollständige Inhibition der NO-GC zu gewährleisten. Bei dem Erstellen von kumulativen Dosis-Wirkungs-Kurven wurde erst nach Durchlaufen der Minima die nächste Konzentration appliziert. Zur prozentualen Auswertung der Relaxation wurde am Ende der Dosis-Wirkungs-Versuche IBMX (100  $\mu$ M) zu gegeben, um eine vollständige Relaxation auszulösen.

#### **3.8.4. Elektrische Feldstimulation der Fundus-Streifen**

Für die elektrische Feldstimulation (EFS) wurden die Fundus-Streifen wie unter 3.8.2. beschrieben präpariert. Ins Organbad wurden zwei Stabplatinelektroden mit einer Länge von 5 mm eingetaucht, die sich in einem seitlichen Abstand von 3 mm zum Gewebe befanden. Über die bipolaren Platinelektroden konnten die Gewebe mit elektrischen Feldern (10 s, 0,5 ms Einzelpulsdauer) von unterschiedlicher Herzfrequenz stimuliert werden. Zur Kontraktion der Fundus-Streifen wurde nicht Carbachol, wie bei der pharmakologischen Betrachtung des Gewebes verwendet, sondern U46619 (100 nM) ein Thromboxan A<sub>2</sub>-Analogon eingesetzt, da unter NANC-Bedingungen stimuliert wurde. NANC-Bedingungen wurden durch Zugabe von Atropin und Guanethidin (jeweils 1  $\mu$ M) mindestens 30 min vor Beginn der Feldstimulation erreicht.

### **3.9. In vivo Messungen**

#### **3.9.1. Messung des Blutdrucks**

Der systolische Blutdruck wurde an wachen, nicht narkotisierten Mäusen mittels Schwanz-Plethysmographie (Softron BP-98A, Tokyo, Japan) gemessen. Für die Messung der Blutdruckänderung nach Tamoxifen-Injektion wurden die Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen vor der Injektion und an den Tagen: d1, d5, d10, d16, d21, d27, d36, d44 gemessen. Die Tiere wurden vor der Versuchsreihe an die Schwanz-Plethysmographie-Messung gewöhnt, um verlässliche Daten zu erhalten. Bei den Messungen der L-NAME-induzierten Blutdruckveränderung wurden die Tiere ebenfalls an die Schwanz-Plethysmographie-Methode gewöhnt. Dem Trinkwasser der Tiere wurde L-NAME zugesetzt und nach d1, d3 und d5 die Blutdruckwerte gemessen.

### **3.9.2. Darm-Passagezeit**

Um die Darm-Passagezeit von Mäusen zu bestimmen wurde jeder Maus Carmin (50 µl; 3 mg von Carmin in 0,5% Methylcellulose in 10 ml H<sub>2</sub>O) oral verabreicht. Anschließend wurden die Tiere einzeln in Käfige mit Wasser und Nahrung gesetzt und die Zeit bis zur ersten Exkretion roten Kotes gemessen.

# Ergebnisse

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade trägt entscheidend zur Regulation von Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur bei. In dieser Arbeit soll die Rolle der NO-GC in der glatten Muskulatur für das vaskuläre System (4.1) und für die gastrointestinale Motilität (4.2 + 4.3) geklärt werden. Hierzu wurden Maus-Linien generiert, bei denen die NO-GC entweder speziell in glatten Muskelzellen, in ICC oder in beiden Zelltypen gleichzeitig ausgeschaltet war.

## **4.1. Die Funktion der NO-GC der glatten Muskulatur im vaskulären System**

Vollständige Knockout-Mäuse der Guanylyl-Cyclase zeigen einen im Vergleich zu den WT-Kontrollen erhöhten systolischen Blutdruck von ~30 mmHg. Dabei stellt sich die Frage, ob das Fehlen der NO-GC in der glatten Muskulatur und/oder in nicht-glattmuskulären Zellen für den erhöhten Blutdruck verantwortlich ist. Um diese Frage zu klären, wurde an den SM-GCKO-Tieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die NO/cGMP-Signalkaskade eingehend untersucht.

### **4.1.1. Generierung der SM-GCKO-Mäuse**

Für die Erzeugung der Glattmuskel-spezifischen GCKO-Mäuse (SM-GCKO) benutzten wir die in unserer Arbeitsgruppe zuvor erzeugte Mauslinie, in der das Exon 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC homozygot gefloxt vorlag ( $\beta_1$ -flox/flox; Friebe *et al.*, 2007). Die  $\beta_1$ -flox/flox Mauslinie wurde mit einer Mauslinie gekreuzt, die ein Fusionsprotein der Cre-Recombinase mit einer modifizierten Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne (CreER<sup>T2</sup>) exprimiert. Dieses Fusionsprotein befindet sich unter der Kontrolle des Glattmuskel-spezifischen MHC Promotors (smooth muscle myosin heavy chain: SMMHC; Wirth *et al.*, 2008). Daher wird in diesen Mäusen die Cre-Recombinase nur in den glatten Muskelzellen exprimiert. Durch Bindung des Tamoxifen an die Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne löst sich die Cre-Recombinase von dem Fusionsprotein und kann in den Zellkern eindringen. Im Zellkern schneidet die Cre-Recombinase die gefluxten DNA-Sequenzen aus, wodurch es zum spezifischen Ausschnitt des Exon 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase in den glatten Muskelzellen kommt.

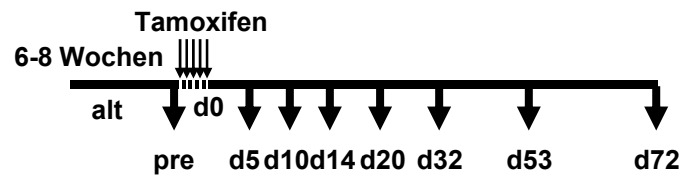


SM-GCKO- und WT-Mäusen wurde Tamoxifen entsprechend dem in Abb. 4 A gezeigten Zeitschema intraperitoneal injiziert. Hierzu wurden ausschließlich männliche Mäuse benutzt, da das Cre-haltige Konstrukt Y-chromosomal codiert vorlag. Allen Mäusen wurde Tamoxifen (1 mg i.p.) jeweils an fünf aufeinanderfolgenden Tagen gespritzt. Der letzte Tag der Injektion wurde als Tag 0 definiert. Die Mäuse wurden an den Tagen 5, 10, 14, 20, 32, 53 und 72 analysiert. Im Folgenden werden die an den jeweiligen Tagen untersuchten Tiere mit dem entsprechenden Subskripten bezeichnet (bspw. SM-GCKO<sub>d10</sub> für ein an Tag 10 nach Tamoxifen-Injektion analysiertes Tier, oder auch SM-GCKO<sub>>d50</sub> für Tiere, die nach Tag 50 analysiert wurden; das Subskript 'pre' steht für unbehandelte Tiere des jeweiligen Genotyps). Als Kontrollen dienten sowohl WT- und SM-GCKO-Mäuse, die kein Tamoxifen erhielten (WT<sub>pre</sub>- und SM-GCKO<sub>pre</sub>-Tiere), als auch Tamoxifen-injizierte WT-Tiere. Alle Kontrolltiere trugen das Cre-Transgen.

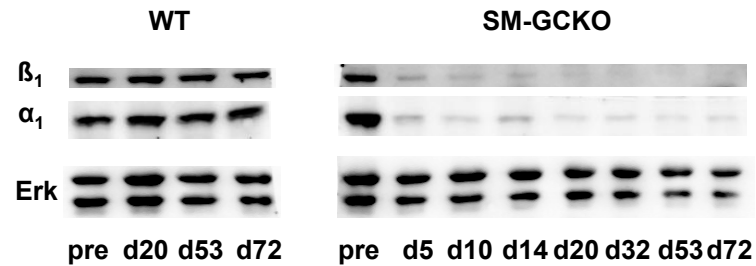
#### 4.1.2. Zeitverlauf der NO-GC-Deletion

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen wurde die Aorta verwendet. Zu den in Abb. 4 A angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren die Aorta entnommen und daraus ein Homogenat gewonnen. Die Proteine des Homogenats wurden mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt und mittels Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen die  $\beta_1$ - und  $\alpha_1$ -Untereinheiten der NO-GC untersucht. Als Ladekontrolle wurde Extracellulärsignal regulated kinase (p42/p44 Erk) verwendet. Der repräsentative Blot (Abb. 4 B) zeigt deutlich die zeitabhängige Abnahme der  $\beta_1$ -Untereinheit in den Aorten der Tamoxifen-behandelten SM-GCKO-Tiere. Wie auch schon in den GCKO-Tieren beobachtet (Friebe *et al.*, 2007) wurde nach der Deletion der  $\beta_1$ -Untereinheit auch die  $\alpha_1$ -Untereinheit nur noch sehr schwach exprimiert. Die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit nahm parallel zu der Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit ab. Somit führte das Ausschneiden des Exons 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit zu einem vollständigen Verlust der NO-GC in den glatten Muskelzellen der Aorta. Die WT-Kontrollen hingegen zeigten keine Veränderung der Expression der NO-GC, zu sehen an der unveränderten Expression der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit über den untersuchten Zeitraum von 72 Tagen. Die quantitative Analyse (Abb. 4 C) zeigte fünf Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion eine Abnahme der NO-GC-Expression um 75%. In den folgenden Tagen nahm die Menge der NO-GC weiterhin ab. Sogar 150 Tage nach Tamoxifen-Injektion konnte keine NO-GC-Expression in den glatten Muskelzellen der Aorta detektiert werden; daher kann eine Regeneration der NO-GC in den

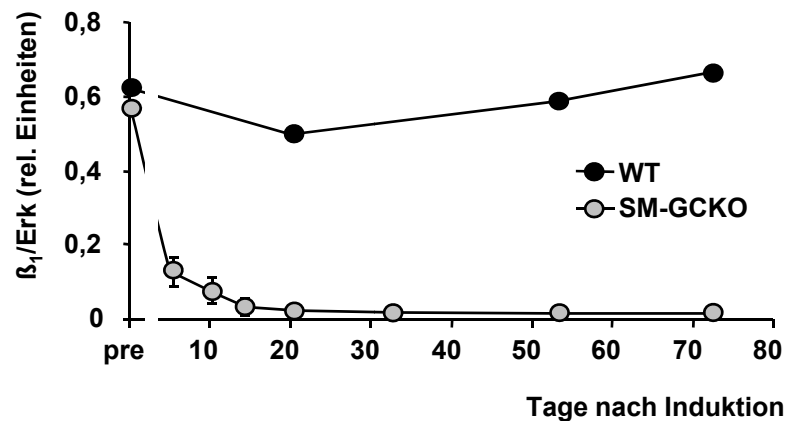
A



B



C



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

#### Abb. 4: Zeitschema der Erzeugung der SM-GCKO-Mäuse

- (A) Männlichen Mäusen (6-8 Wochen alt) wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen Tamoxifen injiziert (1 mg; i.p.). Der letzte Tag der Injektion wurde als Tag 0 definiert. Die Mäuse wurden an den abgebildeten Tagen analysiert. Kontrolltiere waren WT und SM-GCKO ohne Tamoxifen-Injektion ( $WT_{pre}$  and  $SM-GCKO_{pre}$ ) als auch WT mit Tamoxifen-Injektion mit Cre-Transgen ( $WT_{d5}$  bis  $WT_{d72}$ ).
- (B) Aorten-Homogenate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die NO-GC mit  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit Antikörper detektiert. Das Enzym p42/p44 (Erk) diente als Ladekontrolle.
- (C) Quantitative Analyse der Western-Blots in relativen Einheiten (Verhältnis  $\beta_1$ -Untereinheit zu Erk; n = 2-5 Tiere pro Zeitpunkt).

ursprünglichen sowie in gegebenenfalls neu gebildeten glatten Muskelzellen ausgeschlossen werden.

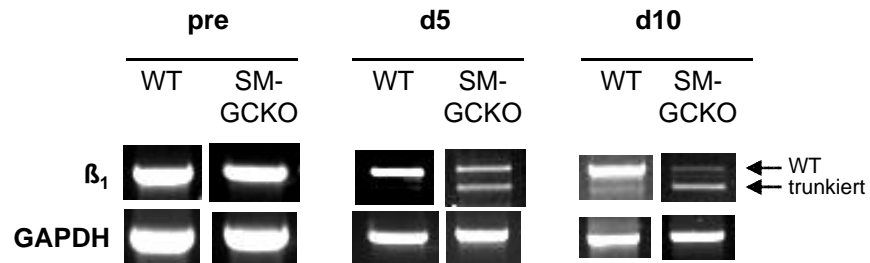
#### 4.1.3. Analyse der mRNA der NO-GC-Untereinheiten in der Aorta mittels PCR

Um den Ausschnitt des Exons 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit ebenfalls auf RNA-Ebene zu zeigen, wurde eine semi-quantitative PCR für die  $\beta_1$ - und die  $\alpha_1$ -Untereinheit durchgeführt; als Kontrolle diente dabei das Houskeeping-Gen GAPDH. Durch den Ausschnitt des Exons 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit sollte in der Zelle eine trunkierte mRNA der  $\beta_1$ -Untereinheit entstehen. Abb. 5 A zeigt den Vergleich von nichtgespritzten Tieren ( $WT_{pre}$  vs.  $SM-GCKO_{pre}$ ) mit Tieren, deren Aorten 5 bzw. 10 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion heraus präpariert wurden. Fünf Tage nach Tamoxifen-Injektion war neben der WT-Bande eine trunkierte Version der  $\beta_1$ -mRNA zu erkennen. Dabei war die nicht-trunkierte  $\beta_1$ -mRNA in  $SM-GCKO_{d5}$ -Tieren um 90% gegenüber den  $SM-GCKO_{pre}$ -Tieren reduziert (Abb. 5 B). Diese Reduktion blieb auch nach 10 Tagen erhalten. Im Gegensatz dazu blieb die mRNA der  $\alpha_1$ -Untereinheit nach Tamoxifen-Injektion sowohl bei den Kontrollen als auch bei den  $SM-GCKO$ -Tieren unverändert (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur in Abb. 4 B gezeigten Reduktion der Protein-Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit. Es ist anzunehmen, dass die Transkription des Gens der  $\alpha_1$ -Untereinheit normal verläuft, aber die Translation der mRNA reduziert ist, da kein Partner ( $\beta_1$ -Untereinheit) zur Bildung des funktionsfähigen Dimeres vorhanden ist.

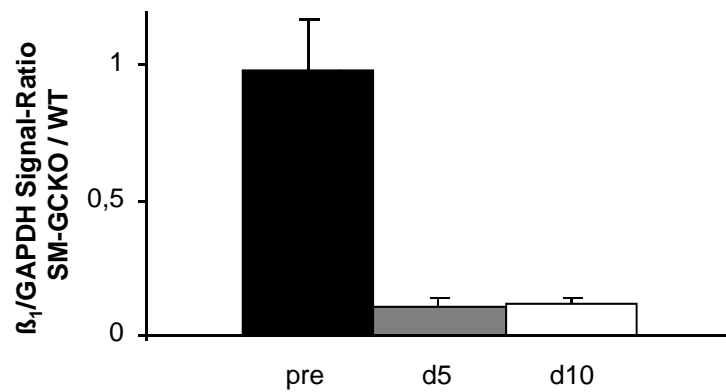
#### 4.1.4. Messung der NO-induzierten cGMP-Produktion mittels RIA

Als Nächstes wurde untersucht, ob sich die NO-induzierte cGMP-Produktion durch die Tamoxifen-induzierte Abnahme der NO-GC verringert. Dafür wurden Aorten von  $SM-GCKO$ -Mäusen an den in Abb. 6 genannten Tagen verwendet. Die Aorten wurden in Krebs-Henseleit-Lösung mit DEA-NO (100  $\mu$ M, 30 s) in Anwesenheit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (100 nM) inkubiert und anschließend schockgefroren. Nach Aufarbeitung der Aortenstücke konnte mittels Radioimmunoassay die cGMP-Menge in den Proben bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die DEA-NO-stimulierte cGMP-Produktion schon fünf Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion um 75% verringert war. Am Tag 10 war fast keine cGMP-Produktion mehr detektierbar. Auch an den folgenden Tagen (20d – 72d) war kein cGMP mehr zu messen. Damit entspricht die Kinetik des Rückgangs der cGMP-Produktion der Kinetik des Rückgangs der NO-GC-Expression (Abb. 6). Zusammenfassend kann man sagen, dass der Tamoxifen-induzierte Rückgang der NO-GC-Expression parallel mit der verminderten Bildung von cGMP einhergeht.

A



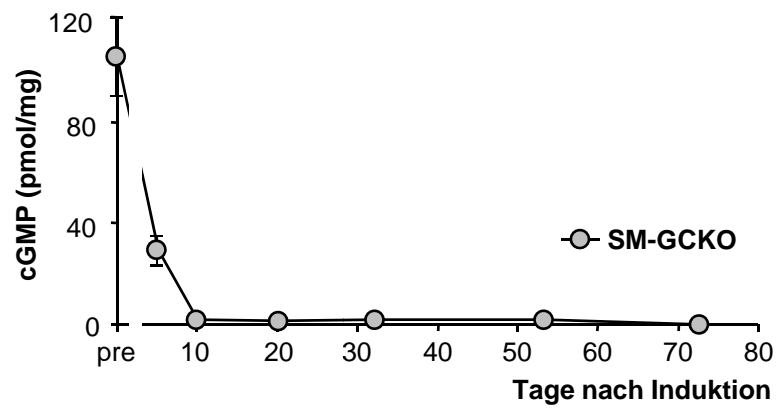
B



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

### Abb. 5: mRNA-Expression der $\beta_1$ -Untereinheit

- (A) Mittels semi-quantitativer PCR wurde die mRNA-Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit in WT und SM-GCKO vor und nach Tamoxifen-Injektion bestimmt. Als Ladekontrolle wurde die mRNA der GAPDH, einem Housekeeping-Gen, gemessen.
- (B) Quantitative Analyse von n = 2-3 Tiere pro Genotyp und Zeitpunkt.



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

**Abb. 6: DEA-NO-induzierte cGMP-Produktion in der Aorta von SM-GCKO-Mäusen**

Quantitative Analyse der cGMP-Produktion in Aorta. Aorten wurden mit DEA-NO (100  $\mu$ M) für 30 Sekunden stimuliert und folgend mittels Radioimmunoassay der cGMP-Gehalt gemessen (n = 2 - 7 Tiere pro Zeitpunkt).

#### 4.1.5. Immunhistochemie der glatten Gefäßmuskulatur

In einem nächsten Schritt wurde die Deletion der NO-GC in der glatten Gefäßmuskulatur mittels Immunhistochemie überprüft (Abb. 7). Für die Darstellung der glatten Muskelzellen wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch mit  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin ( $\alpha$ -SMA; grüne Färbung) interagiert. Die Expression der NO-GC wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit nachgewiesen ( $\beta_1$ ; rote Färbung).

Als Kontrollen wurden WT-Tiere verwendet, die mindestens 50 Tage zuvor mit Tamoxifen behandelt wurden. Dieser späte Zeitpunkt wurde gewählt, da anhand der Organbad-Experimente eine vollständige Deletion der NO-GC erst 50 Tage nach Tamoxifen-Behandlung nachgewiesen wurde (siehe unten: 4.1.7.1.).

Der  $\beta_1$ -Antikörper führte zu starken Signalen in den Geweben der WT-Tiere. Die Darstellung der glatten Muskelzellen mit Hilfe des  $\alpha$ -SMA-Antikörpers zeigte eine identischen Lokalisation der Immunfluoreszenzen. Diese Kollokalisierung deutet auf eine starke Expression der NO-GC in glatten Muskelzellen hin. Die betrachteten Gewebe (thorakale Aorta, Femoralarterie und Myokard) der SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tiere zeigten keine NO-GC-spezifischen Immuno-Signale in den  $\alpha$ -SMA-positiven Gefäßen. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass die Tamoxifen-Injektion zu einem erfolgreichen, spezifischen Ausschneiden der NO-GC in den glatten Muskelzellen führt.

#### 4.1.6. Nachweis der NO-GC-Expression in Thrombozyten-Lysat und Hirn-Homogenat

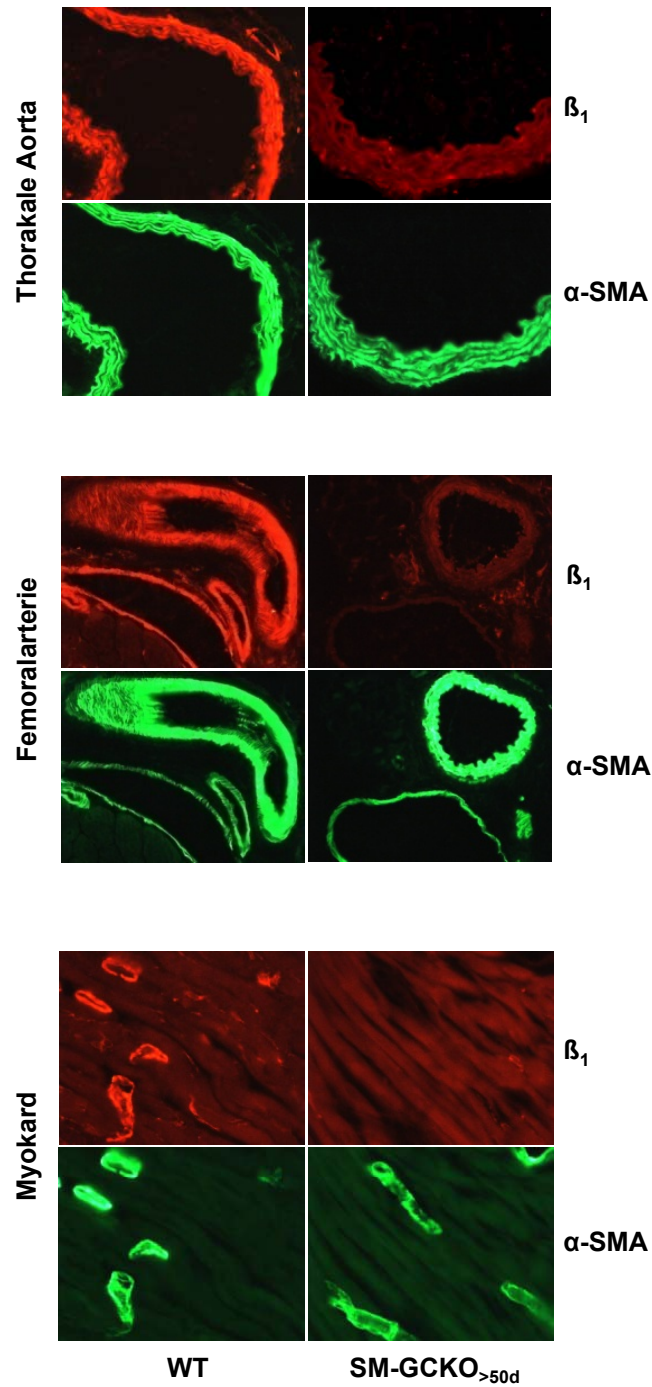
Eine hohe NO-GC-Expression findet sich auch in Thrombozyten und Neuronen. Zur Kontrolle der Spezifität des Glattmuskel-Promotors (SMMHC) wurde die Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit in diesen Zellen untersucht; dabei sollte sich keine Änderung der NO-GC-Expression ergeben. Es wurden Hirn-Homogenate und Thrombozyten-Lysate von WT<sub>>50d</sub> und SM-GCKO<sub>>50d</sub> hergestellt. Zusätzlich wurden auch die entsprechenden Gewebe unbehandelter Tiere untersucht (WT<sub>pre</sub> und SM-GCKO<sub>pre</sub>). Bei den Hirn-Homogenaten lag keine signifikante Veränderung der Expression der drei NO-GC-Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta_1$ ) von KO gegen WT vor. Auch bei den Thrombozyten zeigte sich keine unterschiedliche Expression der  $\alpha_1$ - oder  $\beta_1$ -Untereinheit zwischen SM-GCKO und WT (Abb. 8 A, B). Diese Ergebnisse bestätigen die Spezifität der SMMHC-Cre Maus und damit der glattmuskulären KOs.

#### 4.1.7. Relaxation der Aortenringe im Organbad

##### 4.1.7.1. NO-induzierte Relaxation der glatten Aortenmuskulatur

Als Nächstes wurde untersucht, ob es während der zeitabhängigen Verminderung der NO-GC zu einer funktionellen Veränderung kommt. Hierzu wurden Organbad-

A

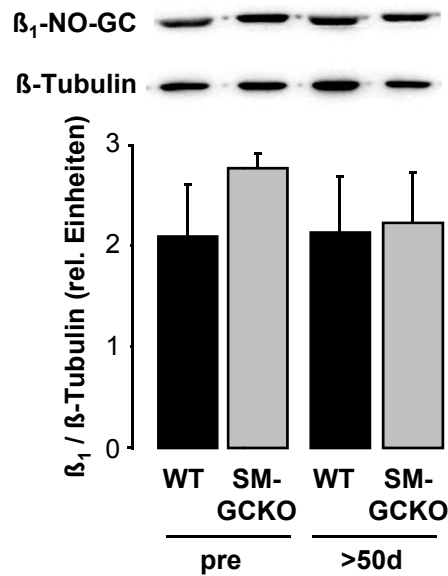


Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

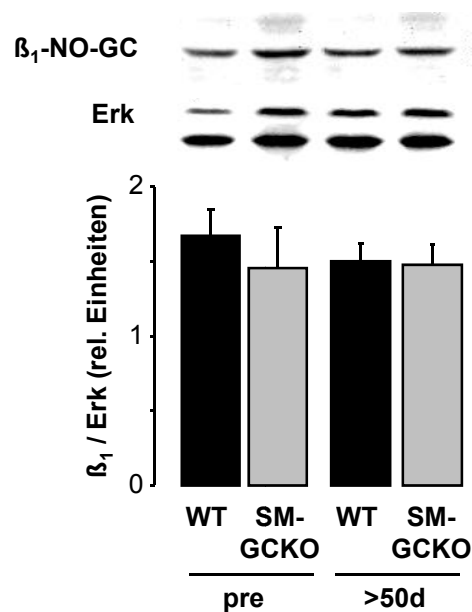
**Abb. 7: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression**

Thorakale Aorta, Femoralarterie und Myokard von WT<sub>d50</sub>- und SM-GCKO<sub>d50</sub>-Tieren wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin ( $\alpha$ -SMA) (grün) detektiert.

A



B



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

### Abb. 8: Expression der NO-GC in Hirn-Homogenaten und Thrombozyten

- (A) Für die Western-Blot Analyse wurden Thrombozyten-Lysate auf ein 9%-iges Gel aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit einem spezifischen Antikörper gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit wurde die Expression der NO-GC untersucht. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Tubulin (jeweils n = 3 Tiere).
- (B) Hirn-Homogenate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der NO-GC mit einem spezifischen Antikörper gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit überprüft. Als Ladekontrolle diente Erk (jeweils n = 6 Tiere).

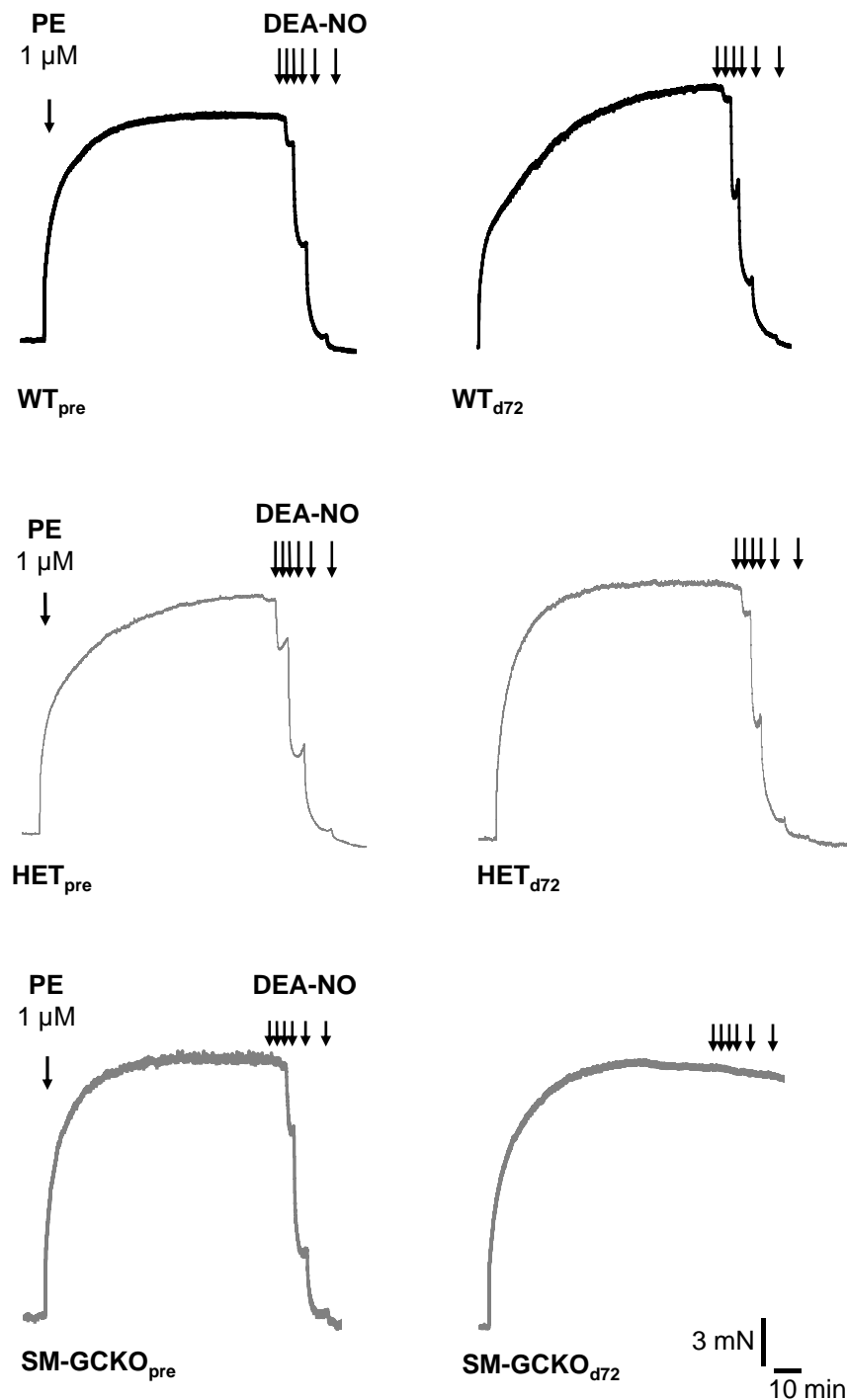


Experimente durchgeführt. Durch Zugabe von Phenylephrin, einem  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Agonisten, wurde eine Kontraktion der in das Organbad eingespannten Aortenringe induziert. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus der Kontraktion wurden steigende Konzentrationen von DEA-NO hinzugegeben und die hervorgerufene Relaxation gemessen (Originalspuren in Abb. 9, statistische Auswertung in Abb. 10). Dabei sollte sich die verringerte Expression der NO-GC nach Tamoxifen-Injektion in einer zeitabhängigen Reduktion der NO-induzierten Relaxation der Aortenringe widerspiegeln. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für NO zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Aorten der verschiedenen Kontroll-Tiere (WT und Heterozygote (HET)), siehe Abb. 10 A, B). Dies zeigt, dass die Tamoxifen-Injektion den NO/cGMP-Signalweg nicht unspezifisch beeinflusst. Im Gegensatz zu den WT- und heterozygoten Tieren zeigten die Aorten der SM-GCKO-Tiere eine zeitabhängige Abnahme der NO-induzierten Relaxation. Dabei war überraschend, dass bis 30 Tage nach Tamoxifen-Injektion noch eine Relaxation durch NO zu beobachten war. Erst bei Tieren, bei denen die letzte Tamoxifen-Injektion 50 Tage oder länger zurück lag, war die NO-vermittelte Relaxation vollständig verschwunden (Abb. 10 C). Es lässt sich also festhalten, dass die im Western Blot gezeigte Reduktion der NO-GC-Expression einhergeht mit einer zeitabhängigen Verminderung der NO-induzierten Relaxation der glatten Aortenmuskulatur. Dabei kann von einer relativ langen Halbwertszeit der NO-GC ausgegangen werden, da erst 50 Tage nach Tamoxifen-Injektion ein vollständiger Verlust der NO-vermittelten Relaxation auftrat. Im Folgenden wurde daher beim Einsatz von SM-GCKO-Mäusen mindestens 50 Tage nach Tamoxifen-Injektion gewartet, um einen vollständigen Glattmuskel-spezifischen Knockout zu erhalten.

#### **4.1.7.2. Zeitabhängige Verminderung der endogenen NO-Relaxation**

Wie der eben beschriebene Versuch zeigt (siehe 4.1.7.1.), führt die Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen der Aorta zu einer Abnahme der Relaxation durch exogenes NO. Zur Untersuchung, ob diese Abnahme der NO-induzierten Relaxation auch bei endogen produziertem NO zu sehen ist, wurde Carbachol (CCh) verwendet. CCh ist ein stabiles Acetylcholin-Analogon, welches nach Aktivierung eines muskarinergen ACh-Rezeptors zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Endothelzellen führt. Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wiederum führt zu einer Aktivierung der eNOS, die vermehrt NO produziert.

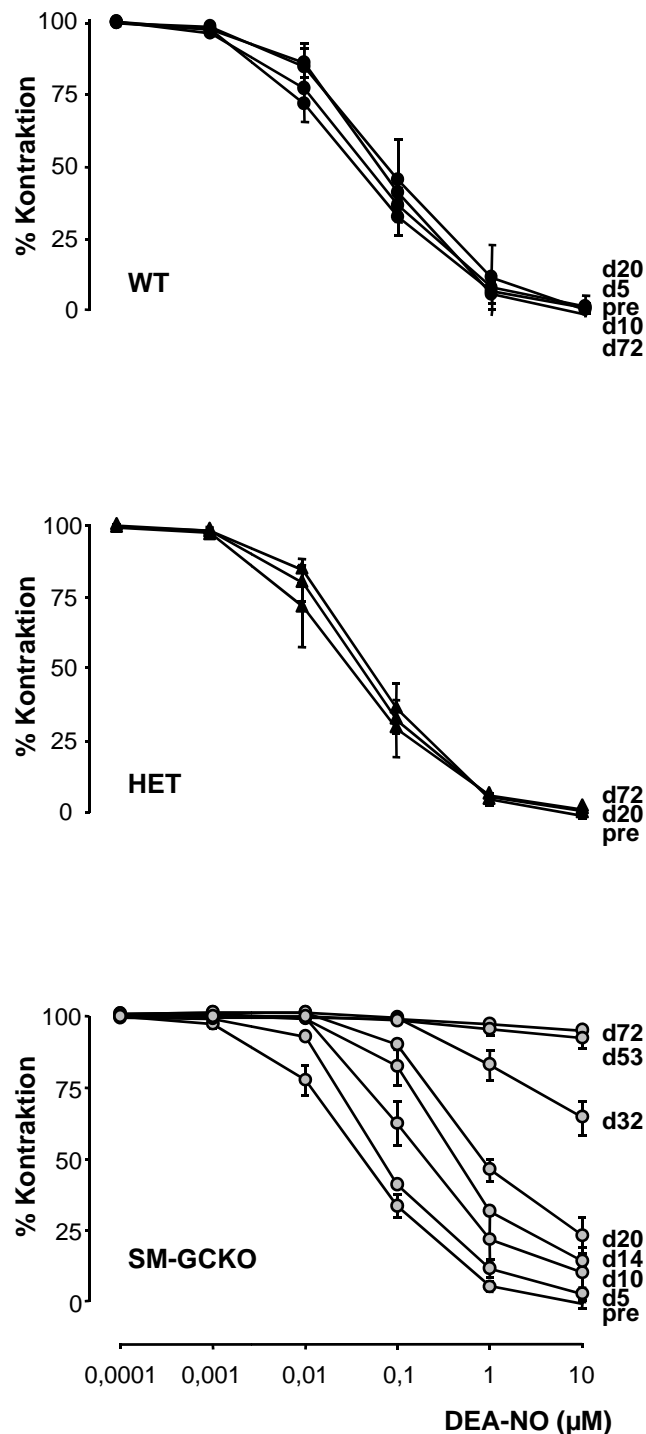
Die Aortenringe wurden im Organbad in der Abwesenheit von L-NAME und Diclofenac mit U46619 (10 nM) vorkontrahiert. Bei Erreichen einer konstanten Kontraktion wurde CCh in einer maximal effektiven Konzentration (30  $\mu\text{M}$ ) appliziert. In Aortenringen von  $\text{WT}_{\text{pre}}$ - und  $\text{WT}_{>50\text{d}}$ -Tieren führte Carbachol zu einer 70%-igen Relaxation. Die Aorten



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

**Abb. 9: NO-vermittelte Aorten-Relaxation im Organbad**

Original-Spuren ( $WT_{pre}$ ;  $WT_{d72}$ ;  $HET_{pre}$ ;  $HET_{d72}$ ;  $SM-GCKO_{pre}$ ;  $SM-GCKO_{d72}$ ) einer Dosis-Wirkungs-Kurve für DEA-NO. Aortenringen wurden in Anwesenheit von L-NAME (200  $\mu$ M) und Diclofenac (3  $\mu$ M) mit Phenylephrin (1  $\mu$ M) kontrahiert und durch Zugabe steigender Konzentrationen DEA-NO relaxiert. Zu sehen ist jeweils eine Originalspur pro Genotyp von Tieren ohne + mit Tamoxifen Behandlung.



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

### Abb. 10: NO-induzierte Relaxation der Aorten im Organbad

Die Aorten von Mäusen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tamoxifen-Injektion präpariert und im Organbad auf ihre Relaxation durch NO untersucht. Als Kontrollen dienten Aorten von Tieren ohne Tamoxifen-Injektion (pre). Die eingesetzten Aorten stammten von WT, heterozygoten (HET) und SM-GCKO-Mäusen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4 - 6$  Experimenten pro Zeitpunkt und Genotyp.

der SM-GCKO<sub>pre</sub>-Tiere zeigten eine den Kontrollen vergleichbare Relaxation von etwa 70% (Abb. 11 A). Diese CCh-induzierte Relaxation war in den Aorten der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere vollständig verschwunden.

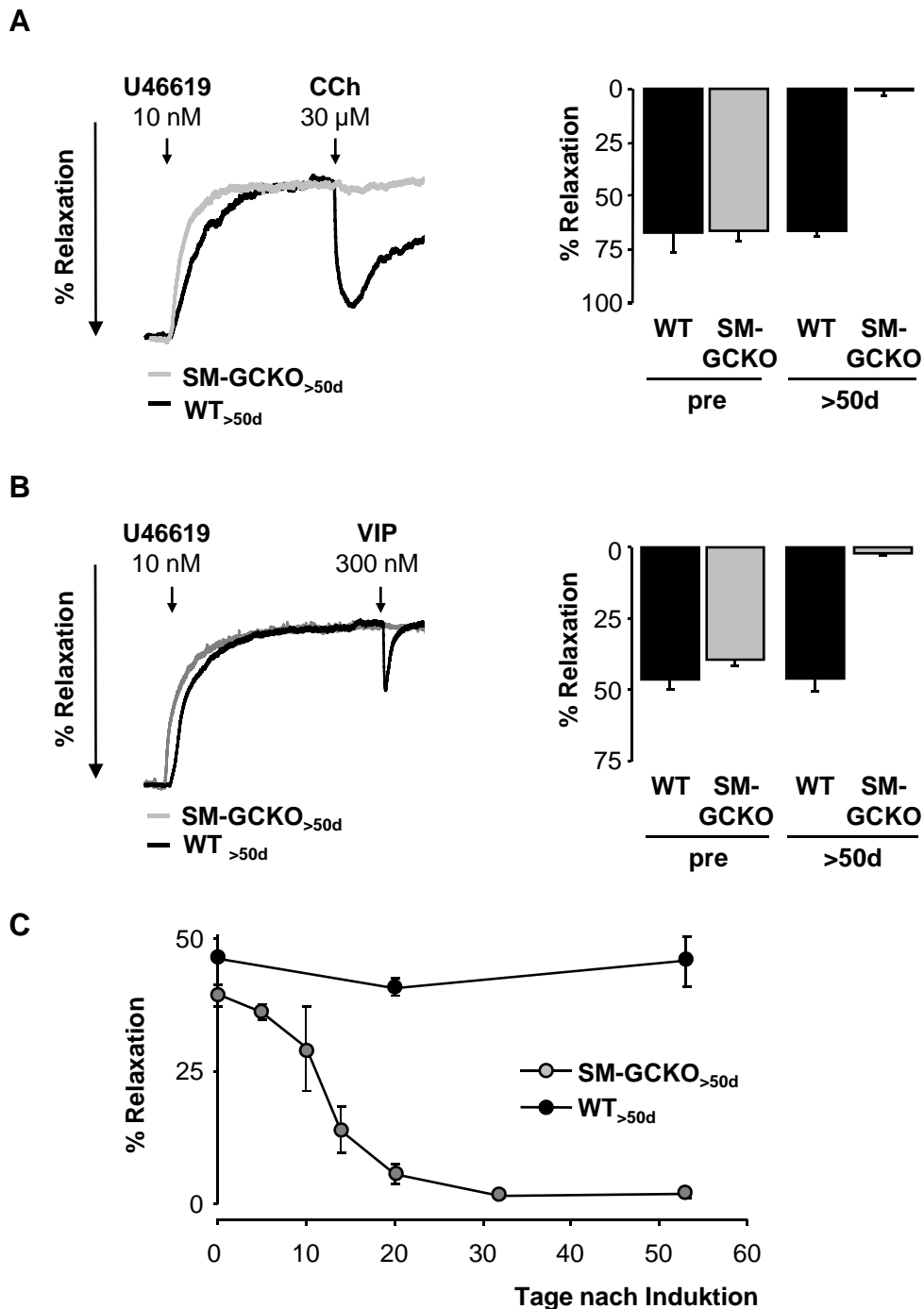
Um die endogene NO-Produktion über einen anderen Signalweg zu stimulieren, wurde in einem zweiten Ansatz vasoaktives intestinales Peptid (VIP) verwendet. VIP führt über VPAC<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einem Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den Endothelzellen und somit ebenfalls zu einer Aktivierung der eNOS. Die Aortenringe der Kontrollen WT<sub>pre</sub>, WT<sub>>50d</sub> und SM-GCKO<sub>pre</sub> zeigten eine quantitativ vergleichbare Relaxation von ca. 40%. Im Gegensatz dazu wiesen die Aorten der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere keine Relaxation durch VIP auf (Abb. 11 B). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der CCh-induzierten Relaxation. Abb. 11 C zeigt die zeitabhängige Abnahme der VIP-vermittelten NO-Responsivität nach Tamoxifen-Injektion. Wie bei der Stimulation mit exogenem NO (Abb. 4.1.7.1.) zeigt sich auch bei Stimulation mit VIP erst 50 Tage nach Tamoxifen-Injektion ein vollständiges Ausbleiben der Relaxation. Insgesamt zeigen diese Experimente, dass auch endogenes, endothelial gebildetes NO keine relaxierende Wirkung auf Aortenringe von SM-GCKO-Tieren mehr hat.

#### 4.1.7.3. Sildenafil-induzierte Relaxation der glatten Muskulatur von Aorten

Als Gegenspieler der Guanylyl-Cyclase fungieren die Phosphodiesterasen. Sie wandeln cGMP in GMP um und beenden somit die cGMP-vermittelte Relaxation. Die Phosphodiesterase 5 (PDE5), eine cGMP-stimulierte, cGMP-abbauende PDE, wird stark in glatten Muskelzellen exprimiert. Zugabe von Sildenafil, einem spezifischen Hemmstoff des Enzyms, führt zu einem erhöhten cGMP-Spiegel, was eine Relaxation zur Folge hat. Die Aorten von WT-Tieren zeigten durch Zugabe von Sildenafil eine dosisabhängige Relaxation (Abb. 12 A, B). Die Sensitivität der PDE5 gegenüber Sildenafil (IC<sub>50</sub> = 10 nM) im Aorten-Gewebe entsprach dem publizierten Wert für das gereinigte Enzym (IC<sub>50</sub> = 3 nM; Bender und Beavo, 2006). Im Gegensatz zu den WT-Aorten führte die Inhibierung der PDE5 in den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Aorten nicht zu einer Relaxation. Erst bei Sildenafil-Konzentrationen von >1 µM kam es in SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Aortenringen zu einer Relaxation, die sehr wahrscheinlich auf unspezifische Inhibierung anderer PDEs zurück zu führen ist. Insgesamt zeigen diese Experimente, dass keine basale cGMP-Produktion in den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren mehr vorhanden ist.

#### 4.1.7.4. Relaxation der glatten Muskulatur durch 8-Br-cGMP und ANP

Es stellte sich im Weiteren die Frage, ob die Signaltransduktion unterhalb der NO-GC durch die Deletion des Enzyms beeinträchtigt wird. 8-Br-cGMP, ein membrangängiges, PDE-stabiles cGMP-Analogon, stimuliert die PKG direkt. 8-Br-cGMP führte in



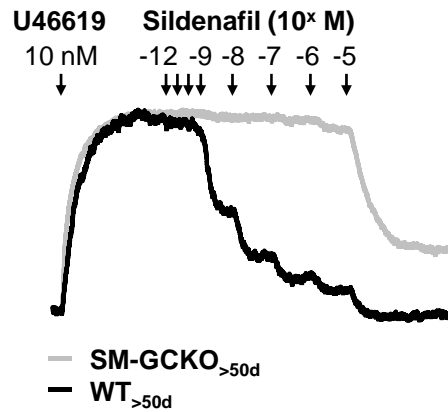
Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

**Abb. 11: Verlust der Relaxation der glatten Aortenmuskulatur durch endotheliales NO**

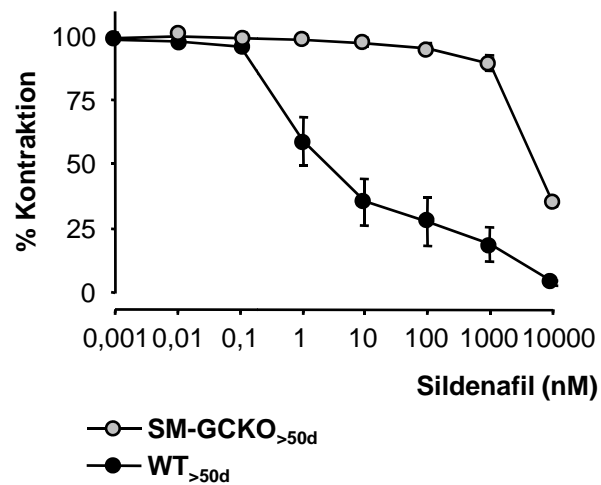
Aortenringe wurden im Organbad mit U46619 (10 nM) in der Abwesenheit von L-NAME und DCF kontrahiert.

- (A) Repräsentative Spuren von WT<sub>d50</sub> (schwarze Linie) und SM-GCKO<sub>d50</sub> (graue Linie). Die Relaxation wurde durch eine maximale effektive Konzentration von Carbachol (30 μM) induziert. Quantitative Analyse von n = 6 Tieren pro Genotyp.
- (B) Die Relaxation wurde durch eine maximale effektive Konzentration von VIP (300 nM) induziert. Quantitative Analyse von n = 4 - 6 Tieren pro Genotyp.
- (C) Zeitverlauf der VIP-induzierten Relaxation zu bestimmten Zeitpunkten nach Tamoxifen-Injektion. Verwendet wurden n = 3 - 6 Tieren pro Genotyp und Zeitpunkt.

A



B



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

### Abb. 12: Sildenafil-induzierte Relaxation von Aortenringen

- (A) Original Spuren der Sildenafil-vermittelten Relaxation von Aortenringen aus WT und SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tieren. Aortenringe wurden mit U46619 (10 nM) kontrahiert und durch steigende Konzentrationen von Sildenafil relaxiert.
- (B) Quantitative Analyse der Inhibition von PDE5 mit Sildenafil von n = 5 Tiere pro Genotyp.

Aortenringen von WT- und SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation. Dabei zeigte sich zwischen den Kontrollen und den SM-GCKO-Tieren kein signifikanter Unterschied bei der Relaxation (Originalspur Abb. 13 A; quantitative Auswertung Abb. 13 B).

Die partikuläre Guanylyl-Cyclase A (GC-A) ist ein membranständiges Enzym, welches in glatten Muskelzellen exprimiert wird und nach Aktivierung durch ANP cGMP produziert. Durch Verwendung von ANP kann somit unabhängig von der NO-GC der cGMP-Spiegel in glatten Muskelzellen erhöht werden. Das cGMP der partikulären Guanylyl-Cyclase aktiviert ebenfalls die PKG. Auch bei der ANP-induzierten Relaxation wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Aorten gefunden (Abb. 13 C). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Signaltransduktion unterhalb der NO-GC durch die Deletion der NO-GC nicht beeinflusst wird.

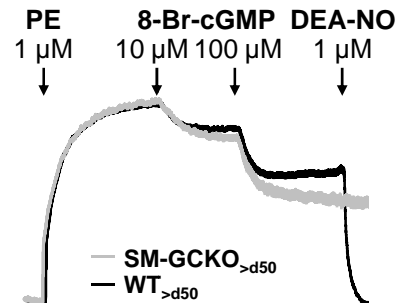
#### **4.1.8. Vergleich des zeitlichen Verlaufs von NO-GC-Expression, cGMP-Produktion und NO-induzierter Relaxation nach Tamoxifen-Injektion**

Um NO-GC-Expression, cGMP-Produktion sowie Relaxation durch exogenes und endogenes NO (DEA-NO bzw. CCh) direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Messwerte in einer Abbildung zusammengefasst. Dafür wurden die Messwerte der nicht Tamoxifen-induzierten Tiere (SM-GCKO<sub>pre</sub>) als 100% normiert und die jeweiligen Messwerte der Tamoxifen-induzierten Tiere auf diese bezogen (Abb. 14 A).

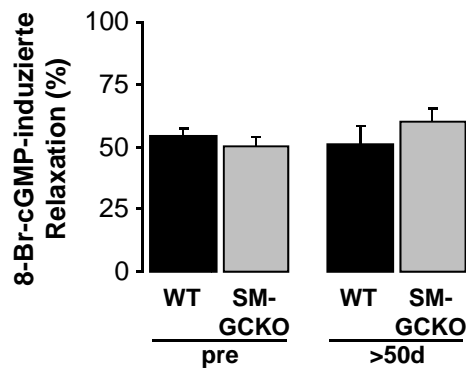
Die NO-GC-Expression nahm mit Induktion der Cre-Recombinase sehr schnell ab. Fünf Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion war die Expression der NO-GC um 80% erniedrigt. Die gleiche Kinetik der Abnahme war auch bei der NO-stimulierten cGMP-Synthese in der Aorta zu beobachten. SM-GCKO<sub>d5</sub>-Tiere produzierten bei gleicher DEA-NO-Stimulation nur noch 25% des von den SM-GCKO<sub>pre</sub>-Tieren gebildeten cGMPs. Im Gegensatz zu der NO-GC-Expression und der cGMP-Produktion war die NO-induzierte Relaxation auch nach 20 Tagen noch zu 50% vorhanden. CCh induzierte ebenfalls noch eine 50%-ige Relaxation bei SM-GCKO<sub>d15</sub>-Tieren.

Die Differenz zwischen Expression/cGMP-Produktion und Abnahme des relaxierenden Effekts durch NO ist sehr wahrscheinlich durch das 'Prinzip des überschüssigen Rezeptors' (spare receptor) zu erklären. Dabei reicht die Aktivierung eines Anteils des Enzyms aus, um einen vollständigen zellulären Effekt hervorzurufen. Es ist anzunehmen, dass die NO-GC in einem Überschuss vorhanden ist, um möglichst sensitive Antworten auf das NO-Signal zu gewährleisten. Dieses Prinzip wurde auch schon für die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -KO-Mäuse beschrieben (Mergia *et al.*, 2006).

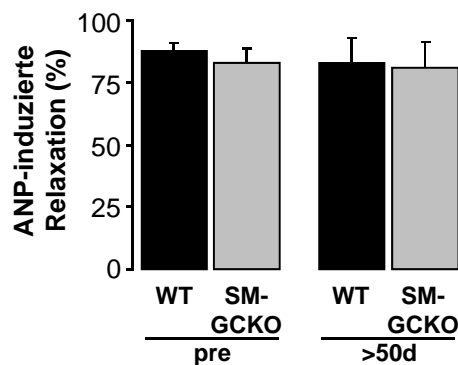
A



B



C

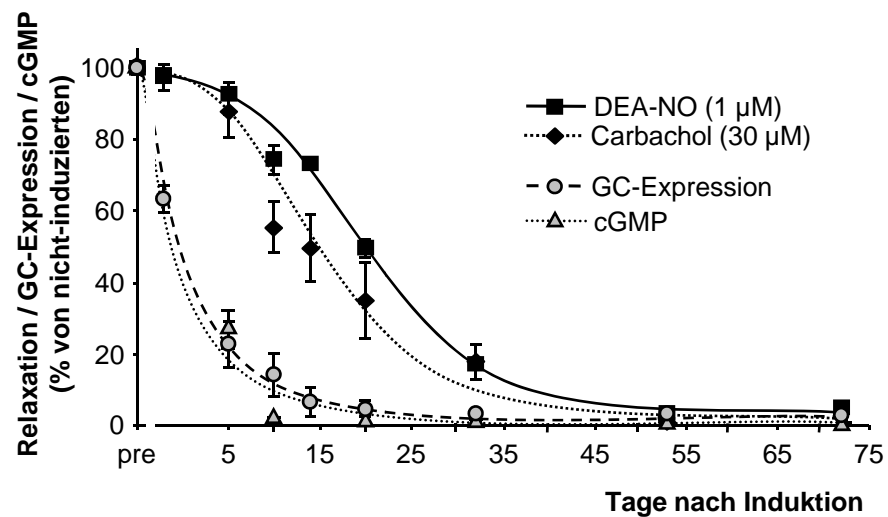


Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

**Abb. 13: Relaxation von Aorta-Ringen durch 8-Br-cGMP und ANP**

- (A) Original-Spuren für die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation der Aorta aus WT- und SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tieren.
- (B) Statistische Auswertung der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation für SM-GCKO<sub>>d50</sub>- und WT-Tieren vor und nach Tamoxifen-Injektion. Quantitative Analyse von n = 5-6 Tieren pro Genotyp.
- (C) ANP-induzierte Relaxation der Aorten von SM-GCKO<sub>>d50</sub> und Kontrollen. Quantitative Analyse von n = 5-6 Tieren pro Genotyp.





Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

**Abb. 14: Vergleich des zeitlichen Verlaufs von NO-GC-Expression, cGMP-Produktion und NO-induzierter Relaxation nach Tamoxifen-Injektion**  
NO-GC Expression (aus Abb. 4), NO-stimulierten cGMP-Produktion (aus Abb. 6), NO-induzierter Relaxation (Daten von 1 µM DEA-NO aus Abb. 10) und CCh-induzierter Relaxation sind hier zusammengefasst.

#### **4.1.9. Messung des Blutdrucks**

##### **4.1.9.1. Messung des systolischen Blutdrucks mittels Schwanz-Plethysmographie**

Als Nächstes wurde untersucht, ob der graduelle Verlust der NO-induzierten Relaxation glatter Muskulatur in SM-GCKO-Mäusen mit einer Veränderung des systolischen Blutdrucks (SBP) einhergeht. Hierzu wurde der SBP mittels Schwanz-Plethysmographie an wachen Mäusen gemessen. WT- und heterozygote Tiere zeigten keine Veränderung des SBP nach Tamoxifen-Induktion (Abb. 15 A). Die Tamoxifen-Injektion führte in SM-GCKO-Tieren zu einer Erhöhung des SBP, die nach 10 Tagen erstmals signifikant gegenüber WT-Tieren verändert war. Eine maximale Zunahme des SBP (30 mmHg) im Vergleich zu den WT-Kontrollen stellte sich nach 30 Tagen ein. Die Erhöhung des SBP gegenüber den Kontroll-Tieren war auch 150 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion noch messbar (30 mmHg; Daten nicht gezeigt). Dies zeigt deutlich, dass sich der graduelle Verlust der NO-GC, und damit die fehlende Relaxierbarkeit durch NO in der glatten Muskulatur der Aorten, in einer Erhöhung des SBP niederschlägt und selbst 150 Tage nach Tamoxifen-Injektion keine Kompensation stattfindet.

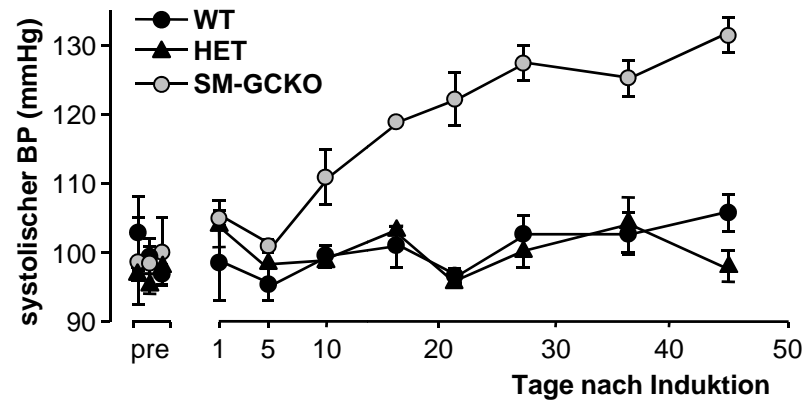
In Abb. 15 B sind die CCh-induzierbare Relaxation und der Anstieg des systolischen Blutdrucks in einer Abbildung dargestellt. Dabei ist erkennbar, dass die Abnahme der CCh-induzierten Relaxation und die Steigerung des SBP einen inversen Zeitverlauf zeigten. Etwa 30 Tage nach Tamoxifen-Injektion waren beide Effekte voll ausgeprägt. Es ist anzunehmen, dass die Blutdruck-Zunahme direkt auf der abnehmenden Relaxationfähigkeit der glatten Muskulatur basiert.

##### **4.1.9.2. Blockade der NO-Synthase mittels L-NAME**

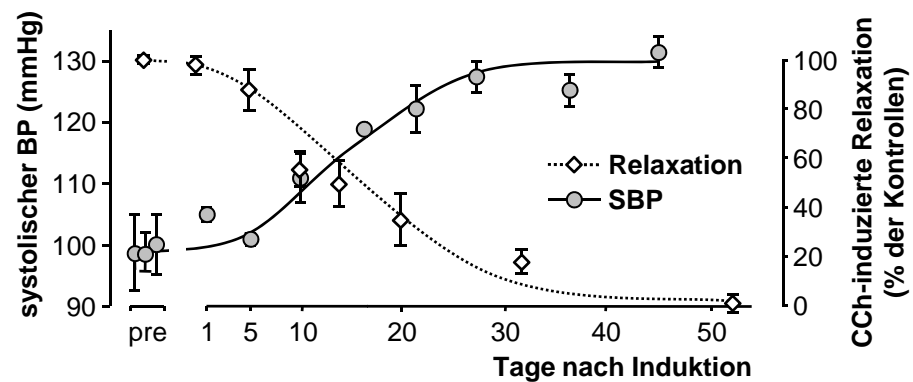
Die endotheliale NOS produziert NO, welches in die glatten Muskelzellen gelangt und die NO-GC stimuliert. Diese Stimulation führt zur Produktion von cGMP und damit zu einer Relaxation. Durch Blockade der NOS mittels L-NAME sollte die eNOS-vermittelte Relaxation unterbunden werden und dadurch eine Erhöhung des Blutdrucks zur Folge haben. Die Inhibierung der NOS kann in vivo durch Verabreichung von L-NAME (50 mg/ml) im Trinkwasser erreicht werden (Abb. 16 A).

Die WT-Kontrollen zeigten eine Zunahme des SBP von 20 mmHg nach einem Tag L-NAME-Behandlung. Dieser Blutdruckanstieg blieb bei weiterer Gabe von L-NAME erhalten (bis 5 Tage). Im Gegensatz dazu zeigten die SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere keine Veränderung des ohnehin durch die Deletion der NO-GC erhöhten Blutdruckes. Dieses Ergebnis zeigt zwei Dinge: Zum einen führt endogen gebildetes NO aus dem Endothel nur in Anwesenheit der NO-GC in der glatten Muskulatur zu einer Senkung des

A



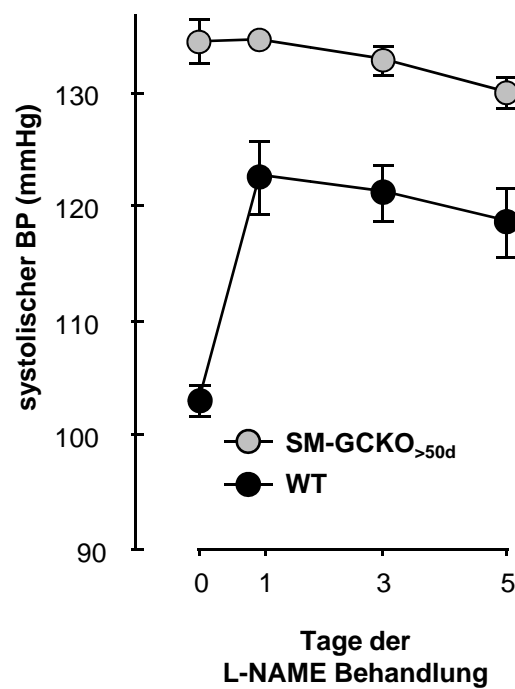
B



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

### Abb. 15: Entstehung der Hypertonie in SM-GCKO-Mäusen

- (A) Der SBP von wachen WT-, HET- und SM-GCKO-Mäusen wurde mittels Schwanz-Plethysmographie über einen Zeitraum von 50 Tagen gemessen. Vor der Tamoxifen-Injektion wurden drei Kontrollmessungen durchgeführt (pre). SM-GCKO-Mäuse zeigten erstmals nach 10 Tagen eine gegenüber den Kontroll-Tieren (WT, HET) signifikante Erhöhung des Blutdruckes. Daten von  $n = 2 - 6$  Mäusen pro Zeitpunkt und Genotyp.
- (B) Inverser Zusammenhang zwischen Anstieg des SBP und CCh-induzierter Aortenrelaxation in SM-GCKO-Tieren. Als Kontrollen wurden Tiere ohne Tamoxifen-Injektion (pre) genommen.



Reprinted from: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409. Copyright (2011), with permission from Wolters Kluwer Health.

**Abb. 16: L-NAME-induzierte Hemmung der NOS in vivo**

WT<sub>>d50</sub>- und SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Mäusen wurde L-NAME (50 mg/ml im Trinkwasser) verabreicht. SBP wurde an wachen Mäusen mittels Schwanz-Plethysmographie vor und nach L-NAME-Verabreichung gemessen (1, 3 und 5 Tage). Die WT-Mäuse zeigten sofort eine deutliche Zunahme des Blutdrucks. SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Mäuse hingegen zeigten keine Änderung des SBP durch Gabe von L-NAME. Daten von n = 6 Mäusen pro Genotyp.

Blutdrucks. Zum anderen verursacht die Inhibition der NOS durch L-NAME in den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren keine weitere Veränderung des Blutdrucks. Dieser Befund zeigt, dass endogenes NO den Blutdruck nur in Anwesenheit der NO-GC in der glatten Muskulatur beeinflusst.

Insgesamt lässt sich Zusammenfassen, dass NO-GC der einzige Rezeptor für die NO-vermittelte Relaxation ist und die Deletion der NO-GC ausschließlich in der glatten Muskulatur ausreicht, eine Hypertonie hervorzurufen.

## **4.2. Die Funktion der NO-GC der glatten Muskulatur im gastrointestinalen System**

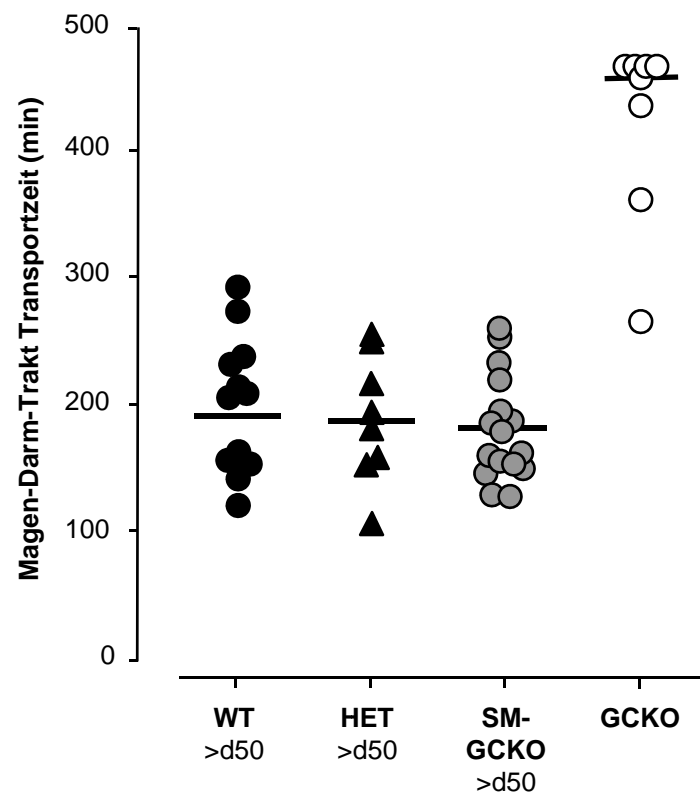
Mäuse, bei denen die NO-GC ubiquitär deletiert wurde, zeigten neben dem schon zuvor erwähnten erhöhten Blutdruck eine Störung der Magen-Darmfunktion. Diese äußerte sich in einer verlangsamten GI-Motilität und hatte eine erhöhte Sterblichkeit zur Folge.

Überraschenderweise zeigten die SM-GCKO-Tiere im Gegensatz zu den GCKO-Tieren keine erhöhte Sterblichkeit nach Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen. Da das verfrühte Sterben der GCKO-Tiere vermutlich eine Folge der verlangsamten GI-Motilität war, kam die Frage auf, ob die GI-Motilität der SM-GCKO-Tiere durch die Deletion ebenfalls beeinflusst wird.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Magen-Darm-Transportzeit der Nahrung der SM-GCKO- mit der von GCKO-Tieren verglichen. Daran anschließend wurden Organbad-Experimente für die GCKO-Tiere durchgeführt, und die Daten mit denen von SM-GCKO-Tieren verglichen.

### **4.2.1. Messung der Transportzeit der Nahrung durch den GIT**

Um die physiologische Konsequenz der NO-GC-Deletion in den glatten Muskelzellen für die gastrointestinale Motilität der Tiere zu untersuchen, wurde die Magen-Darm-Trakt-Transportzeit der Mäuse gemessen. Dabei wurde ein roter Farbstoff (Carmin) peroral in den Magen injiziert und die Zeit bis zur Ausscheidung des ersten gefärbten Kotes gemessen. Die Tiere hatten sowohl vor dem Versuch als auch im Versuchsverlauf freien Zugang zu Futter und Wasser. Die vollständigen NO-GC-Knockouts (GCKO-Tiere) zeigten eine stark verlängerte Transportzeit (50% >480 min, Friebe *et al.*, 2007). SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere zeigten eine unveränderte Transportzeit der Nahrung im Vergleich zu WT- und heterozygoten Kontrolltieren (182 min, 192 min und 186 min für WT-, HET- und SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere, Abb. 17 A). Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, da man eigentlich in Analogie zur veränderten Relaxation vaskulärer



Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrgic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011  
doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038.  
Copyright (2011), with permission from Elsevier.

### Abb. 17: Messung der Transportzeit durch den GIT

Um die Transportzeit der Nahrung zu messen, wurde den Mäusen (WT<sub>d50</sub>, SM-GCKO<sub>d50</sub>, Het-GCKO<sub>d50</sub>, GCKO) Carmin peroral in den Magen gespritzt. Die Zeit bis zum Austreten des ersten rot gefärbten Kotes wurde gemessen. Die GCKO-Mäuse zeigten eine stark verlängerte Transportzeit während die Transportzeit der HET- und SM-GCKO-Tiere gegenüber den WT-Kontrollen unverändert blieb. Daten von n = 8 - 16 Mäusen pro Genotyp.

glatter Muskelzellen (Anstieg des SBP) eine Funktionseinschränkung der gastrointestinalen Muskulatur, also einen Anstieg der Transportzeit, erwarten würde.

Um diese Diskrepanz näher zu untersuchen, wurde die glatte Muskulatur des GIT der GCKO- und der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere mittels Organbad-Versuchen miteinander verglichen.

#### **4.2.2. Messung der Relaxation verschiedener Darmabschnitte von GCKO-Tieren im Organbad**

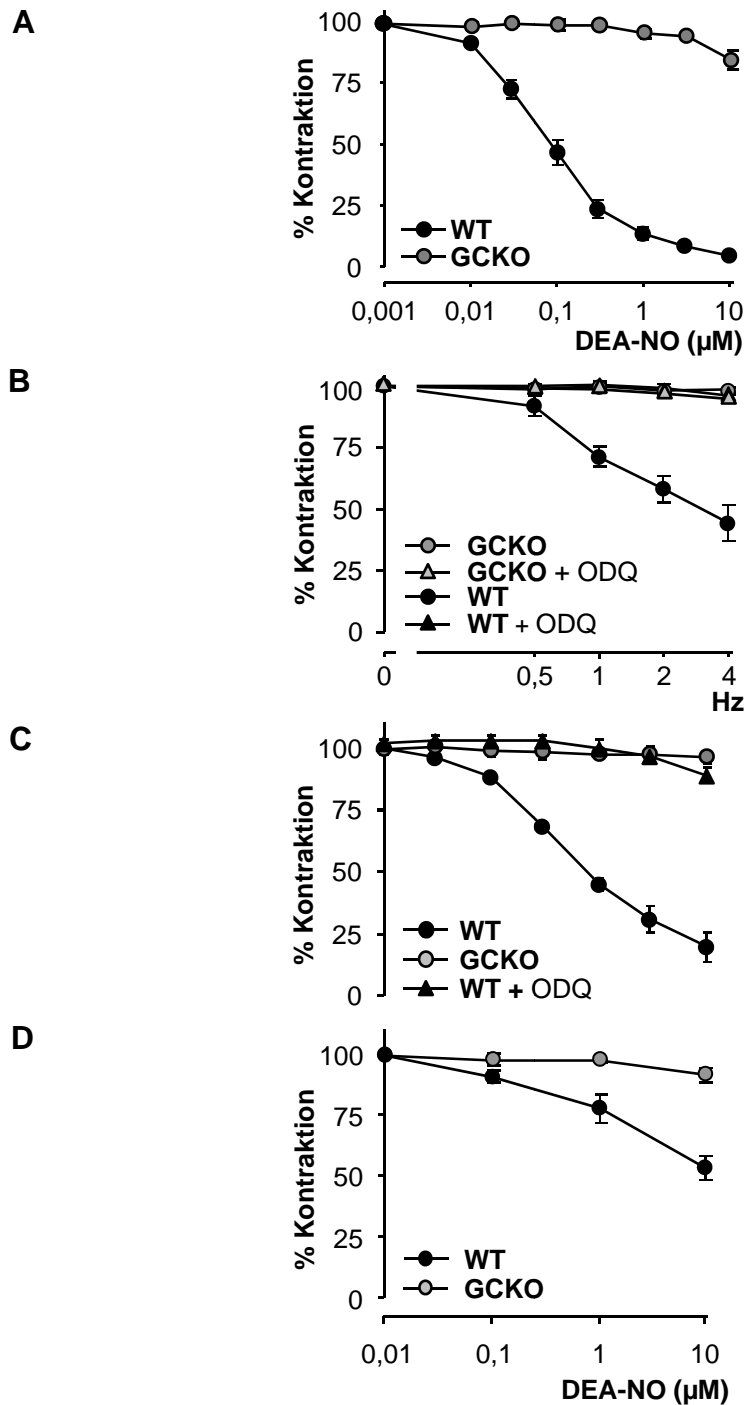
Um die Relaxationsfähigkeit der glatten Muskulatur des GIT vergleichen zu können, wurden verschiedene Darmabschnitte der Tiere (Fundus, LES, Duodenum) in das Organbad eingespannt und nach Kontraktion mit CCh durch Zugabe des NO-Donators DEA-NO relaxiert.

##### **4.2.2.1. NO-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen von GCKO-Tieren**

Die Zugabe des NO-Donors DEA-NO ergab eine konzentrationsabhängige, vollständige Relaxation der WT-Fundus-Streifen. Im Gegensatz dazu zeigten die GCKO-Fundus-Streifen keine NO-induzierte Relaxation bis 10  $\mu$ M DEA-NO (Abb. 18 A).

Um die Wirkung endogen produzierten NOs zu untersuchen, wurden die Streifen durch Anlegen eines elektrischen Feldes (EF) stimuliert. Bei der EF-Stimulation kommt es zu einer unspezifischen Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter wie z.B. Acetylcholin oder Noradrenalin, aber auch zur gleichzeitigen Freisetzung relaxierender Faktoren wie NO oder VIP. Unter Verwendung von Atropin und Guanethidin (nicht-adrenerge nicht-cholinerge Bedingungen) kann die nitrege Relaxation untersucht werden. Dabei kann man die NO-vermittelte gut von der ATP- und VIP-vermittelten Relaxation unterscheiden, da sie in zwei zeitlich versetzten Phasen und bei verschiedenen Feldstärken auftritt. Bei Stimulationen bis 4 Hz wird hauptsächlich NO ausgeschüttet. Ab 8 Hz kommt zu der schnellen NO-Phase eine zweite langsamere Relaxationsphase, die durch ATP und VIP vermittelt wird.

WT-Fundus-Streifen zeigten eine EFS-induzierte Relaxation, die in ihrer Ausprägung von der Stärke des elektrischen Feldes abhängig war. Die Hemmung dieser Relaxation durch ODQ zeigte, dass sie durch endogenes NO vermittelt wurde. Die GCKO-Fundus-Streifen wiesen keine EFS-induzierte, nitrege vermittelte Relaxation auf (Abb. 18 B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die glatte Muskulatur des Fundus der GCKO-Tiere weder durch exogenes noch durch endogenes NO relaxiert werden kann.



Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitroergic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011 doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038. Copyright (2011), with permission from Elsevier.

**Abb. 18: NO-induzierte Relaxation von Fundus- und LES-Glattmuskel-Gewebe der GCKO-Tiere**

- (A) Relaxation von Fundus-Streifen mit DEA-NO von WT- und GCKO-Mäusen (n = 6 pro Genotyp).
- (B) Elektrische Feldstimulation des Fundus unter NANC-Bedingungen (Atropin, Guanethidin; jeweils 1  $\mu\text{M}$ ) von GCKO- und WT-Tieren in An/Abwesenheit des NO-GC-Hemmstoffs ODQ 10  $\mu\text{M}$  (n = 6 pro Genotyp).
- (C) NO-vermittelte Relaxation des LES von WT-Tieren in An/Abwesenheit des NO-GC-Hemmstoffs ODQ und GCKO-Tieren (n = 6 pro Genotyp).
- (D) NO-vermittelte Relaxation des Duodenums mit DEA-NO von WT- und GCKO-Tieren in Anwesenheit des L-Typ-Calciumkanalblockers Nifedipin (n = 6 pro Genotyp).



#### 4.2.2.2. NO-induzierte Relaxation der LES von GCKO-Tieren

Um zu überprüfen, ob die Deletion der NO-GC auch in anderen Glattmuskel-Geweben des GITs zu einer Unterbrechung der NO/cGMP-Kaskade führte, wurde zunächst der untere ösophageale Sphinkter (LES) der GCKO-Tiere verwendet. Die NO-vermittelte Relaxation der Ringmuskulatur des LES kann ebenfalls im Organbad nach Kontraktion durch CCh gemessen werden. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus wurde mit steigenden Konzentrationen von DEA-NO relaxiert. Dabei zeigte der LES aus WT-Mäusen, wie der Fundus zuvor, eine NO-induzierte Relaxation, die durch ODQ inhibiert werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte der LES der GCKO-Tiere bis 10  $\mu\text{M}$  DEA-NO keine Relaxation (Abb. 18 C). Somit decken sich die zuvor erhaltenen Ergebnisse des Fundus mit denen des LES.

#### 4.2.2.3. NO-induzierte Relaxation der Duodenum-Ringe von GCKO-Tieren

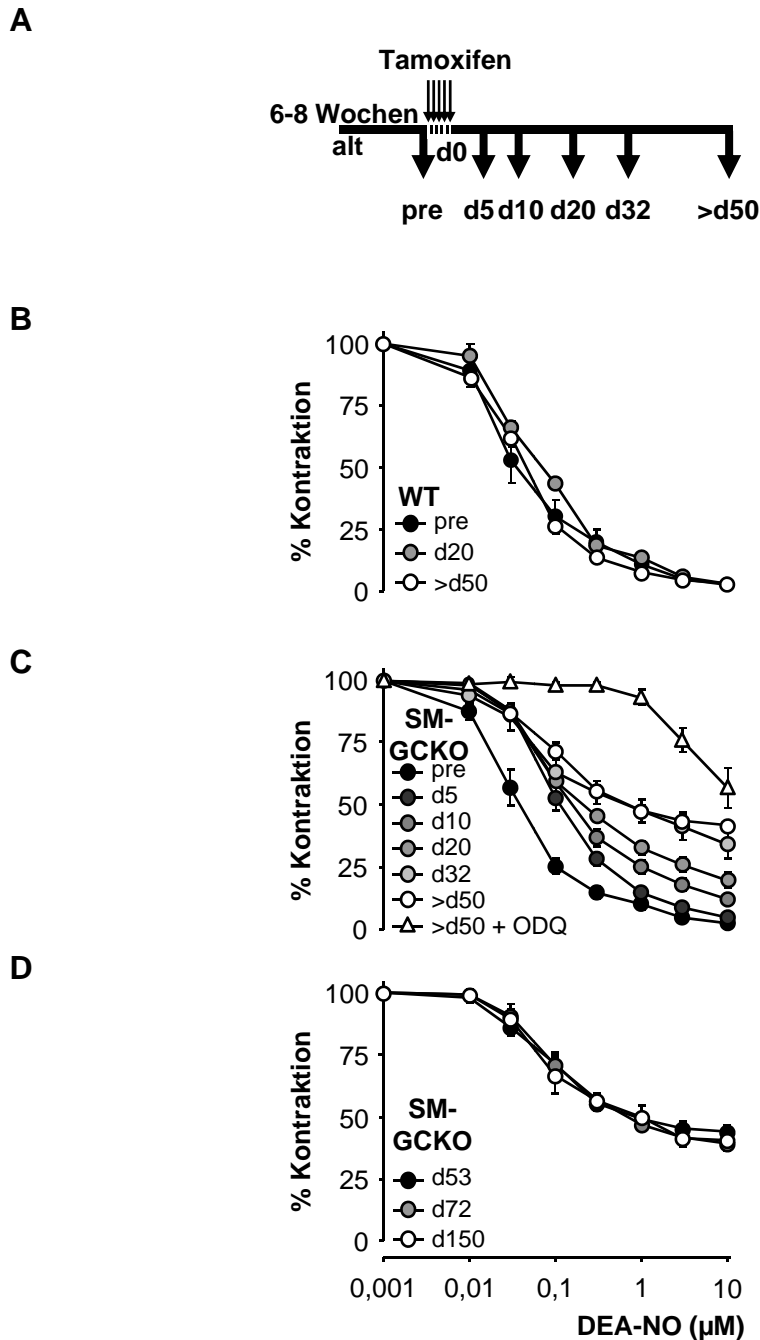
Im Weiteren wurde ein Abschnitt des Dünndarms, das Duodenum, ebenfalls hinsichtlich der NO-induzierten Relaxation untersucht. Um Konzentrations-Wirkungskurven am Duodenum messen zu können, musste die endogene cyclische Kontraktion des Gewebes unterbunden werden. Dies wurde mit Nifedipin, einem Hemmstoff von Calciumkanälen erreicht. CCh induziert sowohl eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige als auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion in der glatten Muskulatur. Durch Verwendung des Calciumkanalblockers Nifedipin kann somit eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion in der glatten Muskulatur hervorgerufen werden.

Nach Erreichen eines Kontraktionsplateaus wurde durch DEA-NO eine Relaxation ausgelöst. Das WT-Duodenum zeigte eine konzentrationsabhängige Relaxation durch NO, während das GCKO-Duodenum keine Relaxation bis 10  $\mu\text{M}$  DEA-NO zeigte (Abb. 18 D). Somit war neben Fundus und LES auch im Dünndarm die NO-vermittelte Relaxation nach Deletion der NO-GC unterbunden.

#### 4.2.3. Relaxation gastrointestinaler Gewebe von SM-GCKO-Tieren

Um zu überprüfen, ob die Diskrepanz in der Transportzeit der Nahrung zwischen den GCKO- und SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren (siehe Abschnitt 4.2.1.) durch die Relaxationsfähigkeit des Gewebes beeinflusst wurde, wurden die zuvor für die GCKO-Tiere durchgeführten Organbad-Messungen an den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren wiederholt.

Bei den Messungen der NO-induzierten Relaxation des Fundus der SM-GCKO-Tiere wurden verschiedene Zeitpunkte nach letzter Tamoxifen-Injektion miteinander verglichen (Abb. 19). Bei den folgenden Versuchen (EFS, 8-Br-cGMP etc.) wurden nur Tiere 50 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion verwendet (SM-GCKO<sub>>50d</sub>), da bei



Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrergic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011  
doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038.  
Copyright (2011), with permission from Elsevier.

**Abb. 19: NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen der SM-GCKO- und WT-Tiere**

- (A) Männlichen Mäusen (6-8 Wochen alt) wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen injiziert (1 mg, i.p.). Der letzte Tag der Injektion wurde als Tag 0 definiert. An den angegebenen Tagen wurde der Fundus präpariert und im Organbad untersucht.
- (B) Relaxation der Fundus-Streifen von WT-Kontrollen vor (pre) und nach Tamoxifen-Injektion (d20, >d50).
- (C) Relaxation der Fundus-Streifen von SM-GCKO-Tieren vor (pre) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifen-Injektion (n = 5 - 10 pro Zeitpunkt und Genotyp).
- (D) Relaxation der Fundus-Streifen von SM-GCKO-Tieren zu den Zeitpunkten: d53, d72, d150 (n = 4 - 7 pro Zeitpunkt und Genotyp).

diesen von einem vollständigen Ausschnitt der NO-GC in den glatten Muskelzellen ausgegangen wurde.

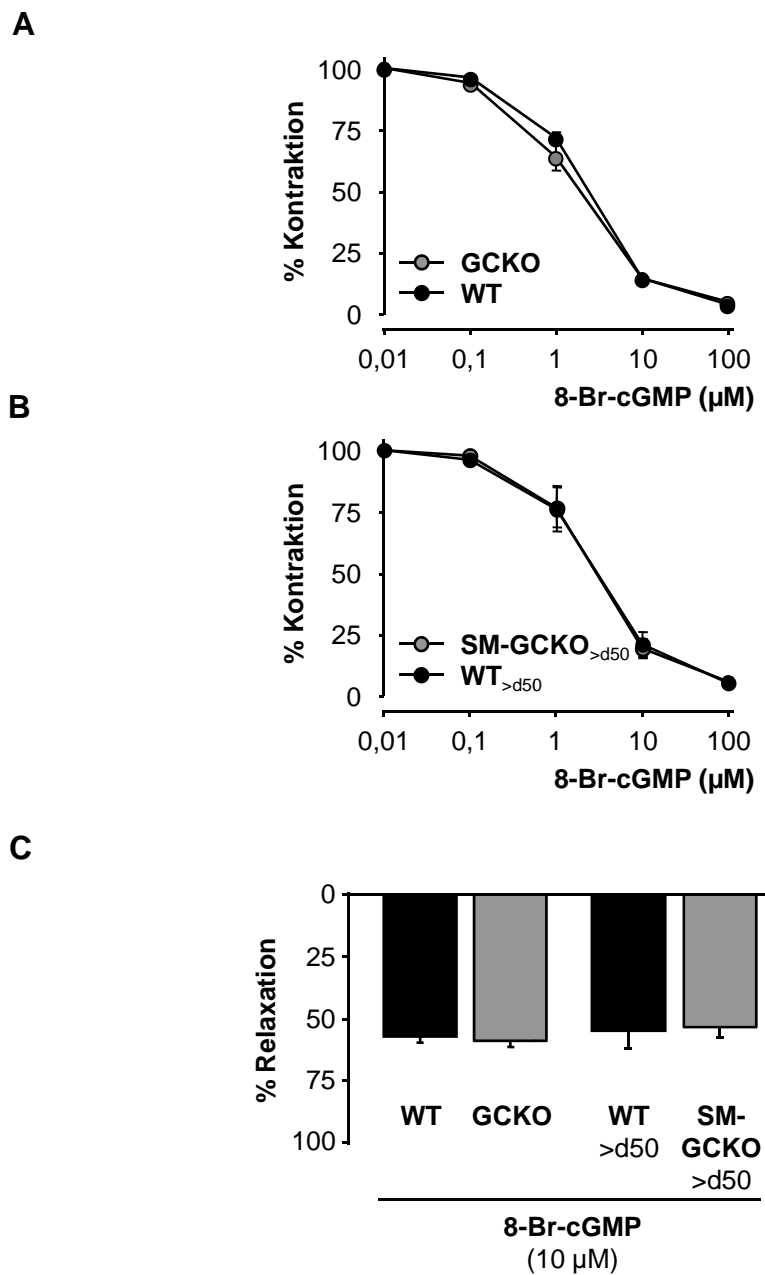
#### **4.2.3.1. NO-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen von SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren**

Zunächst wurden die Fundus-Streifen im Organbad mit CCh (0,1  $\mu$ M) kontrahiert und dann durch steigende Konzentrationen von DEA-NO relaxiert. Dabei zeigten die WT-Kontrollen vor ( $WT_{pre}$ ) und nach der Injektion mit Tamoxifen ( $WT_{d20}$  und  $WT_{>d50}$ ) eine identische NO-induzierte Relaxation ( $EC_{50}$ -Werte für DEA-NO: 0,05  $\mu$ M, Abb. 19 B). Dies zeigt, dass Tamoxifen nicht zu einer unspezifischen Veränderung des NO/cGMP-Signalweges führt.

Die NO-induzierte Relaxation der SM-GCKO<sub>pre</sub>-Tiere entsprach den WT-Kontrollen ( $EC_{50}$ -Wert für DEA-NO: 0,04  $\mu$ M; Abb. 19 C). Tamoxifen-Injektion führte zu einer zeitabhängigen Abnahme der NO-vermittelten Relaxation. Erst nach 50 Tagen war keine weitere Abnahme der NO-vermittelten Relaxation zu beobachten. Erstaunlicherweise wurde die NO-induzierte Relaxation nicht wie in der Aorta vollständig unterbunden, sondern es blieb eine 50%ige Relaxation erhalten (Abb. 19 C, weiße Kreise). Fundus-Streifen von Tieren 70 bzw. 150 Tage nach letzter Tamoxifen-Injektion (Abb. 19 D) zeigten eine Konzentrations-Wirkung-Kurve, die denen der SM-GCKO<sub>50d</sub>-Tiere entsprach. Die noch vorhandene Relaxation der Fundus-Streifen von SM-GCKO<sub>50d</sub>-Tieren konnte mit ODQ geblockt werden (Abb. 19 C, weiße Dreiecke). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese noch vorhandene NO-vermittelte Relaxation NO-GC vermittelt ist. Diese Restrelaxation ist nur durch einen unvollständigen KO oder durch GC-Expression in nicht-glattmukulären Zellen zu erklären.

#### **4.2.3.2. 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen und LES**

Um zu überprüfen, ob die Kaskade unterhalb der NO-GC nach der Deletion unverändert vorliegt, wurde die PKG mit 8-Br-cGMP, einem membrangängigen PKG-Aktivator, direkt stimuliert. An den Fundus-Streifen wurde nach Kontraktion mit CCh (0,1  $\mu$ M) eine Konzentrations-Wirkungskurve mit 8-Br-cGMP durchgeführt. Weder die GCKO- noch die SM-GCKO-Tiere zeigten dabei einen Unterschied gegenüber den WT-Kontrollen (Abb. 20 A, B). Aus diesen Daten folgt, dass die Deletion der NO-GC in den beiden KO-Linien nicht zu einer veränderten Signalweiterleitung unterhalb des Enzyms führt. Messungen an LES bestätigten dieses Ergebnis (Abb. 20 C). Eine Kompensation der Kaskade unterhalb der NO-GC als Erklärung für die noch erhaltene NO-vermittelte Relaxation der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren kann somit ausgeschlossen werden. Insgesamt decken sich diese Daten mit denen aus Aortenringen der



Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrgic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011 doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038. Copyright (2011), with permission from Elsevier.

**Abb. 20: 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation von LES und Funden aus GCKO- und SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tieren**

- (A) Statistische Auswertung der 8-Br-cGMP-vermittelten Relaxation des Fundus aus WT- und GCKO-Tieren.
- (B) Statistische Auswertung der 8-Br-cGMP-vermittelten Relaxation des Fundus aus SM-GCKO<sub>>d50</sub>- und WT<sub>>d50</sub>-Tieren.
- (C) 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des LES von GCKO-, SM-GCKO<sub>>d50</sub>- und WT-Tieren.

SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere (Abb. 13), in denen die Signalkaskade unterhalb der NO-GC ebenfalls unverändert war.

#### **4.2.3.3. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen von SM-GCKO-Tieren unter NANC-Bedingungen**

Um die Wirkung endogen produzierten NOs zu untersuchen, wurden die Streifen durch Anlegen eines elektrischen Feldes (EF) stimuliert. Fundus-Streifen von SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren zeigten eine EFS-vermittelte Relaxation, die denen der Fundus-Streifen der WT-Tiere entsprach (Original-Spur Abb. 21 A, quantitative Auswertung Abb. 21 B). Diese Relaxation der Fundus-Streifen beider Genotypen konnte durch Zugabe von ODQ unterbunden werden, was auf eine NO-Freisetzung und Beteiligung der NO-GC hinweist.

Insgesamt lässt sich Schlussfolgern, dass Fundus-Streifen von SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren im Gegensatz zu denen aus GCKO-Tieren (siehe Abs. 4.2.2.1.) sowohl durch endogenes als auch exogenes NO relaxiert werden können. Dies deutet auf eine Beteiligung der NO-GC in nicht-glattmuskulären Zellen bei der Relaxation hin.

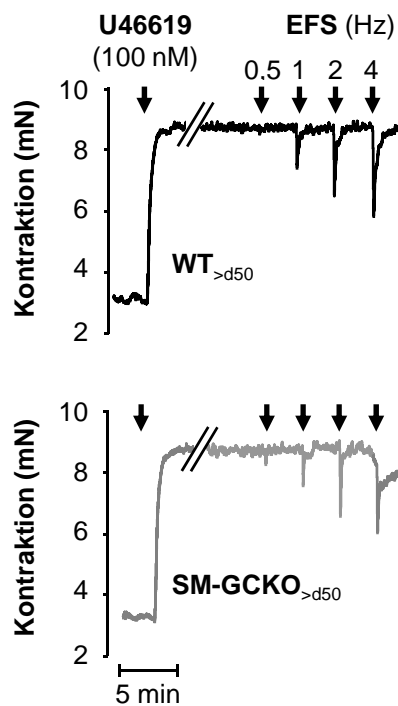
#### **4.2.3.4. DEA-NO-induzierte Relaxation des LES**

Um diese überraschenden Ergebnisse des Fundus auch in einem anderen GI-Gewebe zu überprüfen, wurde die DEA-NO-induzierte Relaxation am LES wiederholt. Sphinkteren aus ungespritzten und Tamoxifen-behandelten WT-Tieren (WT<sub>pre</sub>, WT<sub>>50d</sub>) zeigten keinen signifikanten Unterschied in der NO-induzierten Relaxation (Abb. 22 A). Damit führt Tamoxifen auch in diesem Gewebe nicht zu einer Veränderung der NO-induzierten Relaxation. Auch der LES aus unbehandelten SM-GCKO<sub>pre</sub>-Tieren ließ sich mit DEA-NO relaxieren und wies einen mit dem der WT-Kontrollen vergleichbaren EC<sub>50</sub>-Wert auf. Der LES von SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren zeigte hingegen eine verminderte, aber dennoch vorhandene NO-vermittelte Relaxation (Abb. 22 B). Wie beim Fundus konnte diese Restrelaxation mit ODQ unterbunden werden. Somit decken sich die zuvor erhaltenen Daten des Fundus mit denen des LES der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere.

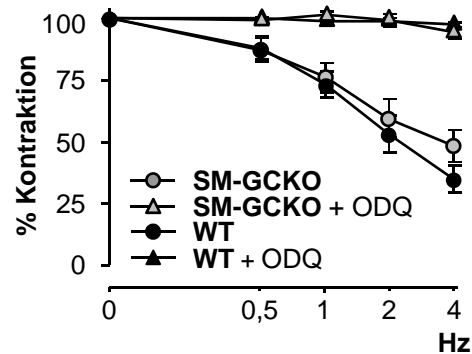
#### **4.2.3.5. Cyclische Kontraktion des Dünndarms**

Für den geregelten Transport des Chymus ist eine cyclische Kontraktion des Dünndarms notwendig. Um zu überprüfen, ob die cyclische Kontraktion durch die Deletion verändert wird und damit für die unterschiedliche Transportzeit in den GCKO und den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren verantwortlich ist, wurde duodenales Gewebe im Organbad untersucht. Hierzu wurden die Duodenum-Ringe mit einer Vorkontraktion von 3 mN für einige Minuten äquilibriert (Original-Spur Abb. 23 A). Die cyclische

A



B



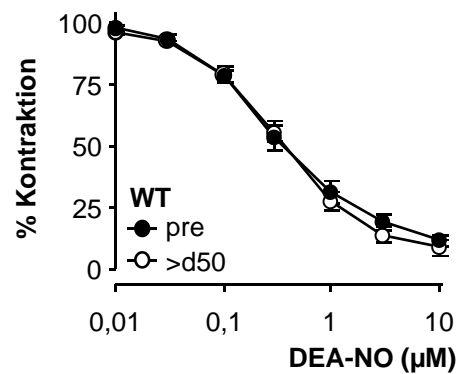
Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrergic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011 doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038. Copyright (2011), with permission from Elsevier.

### Abb. 21: Relaxation der Fundus-Streifen mittels EFS

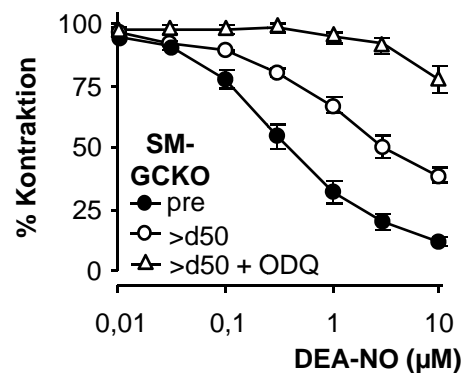
Fundus-Streifen von Tamoxifen-injizierten WT- und SM-GCKO-Tieren wurde unter NANC-Bedingungen mit U46119 (100 nM) kontrahiert und dann mit verschiedenen Feldstärken stimuliert.

- (A) Original-Spuren von Fundus-Streifen von WT- und SM-GCKO-Tieren.  
 (B) Quantitative Auswertung der Relaxation der Fundus-Streifen durch EFS (WT<sub>>d50</sub>- und SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tiere) in An/Abwesenheit von ODQ (10 μM); je Genotyp n = 6.

A



B

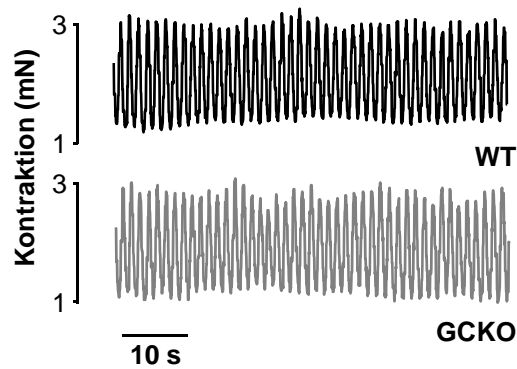


Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrgic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011  
doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038.  
Copyright (2011), with permission from Elsevier.

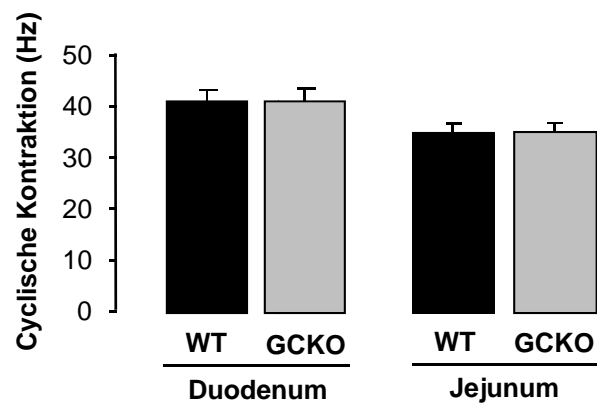
### Abb. 22: NO-induzierte Relaxation des LES

- (A) Der LES von WT-Tieren ohne bzw. 50 Tage nach Tamoxifen-Injektion wurde im Organbad mit CCh vorkontrahiert und dann mit steigenden Konzentrationen des NO-Donors DEA-NO relaxiert. Gezeigt sind die Daten von je n = 6 Tieren.
- (B) Der LES von SM-GCKO-Tieren ohne bzw. 50 Tage nach Tamoxifen-Injektion und in Anwesenheit von ODQ (10 µM) wurde im Organbad mit CCh vorkontrahiert und dann mit steigenden Konzentrationen des NO-Donors DEA-NO relaxiert. Gezeigt sind die Daten von je n = 6 Tieren.

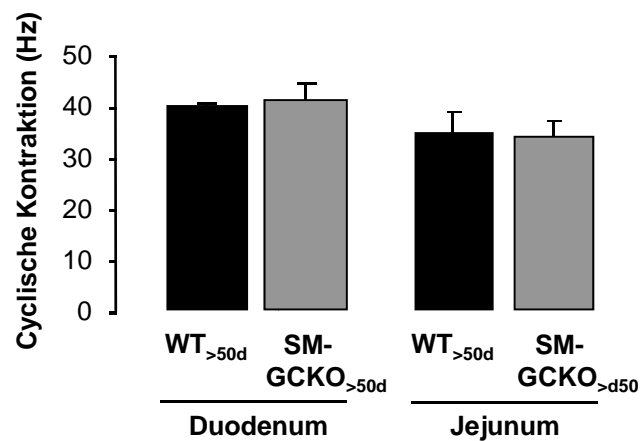
A



B



C



Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrergic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011 doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038. Copyright (2011), with permission from Elsevier.

### Abb. 23: Cyclische Kontraktion des Dünndarms

- (A) Duodenum-Ringe wurden ohne Vorkontraktion im Organbad eingespannt und dann die spontan einsetzende cyclische Kontraktion gemessen.
- (B) Quantitative Auswertung der cyclischen Kontraktion in Duodenum und Jejunum von WT- und GCKO-Tieren. Quantitative Analyse von n = 3 - 6 Tieren pro Genotyp.
- (C) Quantitative Auswertung der cyclischen Kontraktion in Duodenum und Jejunum von WT<sub>>50d</sub>- und SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren. Quantitative Analyse von n = 3 - 6 Tieren pro Genotyp.



Kontraktion trat sowohl im WT als auch in den beiden KO-Linien ohne Agonisten-Zugabe ein und war durch die Deletion der NO-GC unverändert. Die statistische Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren sowohl für Duodenum (WT:  $41,2 \pm 2,3 \text{ min}^{-1}$ ; GCKO:  $41,3 \pm 2,4 \text{ min}^{-1}$ ; WT<sub>>50d</sub>:  $39,6 \pm 0,7 \text{ min}^{-1}$ ; SM-GCKO  $40,8 \pm 3,3 \text{ min}^{-1}$ ) als auch für Jejunum (WT:  $35,2 \pm 1,6 \text{ min}^{-1}$ ; GCKO:  $35,3 \pm 1,7 \text{ min}^{-1}$ ; WT<sub>>50d</sub>:  $34,8 \pm 4,0 \text{ min}^{-1}$ ; SM-GCKO  $34,0 \pm 3,1 \text{ min}^{-1}$ ; Abb. 23 B, C).

#### **4.2.3.6. NO-induzierte Relaxation der Duodenum-Ringe von SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren**

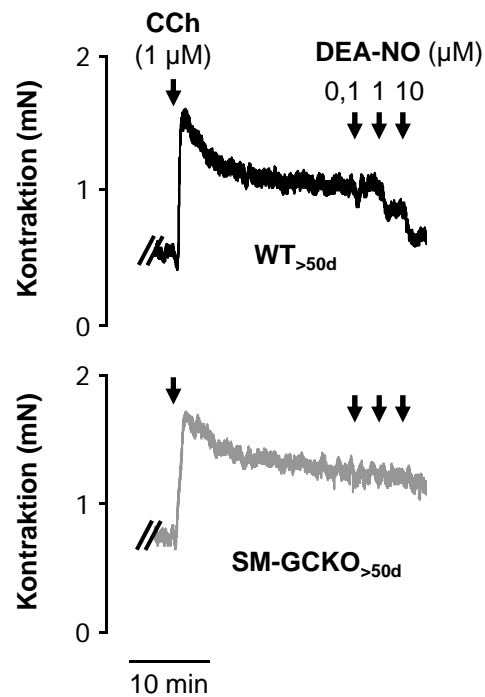
Wie in 4.2.2.3. beschrieben wurde zur Messung der DEA-NO-Konzentrations-Wirkungskurve Nifedipin zu den Duodenum-Ringen gegeben, um die Ausbildung der in Abb. 23 A gezeigten cyclischen Kontraktionen zu verhindern. Die WT-Tiere zeigten nach Kontraktion mit CCh eine konzentrationsabhängige Relaxation durch DEA-NO. Überraschenderweise zeigten Duodenum-Ringe aus SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren keine Relaxation bis  $10 \mu\text{M}$  DEA-NO (Abb. 24 B). Dieses Ergebnis steht im starken Kontrast zu der noch erhaltenen NO-vermittelten Relaxation von Fundus und LES aus diesen KO-Tieren (Abb. 19 C und Abb. 22 B). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche NO-Relaxation der beiden SM-GCKO-Gewebe könnte in der Anwesenheit des Calciumkanalblockers liegen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die zuvor aufgenommenen NO-Dosis-Wirkungskurven für Fundus in Anwesenheit von Nifedipin wiederholt.

#### **4.2.3.7. NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen in der Anwesenheit von Nifedipin**

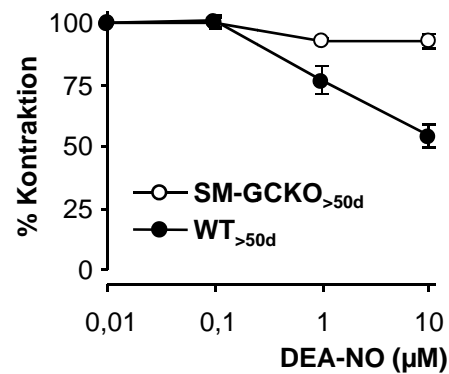
Zunächst wurden die Fundus-Streifen im Organbad mit CCh ( $0,1 \mu\text{M}$ ) kontrahiert und anschließend mit Nifedipin inkubiert. Die Zugabe von Nifedipin führte zu einer Relaxation, die aber nicht vollständig war. Ausgehend von dieser restlichen Kontraktion, die in der statistischen Auswertung als 100%ige Kontraktion normiert wurde, wurde mit DEA-NO relaxiert. Die NO-induzierte Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Anwesenheit von Nifedipin war zwischen ungespritzten und Tamoxifen-behandelten Tieren unverändert (Abb. 25 A). Der Fundus der SM-GCKO<sub>pre</sub>-Tiere zeigte ebenfalls keinen Unterschied zu den WT-Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu war die Relaxation des Fundus aus SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren bis  $10 \mu\text{M}$  DEA-NO vollständig unterbunden (Abb. 25 B). Damit bleibt bei Blockade der Calciumkanäle die zuvor verbleibende NO-vermittelte Relaxation vollständig aus (siehe Abb. 19 C).

Das Ausbleiben der NO-induzierten Relaxation in Anwesenheit von Nifedipin kann sehr wahrscheinlich folgendermaßen erklärt werden: CCh induziert die Kontraktion der

A



B

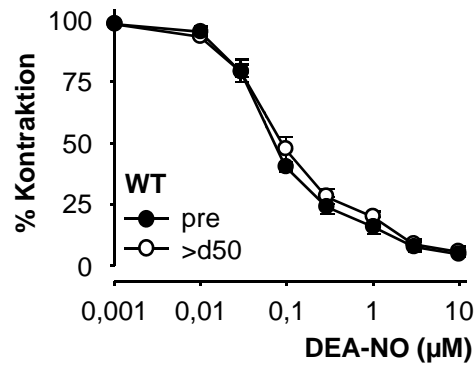


Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrgenic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011 doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038. Copyright (2011), with permission from Elsevier.

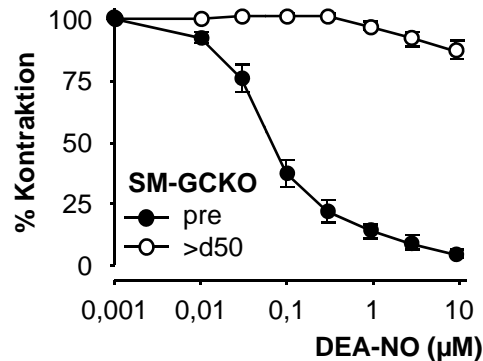
**Abb. 24: NO-induzierte Relaxation des Duodenum der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere**

- (A) Original-Spuren des mit CCh (1 μM) vorkontrahierten Duodenum. Um die cyclische Kontraktion zu unterbinden wurde der L-Type-Calciumkanalblocker Nifedipin in die K-H-Lösung zugegeben und nach Erreichen eines konstanten Plateaus wurde durch DEA-NO relaxiert.
- (B) Quantitative Auswertung von SM-GCKO<sub>>50d</sub>- und WT-Tieren (jeweils n = 5 Tiere).

A



B



**Abb. 25: NO-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen in Anwesenheit von Nifedipin**

Fundus-Streifen wurden mit CCh (0,1 µM) kontrahiert und dann in Anwesenheit von Nifedipin mit steigenden Konzentrationen des NO-Donors DEA-NO relaxiert.

- (A) Relaxation der Fundus-Streifen mittels DEA-NO vor Tamoxifen-Injektion und 50 Tage nach letzter Tamoxifen-Injektion jeweils in Anwesenheit von Nifedipin (1 µM) (je n = 6).
- (B) Relaxation der Fundus-Streifen von SM-GCKO<sub>pre</sub>- und SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren in Anwesenheit von Nifedipin (1 µM) (je n = 6).

glatten Muskelzellen über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Weg (siehe Abb. 2). Durch die Blockade der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kontraktion verbleibt lediglich die durch CCh hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion, die über ein  $\text{G}_{12/13}$ -Protein und Aktivierung der Rho-Kinase vermittelt wird. Diese Kontraktion erfolgt in der glatten Muskelzelle und kann nur direkt in den glatten Muskelzellen unterbunden werden. Aufgrund des Fehlens der NO-GC in den glatten Muskelzellen ist daher eine NO-induzierte Relaxation nicht mehr möglich.

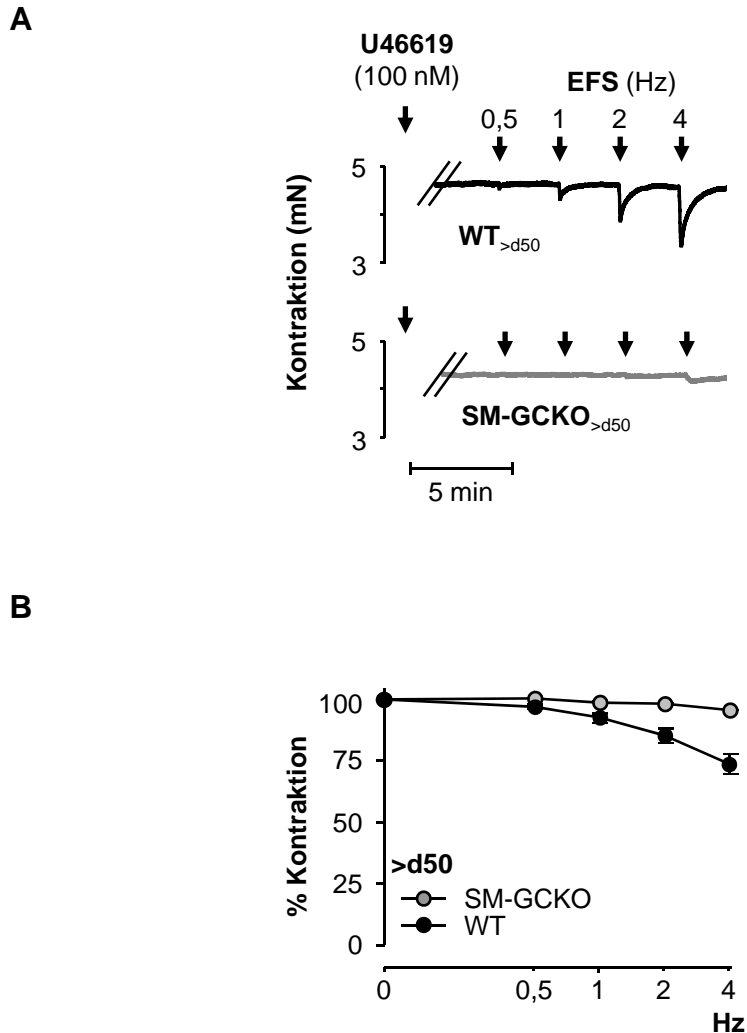
#### **4.2.3.8. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen in der Anwesenheit von Nifedipin**

Um zu überprüfen, ob auch endogenes NO bei Blockade der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle keine Relaxation mehr auslöst, wurde die EFS-induzierte Relaxation unter NANC-Bedingungen in der Anwesenheit von Nifedipin wiederholt (Original-Spur Abb. 26 A). Die Feldstimulation von WT-Fundus-Streifen war auch in Anwesenheit von Nifedipin vorhanden, allerdings geringfügig vermindert. Die Fundus-Streifen aus SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren hingegen zeigten keine EFS-induzierte NO-vermittelte Relaxation mehr (Abb. 26 B).

Auch diese Daten können dadurch erklärt werden, dass wie zuvor beschrieben, die verbleibende Kontraktion nur direkt in den glatten Muskelzellen unterbunden werden kann; da in den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren die NO-GC deletiert ist, ist keine Relaxation durch NO möglich.

#### **4.2.4. Immunhistochemie des Fundus der GCKO- und SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere**

Aufgrund der zuvor erhobenen Daten lag die Vermutung nahe, dass die NO-GC nicht nur in den glatten Muskelzellen, sondern auch in einem oder mehreren anderen Zelltypen an der Relaxation beteiligt ist. Die SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere zeigten eine NO-induzierte Relaxation, obwohl die NO-GC vollständig in der glatten Muskelzellen deletiert war. Um zu klären, welcher Zelltyp für die verbleibende NO-induzierte Relaxation verantwortlich ist, wurden Gewebsschnitte angefertigt und mit Antikörpern gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC untersucht. Dies geschah durch unseren Kooperationspartner Dr. Peter König (*Institut für Anatomie, Lübeck*). Der  $\beta_1$ -Antikörper führte im WT-Fundus zu einer starken Immunreaktion in der Lamina muscularis mucosae, die viele Glattmuskelzellen aufweist. Die Tunica muscularis, die Schicht, die für die Darm-Motilität verantwortlich ist, wies ebenfalls Zellen mit starker Immunreaktion, allerdings auch Bereiche mit etwas schwächerer Immunreaktion, auf. Auch die Glattmuskelzellen der Gefäße, welche durch die Mukosa verlaufen, waren NO-GC positiv.



**Abb. 26: EFS-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen in Anwesenheit von Nifedipin**

Fundus-Streifen von Tamoxifen-injizierten WT- und SM-GCKO-Tieren wurde unter NANC-Bedingungen mit U46119 (100 nM) in Anwesenheit von Nifedipin kontrahiert und dann mit verschiedenen Feldstärken stimuliert.

- (A) Original-Spuren der Relaxation durch EFS der Fundus-Streifen von SM-GCKO<sub>>d50</sub>- und WT<sub>>d50</sub>-Tieren in Anwesenheit von Nifedipin (1  $\mu$ M).
- (B) Quantitative Auswertung der EFS-induzierten Relaxation von SM-GCKO<sub>>d50</sub>- und WT<sub>>d50</sub>-Tieren (n = 6 pro Genotyp).

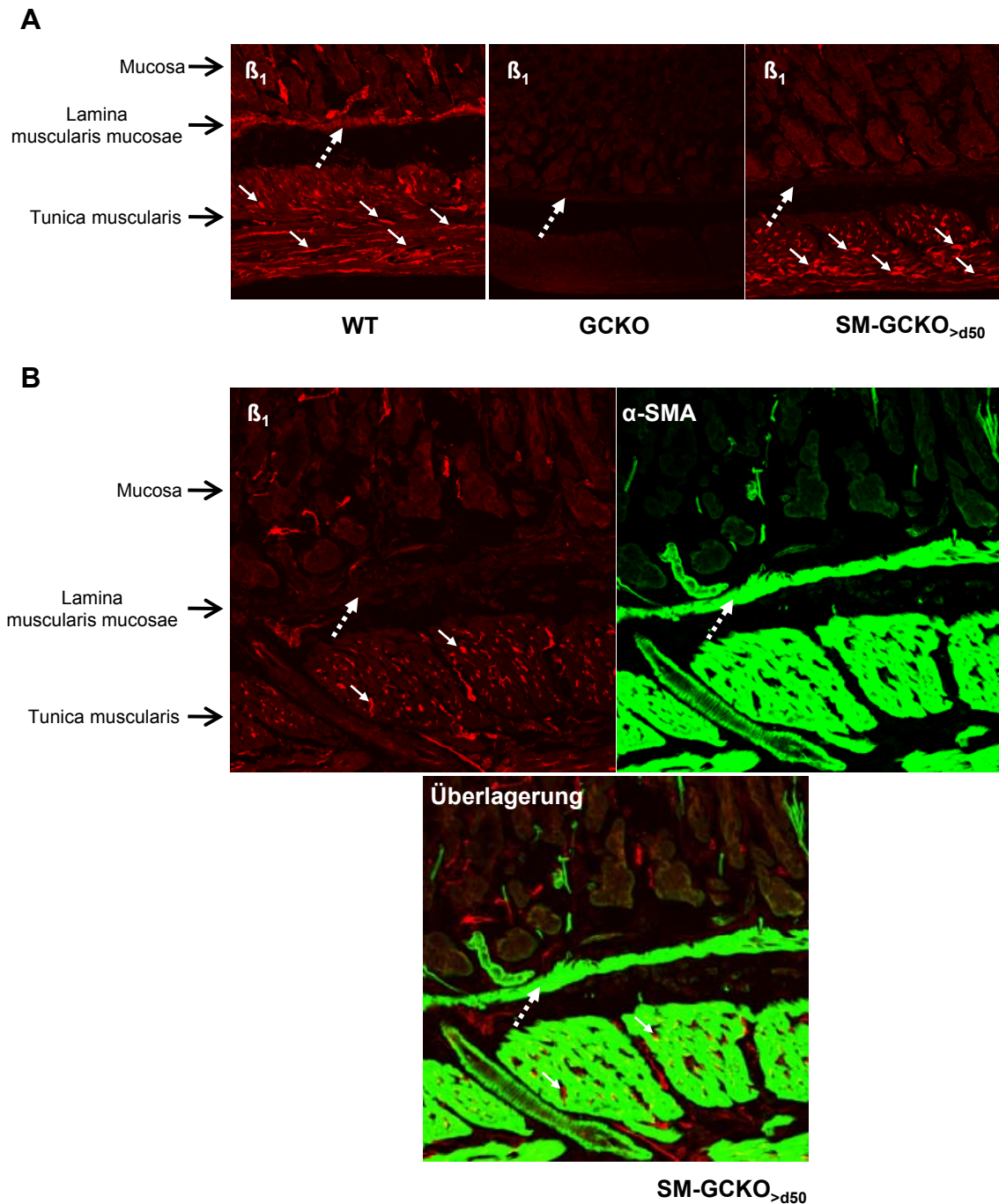
Wie erwartet, konnte im Fundus von GCKO-Tieren weder in der Lamina muscularis mucosae noch in der Tunica muscularis eine Immunreaktion nachgewiesen werden (Abb. 27 A).

Die Lamina muscularis mucosae des Fundus der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere zeigte, wie der Fundus der GCKO-Tiere, keine Immunreaktion. Allerdings waren einige Zellen in der Tunica muscularis noch stark NO-GC positiv. Die Glattmuskelzellen der Tunica muscularis, die beim WT-Fundus zuvor schwach immunreaktiv war, zeigten bei den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren keine Immunreaktion mehr. Um zu zeigen, welche Zellen in der Tunica muscularis die glatten Muskelzellen waren, wurden die Schnitte mit einem Antikörper gegen den Glattenmuskelzell-Marker  $\alpha$ -SMA behandelt (Abb. 27 B). Im Fundus der SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tiere zeigte sich keine Kolo-kalisation von  $\alpha$ -SMA mit der NO-GC. Dies ist anhand der Lamina muscularis mucosae deutlich zu erkennen. In der Tunica muscularis hingegen sind die Zellen mit starker NO-GC nicht mit den  $\alpha$ -SMA-Signalen kolo-kalisiert.

Schlussfolgernd ist die NO-GC in SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren stark in Zellen exprimiert, die keine Glattmuskelzellen sind. Diese Zellen könnten für die in 4.2.3.1. gezeigte verbleibende Relaxation durch NO verantwortlich sein. Morphologie und Lokalisation deuten bei diesen Zellen auf interstitielle Zellen von Cajal hin.

### **4.3. Die Funktion der NO-GC der glatten Muskulatur im gastrointestinalen System von ICC-GCKO- und dbI-GCKO-Tieren**

Die überraschenden Ergebnisse der erhaltenen NO-Relaxation des Fundus der SM-GCKO-Tiere weist auf die Expression der NO-GC in einem anderen Zelltyp hin. Ob es sich bei diesem Zelltyp um interstitielle Zellen von Cajal (ICC) handelt und wie sie an der nitregeren Relaxation beteiligt sind, wird zurzeit in der Literatur noch kontrovers diskutiert. Um die Funktion der NO-GC in den ICC näher zu untersuchen, wurden als Nächstes ICC-spezifische KO-Tiere erzeugt. Hierzu wurde eine Maus in die  $\beta_1$ -flox/flox-Linie eingekreuzt, die das Gen der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des ICC-spezifischen cKit-Promotors trug. Homozygot gefloxt, cKit-Cre-positive Mäuse wurden mit Tamoxifen gespritzt (ICC-GCKO) und nach 50 Tagen zu Untersuchungen eingesetzt. Ebenfalls wurden cKit-Cre-positive Mäuse mit SM-GCKO-Tieren verpaart, um eine Mauslinie zu erhalten, der die NO-GC in beiden Zelltypen, SMC/ICC, fehlt. Diese Tiere werden im Folgenden als Doppel-KO (dbI-GCKO) bezeichnet. Auch die dbI-GCKO-Tiere wurden mit Tamoxifen behandelt und nach 50 Tagen zu verschiedenen Experimenten eingesetzt. Um den Ausschnitt der NO-GC in den beiden Mausmodellen zu überprüfen, wurden wiederum immunhistologische Färbungen mit Antikörpern gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit und c-Kit,



Reprinted from: Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Dispensable for Nitrgic Signaling and Gut Motility in Mouse Intestinal Smooth Muscle. Dieter Groneberg *et al.*, *Gastroenterology*. 2011 doi:10.1053/j.gastro.2011.01.038. Copyright (2011), with permission from Elsevier.

**Abb. 27: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression im Fundus von WT-, GCKO- und SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tieren**

Cryoschnitte von Funden der verschiedenen Tiere wurden mit Antikörpern gegen  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (grün) inkubiert.

- (A) WT-Tiere zeigten starke NO-GC-Antikörper-Färbung in der Lamina muscularis mucosae (gestrichelter Pfeil). In der Tunica muscularis sind einzelne Zellen stark (Pfeile) und der Hintergrund schwach gefärbt. Der Fundus der GCKO-Tiere zeigte keine Färbung. Im Fundus der SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tiere zeigten sich nur noch Signale in den Zellen mit starker Färbung.
- (B) Die Färbungen des  $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ -SMA; grün) und die NO-GC-Antikörper-Färbung ( $\beta_1$ -Untereinheit Antikörper; rot) des Fundus der SM-GCKO<sub>>d50</sub>-Tiere sind nicht kolokalisiert (Überlagerungs-Bild).

einem Marker für Cajal-Zellen, durchgeführt. Die zuvor mit den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren durchgeführten pharmakologischen Versuche (siehe 4.2.3.1. und 4.2.3.3.) wurden mit den neuen Mausmodellen wiederholt, und die physiologische Konsequenz der Deletion der NO-GC in diesen Zelltypen durch Messung der Darm-Transportzeit überprüft.

#### **4.3.1. Immunhistochemie des Fundus der ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tiere**

Zunächst wurden Gewebeschnitte des WT-Fundus angefertigt und immunhistologisch mit den Antikörpern gegen c-Kit und  $\beta_1$ -Untereinheit untersucht. Der WT-Fundus zeigte in einigen Zellen Färbungen durch den c-Kit-Marker. In diesen Schnitten wurde eine Kolo-kalisation von c-Kit und  $\beta_1$ -Signalen sichtbar (Abb. 28 A). Allerdings wiesen neben den c-Kit-positiven Zellen noch weitere Zellen eine starke Färbung für die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC auf, die nicht mit den c-Kit-Signalen kolo-kalisiert waren. Es scheint also neben den ICC noch eine weitere Zellart zu geben, die die NO-GC exprimiert.

Gewebeschnitte des dbl-GCKO-Fundus wurden ebenfalls mit den Antikörpern gegen c-Kit und  $\beta_1$ -Untereinheit angefärbt. Der Ausschnitt der NO-GC in den glatten Muskelzellen ist in der Tunica muscularis zu erkennen, die keine Färbung mehr für die NO-GC zeigte. Die c-Kit-positiven Zellen der dbl-GCKO-Funden wiesen im Gegensatz zu den WT-Gewebeschnitten keine Kolo-kalisation mit NO-GC auf. Aber im dbl-GCKO-Fundus zeigten sich noch weitere NO-GC-positive Zellen, die Mastzellen oder Neurone sein könnten (Abb. 28 B; Überlagerung).

Schlussfolgernd zeigen die dbl-GCKO-Tiere keine NO-GC-Expression in Glattmuskel-Zellen und Cajal-Zellen.

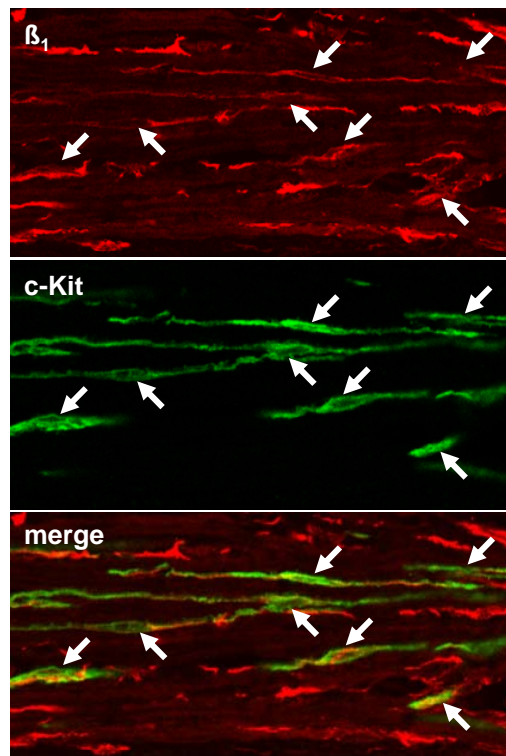
#### **4.3.2. In vitro Messung der Relaxationsfähigkeit gastrointestinaler Gewebe von ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tieren**

##### **4.3.2.1. DEA-NO-induzierte Relaxation des Fundus von ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tieren**

An den Funden der ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tiere wurden wie zuvor an den SM-GCKO-Tieren Konzentrations-Wirkungskurven für DEA-NO ermittelt. Überraschenderweise relaxierten die Fundus-Streifen der ICC-GCKO-Tiere vollständig. Allerdings kam es im Vergleich zum WT zu einer Rechtsverschiebung der DEA-NO-Konzentrations-Wirkungskurven, was auf eine verringerte Sensitivität gegenüber NO hinwies (Abb. 29 A). Die dbl-GCKO-Tiere, bei denen die NO-GC sowohl in den glatten Muskelzellen als auch in den Cajal-Zellen deletiert war, zeigten eine fast gänzlich aufgehobene NO-induzierte Relaxation. Erst ab 3  $\mu$ M DEA-NO zeigte sich eine leichte Relaxation, die durch ODQ aufgehoben werden konnte. Diese Restrelaxation ist sehr

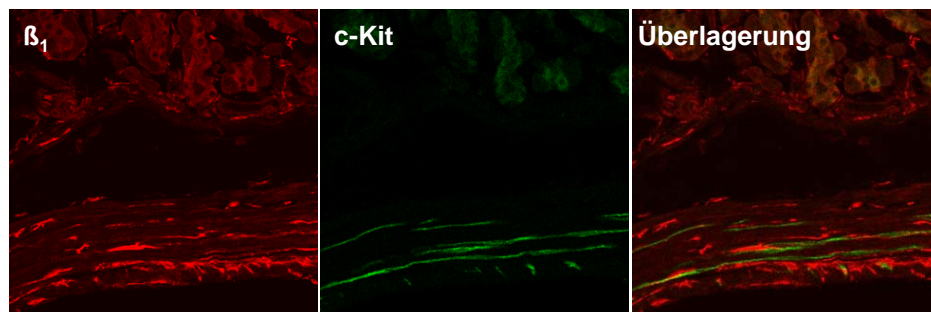


A



WT

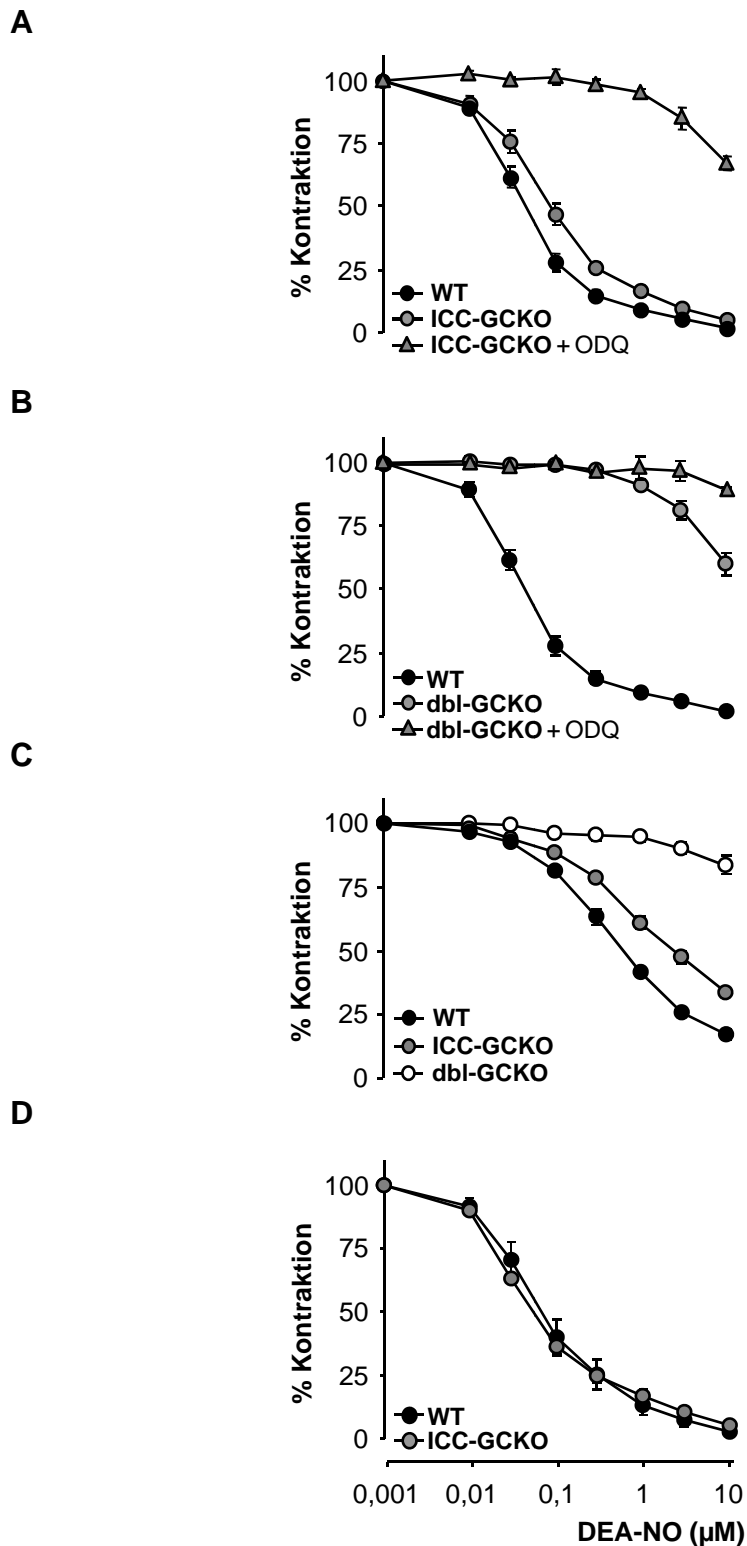
B



dbl-GCKO

**Abb. 28: Immunhistochemische Analyse des Fundus der WT- und dbl-GCKO-Tiere**

- (A) Fundus-Schnitte eines WT-Tieres wurden mit spezifischen Antikörpern gegen  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und c-Kit (grün) gefärbt (mit Pfeilen markiert). Das Überlagerungs-Bild zeigt gelbe Färbungen bei Kolokalisation der beiden Antikörper.
- (B) Fundus-Schnitte eines dbl-GCKO-Tieres wurden mit spezifischen Antikörpern gegen  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und c-Kit (grün) gefärbt. Das Überlagerungs-Bild zeigte keine Kolokalisation der beiden Antikörper in den Schnitten des dbl-GCKO-Tieres.



**Abb. 29: NO-induzierte Relaxation von GIT-Gewebe von ICC-GCKO- und dbi-GCKO-Tieren**

- (A) DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen der ICC-GCKO und Kontrollen.  
 (B) DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen der dbi-GCKO und Kontrollen.  
 (C) DEA-NO-induzierte Relaxation des LES von ICC-GCKO-, dbi-GCKO- und WT-Tieren.  
 (D) DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen der ICC-GCKO- und WT-Tiere in Anwesenheit von Nifedipin.  
 (jeweils n = 5 - 6 Tiere)

wahrscheinlich auf ein unvollständiges Ausschneiden des  $\beta_1$ -Exons durch die Cre-Rekombinase zurückzuführen, da die Cre-Rekombinase nicht in allen Cajal-Zellen induziert wird (D. Saur, persönliche Mitteilung). Schlussfolgernd kann man sagen, dass ein Ausschalten der NO-GC in beiden Zelltypen (Glattmuskel-Zellen und Cajal-Zellen) zu einer fast vollständigen Unterbrechung der NO-induzierten Relaxation im Fundus führt.

#### **4.3.2.2. Konzentrations-Wirkungs-Kurven an LES für DEA-NO**

Um die Ergebnisse des Fundus der ICC-GCKO- und dbl-GCKO-Tiere auch in einem anderen GIT-Gewebe zu überprüfen, wurde die DEA-NO-induzierte Relaxation am LES wiederholt. Die daraus erhaltenen Ergebnisse bestätigten die zuvor im Fundus beobachteten Befunde. Der ICC-GCKO-LES relaxierte DEA-NO-abhängig. Dabei kam es zu einer vollständigen Relaxation. Hingegen zeigte der dbl-GCKO-LES, vergleichbar mit den Fundus-Proben, bis 3  $\mu$ M DEA-NO keine Relaxation (Abb. 29 C). Somit führt die Deletion der NO-GC in den dbl-GCKO-Tieren zu einer vollständigen Unterbrechung der nitrogenen Relaxation im LES und Fundus.

#### **4.3.2.3. DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen in Anwesenheit von Nifedipin**

Die DEA-NO-induzierte Relaxation in Anwesenheit von Nifedipin wurde wie bei den SM-GCKO<sub>>50d</sub>-Tieren (siehe 4.2.3.1.) an den ICC-GCKO-Tieren wiederholt. Zunächst wurden die Fundus-Streifen im Organbad mit CCh (0,1  $\mu$ M) kontrahiert und anschließend mit Nifedipin inkubiert. Zugabe von Nifedipin führte zu einer Relaxation, die aber nicht vollständig war. Anhand der restlichen Kontraktion, in der statistischen Auswertung als 100% Kontraktion normiert, wurde mit DEA-NO relaxiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der NO-Responsivität zwischen den Funden der ICC-GCKO- und WT-Tiere; die stärkere NO-Responsivität der ICC-GCKO- gegenüber den WT-Tieren ist bei Anwesenheit von Nifedipin nicht mehr vorhanden. Schlussfolgend lässt sich vermuten, dass bei Verwendung von Nifedipin nur die NO-GC in den glatten Muskelzellen von Relevanz ist und sich die Tiere aufgrund der erhaltenen Expression der NO-GC in den glatten Muskelzellen nicht unterscheiden (Abb. 29 D).

#### **4.3.2.4. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen unter NANC-Bedingungen**

Um die Wirkung endogen produzierten NOs zu untersuchen, wurden die Streifen unter NANC-Bedingungen durch Anlegen eines elektrischen Feldes (EF) stimuliert (siehe Abs. 4.2.3.3.). Fundus-Streifen von ICC-GCKO-Tieren zeigten eine EFS-vermittelte

Relaxation. Im Gegensatz dazu zeigten die dbl-GCKO-Tiere keine EFS-vermittelte Relaxation (Abb. 30 B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Fundus-Streifen von dbl-GCKO-Tieren sowohl durch endogenes als auch exogenes NO nicht mehr relaxiert werden können.

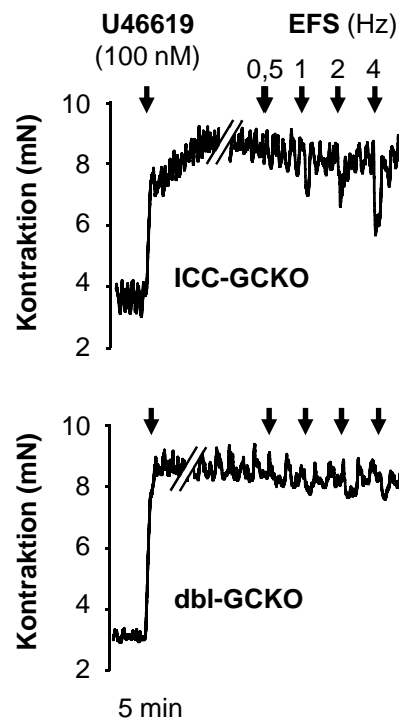
#### **4.3.2.5. Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen ohne NANC-Bedingungen**

Bei den bislang durchgeführten EFS-Experimenten (4.2.3.3. und 4.3.2.4.) wurde die Relaxation der glatten Muskulatur in Anwesenheit von Substanzen betrachtet, die die Wirkung endogen freigesetzter kontrahierender Mediatoren verhindern (NANC-Bedingungen; Atropin und Guanethidin). Im folgenden Experiment wurde das Gewebe mit einem elektrischen Feld in der Abwesenheit von Atropin und Guanethidin stimuliert. Zudem wurde das EFS-Experiment ohne Vorkontraktion durchgeführt. Bei EFS kommt es daher infolge der gleichzeitigen Ausschüttung zum Zusammenwirken von kontrahierenden und relaxierenden Substanzen auf die glatte Muskulatur. Um den Anteil der NO-vermittelten Relaxation zu messen, wurde anschließend die EFS in Anwesenheit von ODQ wiederholt. Die WT-Tiere zeigten vor Zugabe von ODQ eine 70% geringere Kontraktion bei 8 Hz EFS (Abb. 31 B). Die SM-GCKO- und die ICC-GCKO-Tiere zeigten ebenfalls eine geringere Kontraktion vor Zugabe von ODQ um etwa 50%. Somit sind beide Systeme unabhängig voneinander in der Lage, die durch EFS induzierte Kontraktion durch NO-vermittelte Aktivierung der NO-GC zu inhibieren. Bei den dbl-GCKO-Tieren zeigte sich nach EFS schon in Abwesenheit von ODQ eine starke Kontraktion. Dieses ist durch das Fehlen der NO-GC in SMC/ICC erklärbar. Konsequenterweise wurde diese Kontraktion nicht durch die Zugabe von ODQ verstärkt. Insgesamt zeigen diese Daten, dass es in der Tat erst nach Deletion der NO-GC in SMC und ICC zu einem vollständigen Ausbleiben der nitrergen Relaxation kommt.

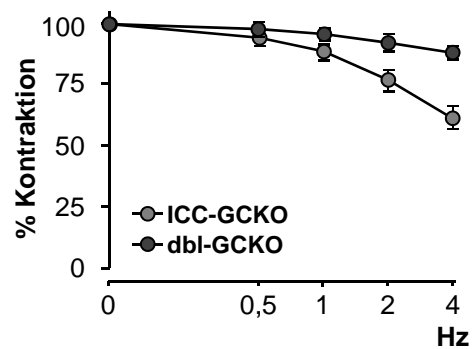
#### **4.3.3. Messung der Transportzeit durch den GIT**

Um die physiologischen Konsequenz der Deletion der NO-GC in den ICC-GCKO- und den dbl-GCKO-Tieren zu überprüfen, wurde die gastrointestinale Transportzeit der Tiere ermittelt. Die Transportzeit in ICC-GCKO-Tieren war gegenüber WT- und SM-GCKO-Tieren unverändert (ca. 180 - 190 min). Somit hat die Deletion der NO-GC in nur einem der beiden Zelltypen keine Auswirkung auf die Motilität. Im Gegensatz dazu zeigten die dbl-GCKO-Tiere eine deutlich längere Transportzeit von ca. 240 min (Abb. 32). Schlussfolgernd führt erst die Deletion der NO-GC in den Cajal-Zellen und

A



B

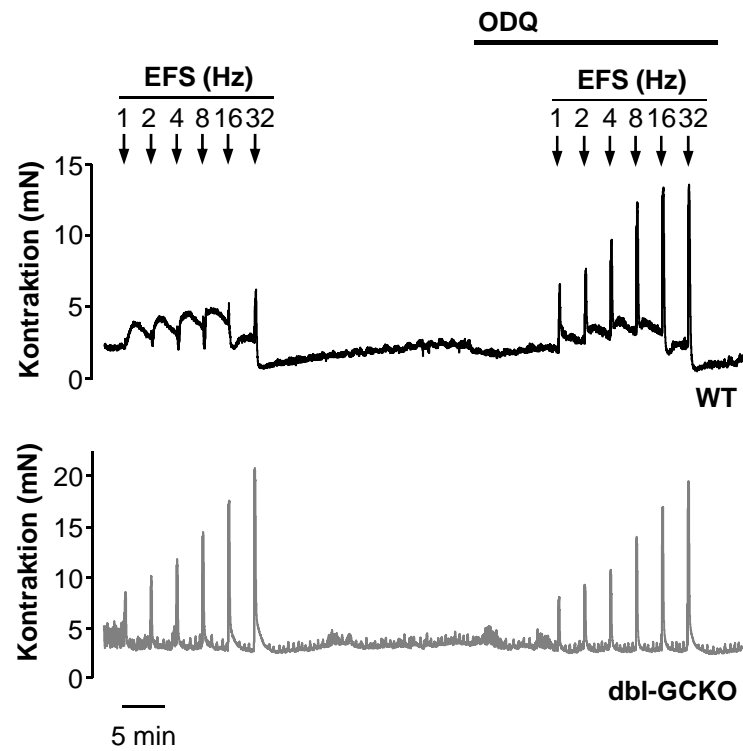


**Abb. 30: EFS-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen unter NANC-Bedingungen**

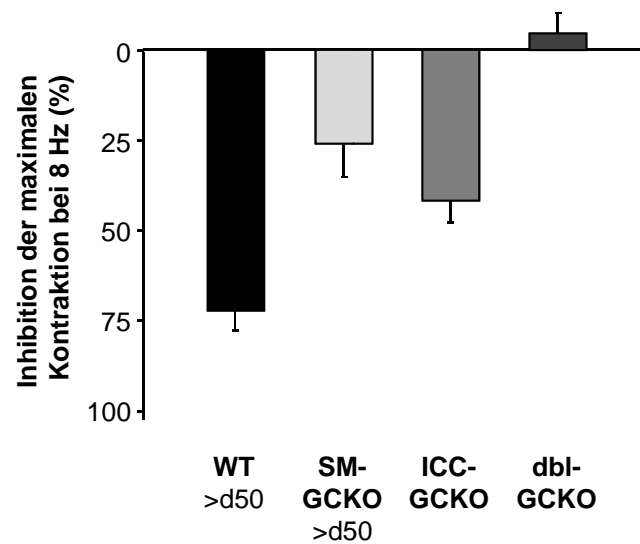
Elektrische Feldstimulation des Fundus unter NANC-Bedingungen (Atropin, Guanethidin; jeweils 1  $\mu$ M).

- (A) Originalspuren der EFS-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen der ICC-GCKO- und dbI-GCKO-Tieren.
- (B) Quantitative Auswertung der EFS-induzierte Relaxation der Fundus-Streifen von ICC-GCKO- und dbI-GCKO-Tieren.

A

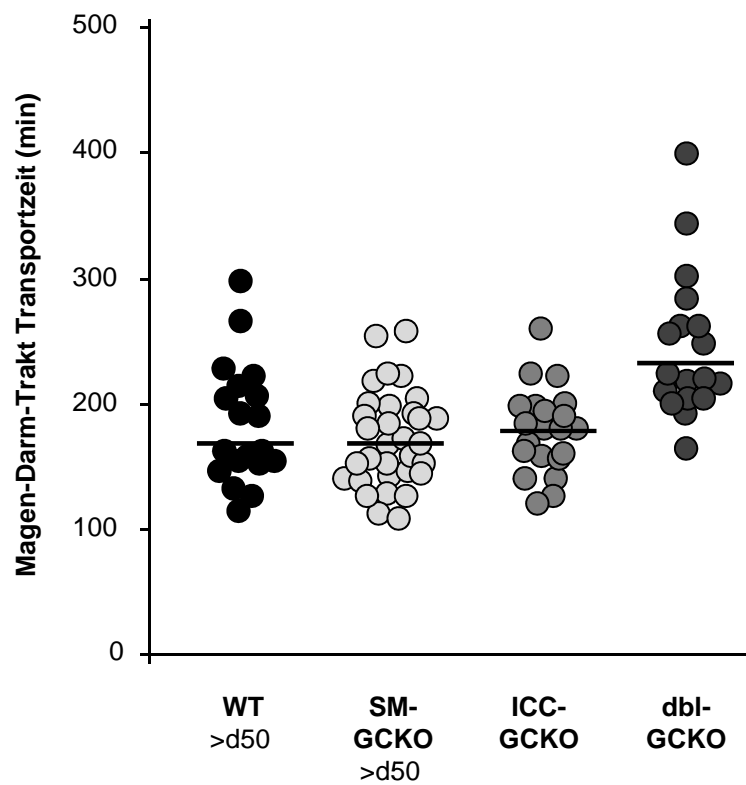


B



**Abb. 31: EFS von Fundus-Streifen ohne NANC**

- (A) Originalspuren der NO-vermittelten Inhibierung der EFS-induzierten Kontraktion der Fundus-Streifen von WT- und dbl-GCKO-Tieren.
- (B) Quantitative Auswertung der NO-induzierten Inhibierung der EFS-induzierten Kontraktion (n= 5 - 8).

**Abb. 32: Gastrointestinale Transportzeit**

Um die Transportzeit der Nahrung zu messen, wurde den Mäusen (WT<sub>>d50</sub>, SM-GCKO<sub>>d50</sub>, ICC-GCKO, dbl-GCKO) Carmin peroral in den Magen gespritzt. Die Zeit zum Austreten des ersten rot gefärbten Kotes wurde gemessen. Die dbl-GCKO-Mäuse zeigten eine verlängerte Transportzeit im Vergleich zu den anderen Mausmodellen.

gleichzeitig in den glatten Muskelzellen zu einer Beeinträchtigung der Motilität, die sich in einer verlangsamten Transportzeit widerspiegelt.



# Diskussion

Glatte Muskulatur befindet sich in verschiedenen Organen wie den Gefäßen, dem Gastrointestinaltrakt oder dem Corpus Caverosum des Penis. Die glatte Muskulatur steuert grundlegende Funktionen des Körpers, hierzu gehören z.B. die Regulation des Blutdruckes oder die Steuerung der Motilität des Gastrointestinaltraktes. Die Fähigkeit zur geregelten Kontraktion und Relaxation ist dabei essentiell für die Ausübung dieser Funktionen.

Das Signalmolekül NO spielt bei der Relaxation der glatten Muskulatur eine bedeutende Rolle. NO führt über Stimulation der NO-GC zur Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP. cGMP aktiviert unter anderem die cGMP-abhängige Proteinkinase, die nach Aktivierung über die Phosphorylierung von Effektorproteinen zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führt.

Zur Aufklärung der Funktionen der NO-GC wurden vor einiger Zeit in unserem Labor Knockout-Mäuse für das Enzym erzeugt (GCKO). Da diese Mäuse, denen die NO-GC ubiquitär fehlt, eine Vielzahl von Phänotypen zeigten, wurden zellspezifische Knockout-Linien mithilfe des Cre-Lox-Systems erzeugt. Bei diesen induzierbaren KO-Linien wird erst durch Tamoxifen-Injektion die NO-GC in den spezifischen Zelltypen deletiert.

## **5.1. Bedeutung der NO-GC in der glatten Muskulatur für den Blutdruck**

Bluthochdruck ist einer der verbreitetsten Risikofaktoren der westlichen Welt und ist verantwortlich für eine Vielzahl von kardiovaskulären Krankheiten wie koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt oder Herzinsuffizienz. Die Mechanismen, die zu der Entstehung des Bluthochdrucks führen, werden kontrovers diskutiert. Als primäre Ursache wird jedoch generell eine renale Störung vermutet, die auf einer Imbalance der Natrium- und Wasserrückresorption beruht. Bei der Regulierung des Blutdrucks spielt die NO/cGMP-Signalkaskade eine große Rolle. Um die Bedeutung der NO/cGMP-Signalkaskade für die Regulation des Blutdrucks genauer zu untersuchen, wurden verschiedene KO-Maus-Modelle innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade erzeugt.

Einige dieser Mauslinien zeigen einen erhöhten Blutdruck. Dazu zählen die KO-Linien der eNOS, der PKG und des BK-Kanals (Nelson *et al.*, 1995; Pfeifer *et al.*, 1998; Brenner *et al.*, 2000). Diesen Mausmodellen fehlen jeweils die zuvor genannten Enzyme ubiquitär. Auch das Knockin-Modell der Leucine-Zipper-Mutanten der PKG, bei der die Interaktion der PKG mit Effektoren durch den veränderten Leucine-Zipper unterbrochen ist, zeigt einen erhöhten Blutdruck (Michael *et al.*, 2008). Zusätzlich führt auch die pharmakologische Inhibition der NOS mittels L-NAME zu einer Hypertonie (Van Vliet *et al.*, 2003). All diese Modelle unterstreichen eine Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade an der Regulation des Blutdrucks. In keiner dieser Studien konnte jedoch gezeigt werden, welcher Zelltyp unmittelbar für die Erhöhung des Blutdrucks verantwortlich ist.

Die in unserem Labor erzeugten GCKO-Mäusen besitzen einen im Vergleich zu den WT-Kontrollen um 30 mmHg erhöhten Blutdruck in Kombination mit einer fehlenden NO-Responsivität der vaskulären glatten Muskulatur (Friebe *et al.*, 2007). Diese Daten deuten auf eine Dysregulation der glatten Muskulatur als primären Grund für den erhöhten systolischen Blutdruck hin. Allerdings erlaubt eine vollständige Deletion der NO-GC keine Aussage über die physiologische Bedeutung des Enzyms in einem einzelnen Zelltyp. Somit kam die Frage auf, ob das Fehlen der NO-GC ausschließlich in den glatten Muskelzellen den erhöhten Blutdruck bedingt, oder ob das Ausschalten des Enzyms in mehreren verschiedenen Zelltypen verantwortlich für die Entstehung der Hypertonie ist.

Um diese Frage zu klären, wurde in dieser Arbeit ein spezifischer Knockout der NO-GC in den glatten Muskelzellen erzeugt. Hierzu wurde eine Mauslinie verwendet, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle einer Glattmuskel-spezifischen Promotors (SMMHC) exprimiert (Wirth *et al.*, 2008). Es stellte sich die Frage, ob in Analogie zu den Total-KO-Mäusen (GCKO) durch das Fehlen der NO-GC in den glatten Muskelzellen ein Hypertonus entsteht.

Tatsächlich zeigten die Glattmuskel-spezifischen KO-Mäuse (SM-GCKO), wie die GCKO-Mäuse, einen um 30 mmHg erhöhten systolischen Blutdruck (Abb. 15 A). Die NO-Responsivität der Aorten der SM-GCKO-Tiere war ebenfalls vollständig verschwunden (Abb. 10). Das Fehlen der physiologischen NO-Relaxation der glatten Muskulatur ist somit eine simple und schlüssige Erklärung für den Bluthochdruck in den SM-GCKO-Mäusen. Somit ist die Deletion eines einzigen Enzyms in nur einem Zelltyp ausreichend für die Entstehung einer Hypertonie.

Die genauere Betrachtung zeigte, dass die Tamoxifen-Injektion in den SM-GCKO-Tieren in den glatten Muskelzellen zu einem zeitabhängigen Verlust der NO-induzierten Relaxation der glatten Muskulatur der Aorta führte. Dabei verlief die

Abnahme der NO-Responsivität invers zum Blutdruckanstieg (Abb. 15 B). Der Blutdruck zeigte nach etwa 10 Tagen eine signifikante Erhöhung und nach 30 Tagen eine maximalen Zunahme (+30 mmHg) im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Die NO-Responsivität der Aorta-Ringe war erstmals nach 10 Tagen verringert und 50 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion vollständig unterbrochen. Interessanterweise zeigten Rückgang von NO-GC-Expression und cGMP-Produktion die gleiche Kinetik, waren aber im Vergleich zur NO-Responsivität zu einem früheren Zeitpunkt verringert (Abb. 14). Schon fünf Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion war die NO-GC-Expression und cGMP-Produktion um jeweils 75% verringert. Überraschenderweise zeigte sich nur eine geringe Reduktion der NO-Responsivität der Aortenringe zu diesem Zeitpunkt. Somit können die Zellen 80 - 90% der NO-GC verlieren, ohne dass sich eine funktionelle Änderung (z.B. Blutdruckerhöhung) einstellt.

Diese Ergebnisse weisen auf eine relative 'Überexpression' der NO-GC in den glatten Muskelzellen hin. Eine starke Expression der NO-GC erhöht die Sensitivität der Zelle gegenüber dem aus dem Endothel freigesetzten NO; somit führt eine Verringerung der NO-GC-Expression zunächst nicht zu einer Beeinflussung des physiologischen Effektes, außer, dass vergleichsweise höhere NO-Konzentrationen für das Erreichen eines bestimmten Effektes notwendig sind. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen an den  $\alpha_1$ -GCKO überein, die von der NO-GC als einem 'spare receptor' sprechen (Mergia *et al.*, 2006).

Im Vergleich zu anderen Proteinen ist die Reduktion der NO-GC-Expression nach der Tamoxifen-Injektion relativ langsam. Anhand der Western-Blot-Daten (Abb. 4 C) kann eine Halbwertszeit von 3 bis 4 Tagen geschätzt werden, was auf einen langsamen Umsatz der NO-GC auf Proteinebene hindeutet. Die langsame Abnahme der NO-GC und des NO-vermittelten Effektes ist nicht durch eine langsame Cre-Recombinase-Aktivität zu erklären. In der Originalpublikation der SM-MHC-Cre-Maus kam es innerhalb von 3 Tagen zur Elimination von G Proteinen ( $G_q/G_{11}$ ) und infolgedessen zu einer Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks um 10 - 15 mmHg (Wirth *et al.*, 2008).

Die Injektion von Tamoxifen führt zu einer Abnahme sowohl der  $\beta_1$ - als auch der  $\alpha_1$ -Untereinheit der NO-GC (Abb. 4 B). Die Abnahme des Dimerisierungspartner  $\alpha_1$  erscheint überraschend, aber frühere in vitro-Studien im unseren Labor zeigten, dass eine einzelne Untereinheit in Abwesenheit des betreffenden Dimerisierungs-Partners nicht stabil ist und sehr schnell degradiert wird (Harteneck *et al.*, 1990). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Deletion der  $\alpha_1$ - oder der  $\alpha_2$ -Untereinheit in der Maus zu einer jeweils entsprechenden Reduktion der  $\beta_1$ -Untereinheit führte (Mergia *et al.*, 2003). Obwohl die Gene der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit hintereinander auf dem Chromosom 3

der Maus lokalisiert sind, befindet sich die  $\alpha_2$ -Untereinheit auf Chromosom 9, was eine posttranskriptionelle Regulation der Genexpression wahrscheinlich macht.

Zur Überprüfung, ob endogenes NO trotz Fehlens der NO-GC immer noch an der Regulation des Blutdruckes beteiligt ist, wurde L-NAME zur Hemmung der NOS eingesetzt. In WT-Tieren erhöhte sich nach Gabe von L-NAME innerhalb eines Tages der SBP von 103 auf 120 mmHg. Im Kontrast dazu hatte L-NAME in SM-GCKO-Tieren keinen Einfluss auf den SBP (zuvor 133 mmHg; 1 Tag nach L-NAME Gabe 133 mmHg; Abb. 16). Daraus lassen sich zwei wichtige Dinge schließen: Zum einen vermittelt endogenes NO seine Blutdruck-regulierende Wirkung exklusiv über die NO-GC den glatten Muskelzellen und zum anderen spielt NO-GC in anderen Zellen oder Geweben keine Rolle bei der Regulation des Blutdruckes. Diese Schlussfolgerung wird dadurch unterstützt, dass sowohl die GCKO-Tiere als auch die SM-GCKO-Tiere einen um 30 mmHg erhöhten Blutdruck zeigten. Interessanterweise zeigten die WT-Kontrollen, die mit L-NAME behandelt wurden, nicht die gleiche Blutdruck-Erhöhung wie die GCKO-Tiere (WT: +20 mmHg vs GCKO +30 mmHg). Diese Diskrepanz könnte folgendermaßen erklärt werden: Obwohl L-NAME ein spezifischer Inhibitor der NOS ist, könnte doch ein kleiner Teil der NOS noch aktiv sein. Dies relativ wenige NO würde aber aufgrund der hohen NO-GC-Expression immer noch zu einem Effekt führen. Darüberhinaus könnten Nitrite oder Nitrate aus endogenen Prozessen oder der Nahrung unabhängig von der NOS immer noch die NO-GC aktivieren (Larsen *et al.*, 2006). Alternativ könnte aber auch die basale Aktivität der NO-GC Ursache für diesen Effekt sein.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Deletion der NO-GC ausschließlich in den glatten Muskelzellen ausreicht, eine Hypertonie hervorzurufen.

## **5.2. Bedeutung der NO-GC der glatten Muskulatur für die Motilität**

### **5.2.1. Glattmuskel-spezifische KOs der NO-GC**

Störungen von Kontraktion oder Relaxation der gastrointestinalen Muskulatur können zu verschiedenen Krankheiten wie Gastroparese, chronische idiopathische intestinale Pseudoobstruktion oder Achalasie führen. NO ist von zentraler Bedeutung bei der gastrointestinalen Motilität und hat einen großen Einfluss auf das fein ausbalancierte Zusammenspiel von Kontraktion und Relaxation. Durch die Möglichkeit der vollständigen und gewebsspezifischen Deletion der NO-GC in der Maus kann die Lokalisation und Bedeutung der NO-GC für die gastrointestinale Motilität untersucht werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die vollständige Deletion der NO-GC zu einer verlangsamten Transportzeit (Friebe *et al.*, 2007) und zu frühzeitigem Sterben aufgrund von intestinaler Obstruktion führt. Innerhalb dieser

Arbeit sollte die Ursache der verlangsamten Transportzeit der GCKO-Mäuse weiter untersucht und an Zell-spezifischen KO-Mäusen verifiziert werden.

In den GCKO-Tieren war die NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen nicht mehr vorhanden (Abb. 18 A). Auch endogen ausgeschüttetes NO (mittels elektrischer Feldstimulation; EFS) führte nicht zu einer Relaxation der glatten Muskulatur des Magenfundus von GCKO-Tieren (Abb. 18 B). Auch andere gastrointestinale Gewebe der GCKO-Tiere wie LES und Duodenum zeigten keine NO-induzierte Relaxation (Abb. 18 C, D). Dabei stellt sich die Frage, ob dieser Phänotyp eine Konsequenz der Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen ist.

Überraschenderweise war aber die Darmmotilität der SM-GCKO-Mäuse im Vergleich zu dem der Kontroll-Tiere unverändert (Abb. 17). Ein frühzeitiges Sterben wie bei den GCKO-Mäusen wurde nicht beobachtet. Die Organbad-Untersuchungen zeigten einen graduellen Rückgang der NO-Responsivität der gastrointestinalen Muskulatur, der den gleichen zeitlichen Verlauf wie in der glatten Muskulatur der Aorta aufzeigte (Abb. 19 C). Allerdings blieb im Gegensatz zur Aorta (siehe 5.1.) überraschenderweise eine Relaxation durch NO vorhanden. 50 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion verminderte sich die Relaxationsfähigkeit nicht weiter. Auch bis zu 150 Tage nach letzter Tamoxifen-Injektion zeigte sich im Vergleich zu den Tag 50-Tieren kein weiterer Rückgang der NO-Responsivität (Abb. 19 D). Damit ist wie in vaskulären glatten Muskelzellen der Ausschnitt der NO-GC in den glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes nach 50 Tagen vollständig.

Blockade der verbleibenden NO-induzierten Fundus-Relaxation mittels ODQ, dem spezifischen Inhibitor der NO-GC, zeigte, dass eine NO-GC außerhalb den glatten Muskelzellen für die Relaxation verantwortlich sein muss. Somit gibt es neben den glatten Muskelzellen mindestens einen weiteren Zelltyp im Fundus, der NO-GC exprimiert und eine NO-induzierte Relaxation vermittelt. Diese Ergebnisse sind nicht auf den Fundus beschränkt, sondern konnten auch in einem anderen GIT-Gewebe (LES: Abb. 22 A, B) gezeigt werden.

Zur Aufklärung des NO-GC exprimierenden Zelltyps wurden immunhistochemische Aufnahmen von Fundus-Schnitten der Tiere durch unseren Kooperationspartner Peter König angefertigt. In WT-Tieren zeigte sich eine Expression der NO-GC in den glatten Muskelzellen des Fundus, aber eine viel stärkere Expression des Enzyms in einem weiteren Zell-Typ (Abb. 27 A). Diese Zellen konnten aufgrund ihrer Morphologie als interstitielle Zellen von Cajal (ICC) identifiziert werden. Die Identität dieser Zellen wurde daraufhin mit einem ICC-Marker (cKit) bestätigt (Abb. 28).

Die SM-GCKO-Tiere zeigten in der Immunhistochemischen Analyse keine NO-GC-Expression in glatten Muskelzellen, was sehr gut an der Lamina muscularis mucosae

zu erkennen war (Abb. 27 B). Die starke Expression der NO-GC in den ICCs war in den SM-GCKO-Tieren erhalten. Wie zu erwarten war, wiesen GCKO-Tiere keinerlei spezifische Antikörpersignale für die NO-GC in Fundus-Schnitten auf.

Vergleichbare Ergebnisse der NO-GC-Expression konnten auch von anderen Arbeitsgruppen erbracht werden (Iino *et al.*, 2008).

### **5.2.2. Cajal-spezifische- und Cajal + Glattmuskel-spezifische-KOs der NO-GC**

Um die Bedeutung der ICC bei der NO-induzierten Relaxation gastrointestinaler Muskulatur zu untersuchen, wurde im Weiteren ICC-spezifische GCKO-Mäuse erzeugt (ICC-GCKO). Zur Analyse der Veränderungen der ICC-GCKO-Tiere, wurde die Relaxationsfähigkeit der Fundus-Streifen durch NO im Organbad analysiert. Die ICC-GCKO-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrollen nur eine leicht nach rechts verschobene NO-Konzentrations-Wirkungskurve bei der Relaxation (Abb. 29 A). Dieses Ergebnis zeigt, dass die glatte Muskulatur des Fundus der ICC-GCKO-Tiere vollständig relaxiert werden kann. Hierfür sind allerdings höhere NO-Konzentrationen notwendig als bei WT-Tieren.

Durch Kreuzung der ICC-GCKO- mit den SM-GCKO-Tieren wurde eine Doppel-KO-Mauslinie generiert, der die NO-GC in ICC und glatten Muskelzellen fehlt (dbl-GCKO). Diese dbl-GCKO-Tiere zeigten in der immunhistochemischen Analyse weder in den glatten Muskelzellen noch in den Cajal-Zellen eine NO-GC-Expression (Abb. 28 B). Weder pharmakologisch zugegebenes noch endogen produziertes NO führte im Fundus von dbl-GCKO-Tieren zu einer Relaxation (Abb. 29 B; 30 B). Sowohl für den ICC- als auch für den dbl-GCKO konnten die Ergebnisse auch im LES bestätigt werden (Abb. 29 C).

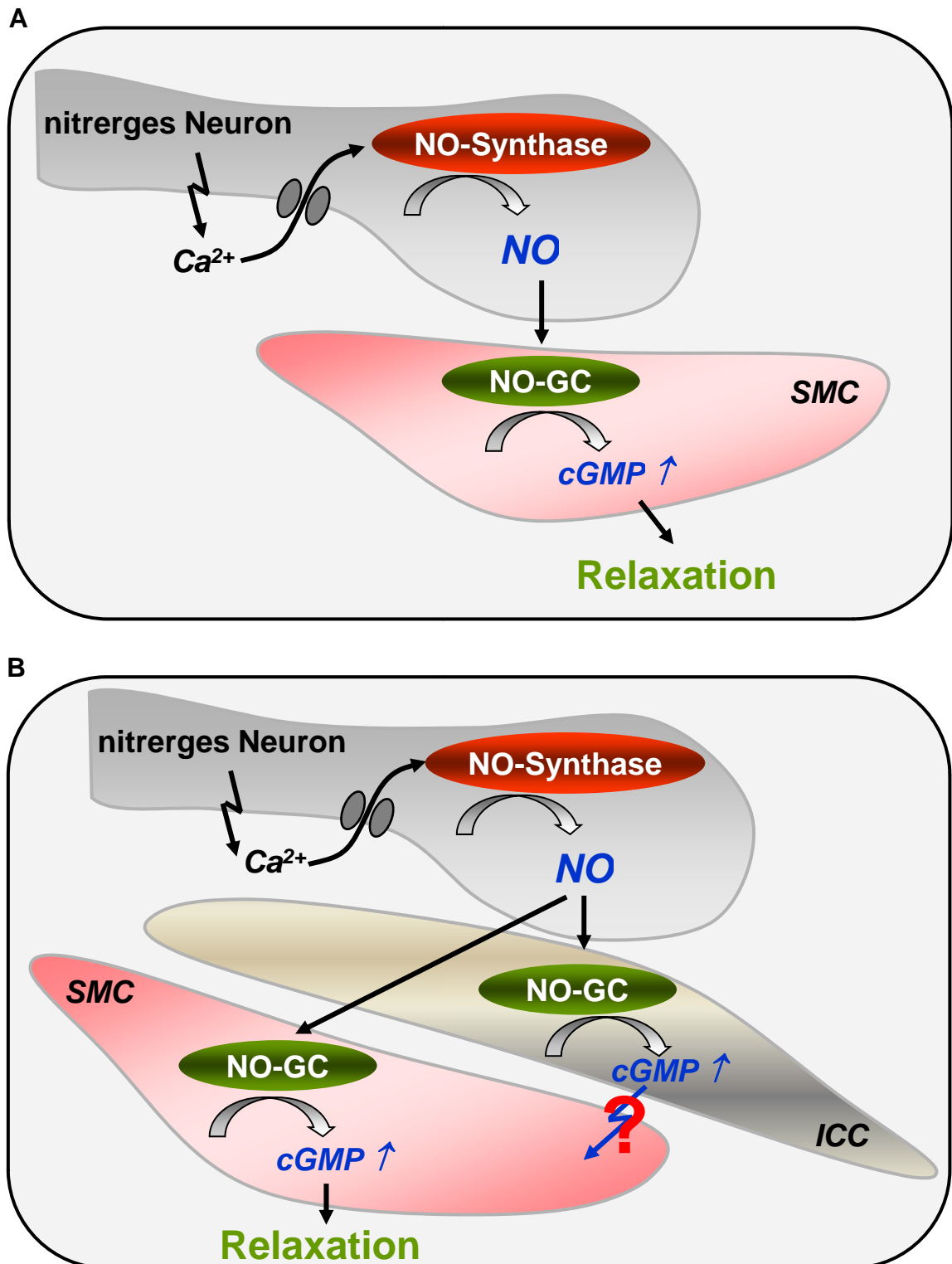
Um die physiologische Konsequenz des Fehlens der NO-GC zu überprüfen, wurde bei den Mäusen die Darmpassagezeit der Nahrung gemessen. Die Transportzeiten der SM-GCKO- und ICC-GCKO-Tiere zeigten keinen Unterschied zu denen der WT-Kontrollen. Erst die kombinierte Deletion der NO-GC in Glattmuskel-Zellen und Cajal-Zellen in den dbl-GCKO-Tieren führte zu einer deutlichen Verlängerung der Transportzeit (Abb. 32).

Diese Ergebnisse stützen die Idee, dass die nitrege Relaxation der glatten Muskelzellen durch die ICCs mit gesteuert wird. Die ICCs haben engen Kontakt mit Nerv-Varikositäten und formen Gap-Junctions mit den glatten Muskelzellen (Beckett *et al.*, 2005). Dabei wird allerdings angenommen, dass die intramuskulären-ICC als primäres Ziel der Motor-Neurotransmission im gastrointestinalen Gewebe fungieren (Ward *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2004).

In verschiedenen Studien konnte auch die Expression der einzelnen Enzyme der NO/cGMP-Kaskade in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakt gezeigt werden. So wurden im Jejunum der Ratte nNOS-positive Nervenfasern in direkter Nachbarschaft von ICC entdeckt, wobei ICCs selber keine nNOS exprimieren (Salmhofer *et al.*, 2001). Im Gastrointestinaltrakt von Meerschweinchen werden NO-GC und PKGI besonders stark in den Cajal-Zellen exprimiert, lediglich schwache Signale dieser Enzyme wurden in den glatten Muskelzellen nachgewiesen (Iino *et al.*, 2008). Nach EF-Stimulation der Urethra von Schafen und Ratten konnte eine cGMP-Bildung in den dort ebenfalls vorhandenen ICC-IM und Glattmuskel-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf ein paralleles Innervations-Modell hin, in dem beide Zelltypen das Ziel der NO-Freisetzung darstellen (García-Pascual *et al.*, 2008).

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen lässt sich ein verfeinertes Modell der nitrogenen Relaxation gastrointestinaler glatter Muskulatur postulieren. Das bestehende Modell ging von einer direkten Innervation der glatten Muskelzellen aus. Dabei aktiviert das in den Neuronen gebildete NO quasi als Neurotransmitter direkt die NO-GC in den glatten Muskelzellen und führt zu einer Produktion von cGMP (Abb. 33 A). Im erweiterten Modell der nitrogenen Relaxation wird NO-GC in den interstitiellen Zellen von Cajal aktiviert und vermittelt vermutlich über eine Membranpotential-Veränderung die Relaxation der glatten Muskelzellen. Eine direkte Aktivierung der glattmuskulären NO-GC wird aufgrund der größeren Diffusionsstrecke vermutlich eher bei hohen NO-Konzentrationen erfolgen (Abb. 33 B).

Insgesamt zeigen die an den zellspezifischen Knockouts der NO-GC erhobenen Daten, dass die gastrointestinale Motilität maßgeblich von der nitrogenen Relaxation über beide Zelltypen, glatte Muskelzellen und ICC, reguliert wird.



**Abb. 33: Model der nitrogenen Relaxation**

- (A) Das bisherige Model der nitrogenen Relaxation ging von einer direkten Innervation der glatten Muskelzellen (SMC) aus. Dabei aktiviert das in den Neuronen gebildete NO die NO-GC in den SMC und führt zu einer Produktion von cGMP.
- (B) Im erweiterten Model der nitrogenen Relaxation wird die NO-GC in den interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) aktiviert und vermittelt vermutlich über Membranpotential-Veränderung die Relaxation der SMC. Eine direkte Aktivierung der glattmuskulären NO-GC wird aufgrund der größeren Diffusionsstrecke vermutlich erst bei hohen NO-Konzentrationen erfolgen.



## Zusammenfassung

Die Stickstoffmonoxid (NO)-cGMP-Signalkaskade spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des glatten Muskeltonus. NO ist einer der wichtigsten vaskulären Faktoren für die Relaxation der Blutgefäße sowie für die Regulation des Blutdruckes und fungiert ebenfalls als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im gastrointestinalen Trakt. Es wirkt hauptsächlich über die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC), die aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Deletion der  $\beta_1$ -Untereinheit in Mäusen führt zu einem vollständigen NO-GC-Knockout (GCKO). GCKO-Mäuse zeigen keine NO-induzierte Relaxation der vaskulären und gastrointestinalen glatten Muskulatur. Die Mäuse zeigen eine arterielle Hypertonie und eine verlängerte Magen-Darm-Transportzeit, die in eine gastrointestinale Dysfunktion mündet. Allerdings erlaubt eine vollständige Deletion der NO-GC in den Mäusen keine Identifikation des Zell- bzw. Gewebe-Typs, der für den erhöhten Blutdruck und die gastrointestinale Dysfunktion verantwortlich ist.

Um die relative Beteiligung der glatten Muskelzellen an der Hypertonie und der gestörten Darm-Motilität zu bestimmen, wurden Glattmuskel-spezifische Knockout-Mäuse für die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (SM-GCKO) generiert.

Die SM-GCKO-Mäuse entwickelten im Verlauf der Deletion eine arterielle Hypertonie in Kombination mit einem Verlust der NO-induzierten Glattmuskelrelaxation. Diese Daten zeigen, dass die Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen völlig ausreichend ist, eine Hypertonie zu erzeugen.

Überraschenderweise ist die Darm-Motilität der SM-GCKO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen unverändert. In gastrointestinaler Muskulatur exprimieren neben den glatten Muskelzellen auch die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) die NO-GC. Mithilfe einer Cre-spezifischen Maus für ICC wurde eine Mauslinie generiert, der die NO-GC in beiden Zelltypen fehlt.

Der gastrointestinale Phänotyp dieser Doppel-Knockouts ähnelt dem der totalen GCKO-Tiere: Die nitrerge Relaxation fehlt und die Magen-Darm-Transportzeit ist verlängert.

Zusammenfassend führt eine Deletion der NO-GC in glatten Muskelzellen und gleichzeitig in den ICC zu einer vollständigen Unterbrechung der nitrergen Relaxation in GI Trakt.

## Summary

The nitric oxide (NO)-cGMP signaling pathway plays a prominent role in the control of smooth muscle tone. NO is one of the main vascular factors responsible for the relaxation of blood vessels, regulation of blood pressure and also acts as major inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal (GI) tract. It acts predominantly via NO-sensitive guanylyl cyclase (NO-GC) which is made up of 2 different subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ). Deletion of the  $\beta_1$  subunit in the mouse leads to a global NO-GC knockout (GCKO). GCKO mice do not reveal NO-induced relaxation of vascular and GI smooth muscle. They show hypertension and an increased gut transit time resulting in GI dysfunction. However, global deletion of NO-GC in mice does not allow identification of the cell/tissue type responsible for the elevated blood pressure and GI dysfunction.

To determine the relative contribution of smooth muscle cells to the hypertension and GI dysfunction seen in NO-GC knockout mice were generated smooth muscle-specific knockout mice for the  $\beta_1$  subunit of NO-GC (SM-GCKO) using a tamoxifen-inducible system.

SM-GCKO animals develop hypertension over time in combination with a loss of NO-induced smooth muscle relaxation. In sum, these data provide evidence that deletion of NO-GC solely in smooth muscle is sufficient to cause hypertension.

Surprisingly, NO-induced relaxation of GI smooth muscle was only slightly reduced in SM-GCKO mice and gut motility was unchanged compared to wild-type mice. Taken together, lack of NO-GC in smooth muscle cells does not impair NO-induced relaxation of GI tissues or GI motility.

To determine the cell type expressing NO-GC we used immunohistochemistry. We found that, in addition to smooth muscle, interstitial cells of Cajal (ICC) express NO-GC. With a Cre specific mouse model for ICC we generated a mouse line lacking NO-GC in both smooth muscle and ICC. In these double knockouts we observed a phenotype similar to that seen in total GCKO mice including lack of nitrergic relaxation and increased gut transit time. In conclusion, lack of NO-GC in both SMC and ICC totally abolishes nitrergic signaling in GI tract.

## Literaturverzeichnis

- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. und Toro, L.**  
 (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 32950-32956.
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S. und Murad, F.**  
 (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3203-3207.
- Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M. und Price, T.D.**  
 (1963) Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 11: 330-4.
- Atkinson, R. A., Saudek, V., Huggins, J. P. und Pelton, J.T.**  
 (1991) <sup>1</sup>H NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: a leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry* 30, 9387-9395.
- Axelsson, K.L., Wikberg, J.E. und Andersson, R.G.**  
 (1979) Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life. Sci.* 24, 1779-1786.
- Beckett, E.A., Takeda, Y., Yanase, H., Sanders, K.M. und Ward, S.M.**  
 (2005) Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *J Comp Neurol.* 12;493(2):193-206.
- Bender, A.T. und Beavo, J.A.**  
 (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 58(3): 488-520.
- Beckett, E.A., Takeda, Y., Yanase, H., Sanders, K.M. und Ward, S.M.**  
 (2005) Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *J Comp Neurol.* 12;493(2):193-206.
- Bennett, B.D., Bennett, G.L., Vitangcol, R.V., Jewett, J.R., Burnier, J., Henzel, W. und Lowe, D.G.**  
 (1991) Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem.* 5;266(34):23060-7.
- Biel, M., Zong X., Ludwig, A., Sautter, A. und Hofmann, F.**  
 (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Re. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 135: 151-171.
- Birschmann, I. und Walter, U.**  
 (2004) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochim Pol.* 51(2): 397-404.

- Böhme, E., Jung, R. und Mechler, I.**  
(1974) Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol.* 38, 199-202.
- Böhme, E., Graf, H. und Schultz, G.**  
(1978) Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.* 9, 131-143.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J., Roderick, H.L.**  
(2002) Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7320-7322.
- Buechler, W. A., Nakane, M. und Murad, F.**  
(1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 351-7.
- Bult, H., Boeckxstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Jordaens, F.H., Van Maercke, Y.M. und Herman, A.G.**  
(1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic noncholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346-347.
- Burns, A.J., Lomax, A.E., Torihashi, S., Sanders, K.M. und Ward, S.M.**  
(1996) Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(21):12008-13.
- Burns, A.J., Herbert, T.M., Ward, S.M. und Sanders, K.M.**  
(1997) Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* 290, 11-20.
- Buys, E.S., Sips, P., Vermeersch, P., Raher, M.J., Rogge, E., Ichinose, F., Dewerchin, M., Bloch, K.D., Janssens, S. und Brouckaert, P.**  
(2008) Gender-specific hypertension and responsiveness to nitric oxide in sGCalpha1 knockout mice. *Cardiovasc Res.* 1;79(1):179-86.
- Bradford, M.M.**  
(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Bredt, D.S. und Snyder, S.H.**  
(1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulinrequiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 682-5.
- Brenner, R., Pérez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, SW., Patterson, A.J., Nelson, M.T. und Aldrich, R.W.**  
(2000) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407: 870-876.
- Cajal, R.**  
(1893) Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C R Soc Biol (Paris)* 5, 217-223.
- Capecchi, M.R.**  
(1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5(3): 70-6.
- Capecchi, M.R.**  
(1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-92.
- Corbin, J.D. und Francis, S.H.**  
(1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J.Biol.Chem.* 274: 13729-32.

- Dai, X. und Faber, J.E.**  
(2010) Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. *Circ Res.* 25;106(12):1870-81.
- Dangel, O., Mergia, E., Karlisch, K., Groneberg, D., Koesling, D. und Friebe, A.**  
(2010) NO-sensitive guanylyl cyclase is the only NO receptor mediating platelet inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*8:1343 – 1352.
- Deguchi, T. und Yoshioka, M.**  
(1982) L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 257, 10147-10151.
- Dhaese, I., Vanneste, G., Sips, P., Buys, E., Brouckaert, P. und Lefebvre, R.A.**  
(2008) Involvement of soluble guanylate cyclase alpha(1) and alpha(2), and SK(Ca) channels in NANC relaxation of mouse distal colon, *Eur. J. Pharmacol.* 589 (1–3) 251–259.
- Dhaese, I., Vanneste, G., Sips, P., Buys, E.S., Brouckaert, P. und Lefebvre, R.A.**  
(2009) Small intestinal motility in soluble guanylate cyclase alpha(1) knockout mice. (Jejunal phenotyping of sGCalpha(1) knockout mice), *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 379 (5) 473–487.
- Diamond, J.**  
(1978) Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 327-340.
- Distler, M., Biel, M., Flockerzi, V. und Hofmann, F.**  
(1994) Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology.* 33(11): 1275-82.
- Eliasson, M.J., Blackshaw, S., Schell, M.J. und Snyder, S.H.**  
(1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7): 3396-401.
- Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B. und Schmidt, H.H.**  
(1999) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Mol Pharmacol.* 56(2): 243-53.
- Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. und Lyubarsky, A.L.**  
(1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature.* 313: 310-3.
- Flynn, T.G., de Bold, M.L. und de Bold, A.J.**  
(1983) The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 859-865.
- Foerster, J., Harteneck, C., Malkewitz, J., Schultz, G. und Koesling, D.**  
(1996) A functional heme-binding site of soluble Guanylyl-Cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur. J. Biochem.* 240: 380-6.
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. und Kleinert, H.**  
(1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 23(6 Pt 2): 1121-31.
- Förstermann, U., Boissel, J.P. und Kleinert, H.**  
(1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 12(10):773-90.
- Forte, L.R. und Currie, M.G.**  
(1995) Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *FASEB J.* 9(8):643-50.

- Friebe, A., Müllershausen, F., Smolenski, A., Walter, U., Schultz, G. und Koesling, D.**  
(1998) YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol.* 54(6): 962-7.
- Friebe, A. und Koesling, D.**  
(2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 93(2): 96-105.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. und Koesling, D.**  
(2007) Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:7699-704.
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B. und Keef, K.D.**  
(1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J. Biol. Chem.* 274, 10927-10935.
- García-Pascual, A., Sancho, M., Costa, G. und Triguero, D.**  
(2008) Interstitial cells of Cajal in the urethra are cGMP-mediated targets of nitregic neurotransmission. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295(4):F971-83.
- Garthwaite, J. und Boulton, C.L.**  
(1995) Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.*; 57: 683-706.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K. und Mayer, B.**  
(1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive Guanylyl-Cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* 48: 184-8.
- Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F. und Schlossmann, J.**  
(2004) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett.* 24;575(1-3):19-22.
- Gerzer, R., Böhme E., Hofmann, F. und Schultz, G.**  
(1981a) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.* 132, 71-74.
- Gerzer, R., Hofmann, F. und Schultz, G.**  
(1981b) Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem.* 116: 479-86.
- Gibaldi, M.**  
(1993) What is nitric oxide and why are so many people studying it. *J Clin Pharmacol* 33(6): 488-496.
- Goldberg, N.D., Dietz, S.B. und O'Toole, A.G.**  
(1969) Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem.* 244(16): 4458-66.
- Goyal R.K. und Chaudhury A.**  
(2009) Mounting evidence against the role of ICC in neurotransmission to smooth muscle in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 298: G10 - G13.
- Gyurko, R., Kuhlencordt, P., Fishman, M.C. und Huang, P.L.**  
(2000) Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278(3): 971-81.
- Gyurko, R., Leupen, S. und Huang, P.L.**  
(2002) Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility. *Endocrinology.* 143(7): 2767-74.

- Haslam, R. J., Davidson, M.M., Davies, T., Lynham, J.A. und McClenaghan, M.D.**  
(1978) Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 533-552.
- Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G. und Böhme, E.**  
(1990) Expression of soluble Guanylyl-Cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS. Lett.* 272: 221-3.
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Böhme, E. und Schultz, G.**  
(1991) Molecular cloning and expression of a new  $\alpha$ -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the  $\alpha$ -subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 292, 217-222.
- Harper, J.F. und Brooker, G.**  
(1975) Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 1, 207-218.
- He, W.Q., Peng, Y.J., Zhang, W.C., Lv, N., Tang, J., Chen, C., Zhang, C.H., Gao, S., Chen, H.Q., Zhi, G., Feil, R., Kamm, K.E., Stull, J.T., Gao, X. und Zhu, M.S.**  
(2008) Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice. *Gastroenterology.* Aug;135(2):610-20.
- Hedlund, P., Aszodi, A., Pfeifer, A., Alm, P., Hofmann, F., Ahmad, M., Fassler, R. und Andersson, K.E.**  
(2000) Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2349-54.
- Hisatsune, C., Nakamura, K., Kuroda, Y., Nakamura, T. und Mikoshiba, K.**  
(2005): Amplification of  $Ca^{2+}$  signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem*, 280, 11723-11730.
- Hofmann, F., Ammendola, A. und Schlossmann, J.**  
(2000) Rising behind NO: cGMPdependent protein kinases. *J. Cell Sci.* 113, 1671-1676.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. und Schlossmann, J.**  
(2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.* 86(1): 1-23.
- Houdebine, L.M.**  
(2007) Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol.* 360: 163-202.
- Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H. und Fishman, M.C.**  
(1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75(7): 1273-86.
- Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K.D., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G. und Böhme, E.**  
(1990) Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by anew immunoaffinity chromatographic method. *Eur. J. Biochem.* 190: 273-8
- Hunter, W.M. und Greenwood, F.C.**  
(1964) A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem J.* 91(1): 43-56.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. und Napoli, C.**  
(1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34: 879-886.
- Iino, S., Horiguchi, K. und Nojyo, Y.**  
(2008) Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience.* 18;152(2):437-48.

- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H.R., Lohmann, S.M. und Walter, U.**  
(1994) Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9426-30.
- Kuhn, M.**  
(2009) Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handb Exp Pharmacol.*; (191):47-69.
- Laemmli, U.K.**  
(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landgraf, W., Hofmann, F., Pelton, J.T. und Huggins, J.P.**  
(1990) Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism. *Biochemistry.* 23;29(42):9921-8.
- Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO, Weitzberg, E.**  
(2006) Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *N Engl J Med.* 28;355(26):2792-3.
- Lincoln, T.M., Komalavilas, P. und Cornwell, T.L.**  
(1994) Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension.* Jun;23(6 Pt 2):1141-7.
- Loesch, A. und Burnstock, G.**  
(1995) Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in coronary and pulmonary arteries of newborn rats. *Cell Tissue Res.* 279(3): 475-83.
- Lowe D.G., Chang M.S., Hellmiss R., Chen E., Singh S., Garbers D.L., Goeddel D.V.**  
(1989) Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* 8, 1377-1384.
- Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. und De Jonge, H.R.**  
(1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 307-312.
- Loscalzo, J.**  
(2001) Inducible NO Synthesis in the Vasculature: Molecular Context Defines Physiological Response. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 21:1259-1260.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., und Waldman, S.A.**  
(2000) Guanylyl cyclase and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52: 375-441.
- Mashimo, H. und Goyal, R.K.**  
(1999) Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol.* 277(4 Pt 1):G745-50.
- Mayer, B., John, M. und Böhme, E.**  
(1990) Purification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* 277, 215-219.
- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. und Koesling, D.**  
(2003) Major occurrence of the new alpha(2)beta(1) isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell. Signal.* 15, 189-195.
- Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M. und Koesling, D.**  
(2006) Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J. Clin. Invest.* 116: 1731-1737.



- Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Ohlstein, E.H., Pontecorvo, E.G., Hyman, A.L., Murad, F., Mittal, C.K., Arnold, W.P., Katsuki, S. und Kimura, H.**  
**(1978)** Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 145-158.
- Michael, S.K., Surks, H.K., Wang, Y., Zhu, Y., Blanton, R., Jamnongjit, M., Aronovitz, M., Baur, W., Ohtani, K., Wilkerson, M.K., Bonev, A.D., Nelson, M.T., Karas, R.H. und Mendelsohn, M.E.**  
**(2008)** High blood pressure arising from a defect in vascular function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May 6;105(18):6702-7.
- Moncada, S., Palmer, R.M. und Higgs, E.A.**  
**(1991)** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109–142.
- Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H.K., Fishman, M.C. und Huang, P.L.**  
**(1998)** Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J. Clin. Invest.* 101: 1225-1232.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.**  
**(1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Murad, F.**  
**(1996)** Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* 276(14): 1189-92.
- Murthy, K.S.**  
**(2006)** Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* 68: 345–374.
- Nakamura, T. und Gold, G.H.**  
**(1987)** A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature.* 325: 442-444.
- Nakane, M., Saheki, S., Kuno, T., Ishii, K. und Murad, F.**  
**(1988)** Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1139-1147.
- Nakane, M., Arai, K., Saheki, S., Kuno, T., Buechler, W. und Murad, F.**  
**(1990)** Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* 265, 16841-16845.
- Nakatani, K. und Yau, K.**  
**(1985)** Cyclic GMP opens the light-sensitive conductance in retinal rods. *Biophys. J.* 47, 365a.
- Nathan, C.F. und Hibbs, J.B.**  
**(1991)** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 3(1): 65-70.
- Nelson, R.J., Demas, G.E., Huang, P.L., Fishman, M.C., Dawson, V.L., Dawson, T.M. und Snyder, S.H.**  
**(1995)** Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature.* 378(6555): 383-6.
- Ny, L., Pfeifer, A., Aszòdi, A., Ahmad, M., Alm, P., Hedlund, P., Fässler, R. und Andersson, K.E.**  
**(2000)** Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Br J Pharmacol.* 129(2):395-401.

**Kadowitz, P.J.**

(1981) Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'- monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57, 946-955.

**Kantor, D.B., Lanzrein, M., Stary, S.J., Sandoval, G.M., Smith, W.B., Sullivan, B.M., Davidson, N. und Schuman, E.M.**

(1996) A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science*. 274(5293): 1744-8.

**Keilbach, A., Ruth, P. und Hofmann, F.**

(1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* 208: 467-73.

**Kimura, H., Mittal, C.K. und Murad, F.**

(1975) Increases in cyclic GMP levels in brain and liver with sodium azide an activator of guanylate cyclase. *Nature*. 257(5528):700-2.

**Klages, B., Brandt, U., Simon, M.I., Schultz, G. und Offermanns, S.**

(1999): Activation of G12/13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J. Cell Biol.* 144: 745-54.

**Klatt, P., Schmidt, K. und Mayer, B.**

(1992) Brain nitric oxide synthase is a hemoprotein. *Biochem. J.* 288, 15-17.

**Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M. und Moncada, S.**

(1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5159- 5162.

**Kuhn M.**

(2009) Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handb Exp Pharmacol.* (191):47-69.

**Koesling, D., Herz, J., Gausepohl, H., Niroomand, F., Hinsch, K.D., Mülsch, A., Böhme, E., Schultz, G. und Frank, R.**

(1988) The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* 239, 29-34.

**Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G. und Böhme, E.**

(1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 266, 128-132

**Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. und Hofmann, F.**

(1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17: 3045-3051.

**Rudic, R.D., Shesely, E.G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S.S. und Sessa, W.C.**

(1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* 101: 731-736.

**Russwurm, M., Wittau, N. und Koesling, D.**

(2001) Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 44647-44652

- Salmhofer, H., Neuhuber, W.L., Ruth, P., Huber, A., Russwurm, M. und Allescher, H.D.**  
(2001) Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine. Morphological evidence. *Cell Tissue Res.* ;305(3):331-40.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.**  
(1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd Edition.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Saiki, R.K., Chang, C.A., Levenson, C.H., Warren, T.C., Boehm, C.D., Kazazian, H.H. JR. und Erlich, H.A.**  
(1988) Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med.* Sep 1; 319(9):537-41
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. und Hofmann, F.**  
(2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ. Res.* 87, 825-830.
- Schmidt, H.H. und Murad, F.**  
(1991) Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 181(3): 1372-7.
- Schmidt, H.H. und Walter, U.**  
(1994) NO at work. *Cell.* 78(6): 919-25.
- Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D. und Mayer, B.**  
(1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive Guanylyl-Cyclase. *Mol. Pharmacol.* 50: 1-5.
- Schreier, B., Börner, S., Völker, K., Gambaryan, S., Schäfer, S.C., Kuhlencordt, P., Gassner, B. und Kuhn, M.**  
(2008) The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology.* 149(8):4193-9.
- Schultz, G., Schultz, K., Böhme, E. und Kreye, V.A.**  
(1978) The possible role of cyclic GMP in the action of hormones and drugs on smooth muscle tonus: Effects of exogenous cyclic GMP derivatives. *Adv. Ther. (ed. J. C. Stoclet).* Pergamon Press, Oxford, New York, pp. 113-122.
- Schultz, K., Schultz, K. und Schultz, G.**  
(1977) Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265, 750-751.
- Schulz, S., Singh, S., Bellet, R.A., Singh, G., Tubb, D.J., Chin, H. und Garbers, D.L.**  
(1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58, 1155-1162.
- Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S. und Garbers, D.L.**  
(1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell.* 30;63(5):941-8.
- Sinha, S.C. und Sprang, S.R.**  
(2006) Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 157: 105-40.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C.**  
(1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85

- Stasch, J.P., Schmidt, P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Haerter, M., Heil, M., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schramm, M., Schroeder, W., Schroder, H., Stahl, E., Steinke, W. und Wunder, F.**  
 (2002) NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol.* 136(5): 773-83.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. und Ruth, P.**  
 (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* 404, 197-201.
- Sivarao, D.V., Mashimo, H.L., Thatte, H.S. und Goyal R.K.**  
 (2001) Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS(-/-) and hypotensive in W/W(v) mutant mice. *Gastroenterology.* 2001 Jul;121(1):34-42.
- Sivarao, D.V., Mashimo, H. und Goyal, R.K.**  
 (2008) Pyloric sphincter dysfunction in nNOS-/- and W/Wv mutant mice: animal models of gastroparesis and duodenogastric reflux. *Gastroenterology.* Oct;135(4):1258-66.
- Steiner, A.L., Wehmann, R.E., Parker, C.W. und Kipnis, D.M.**  
 (1972) Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 2: 51-61.
- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F. und Nathan, C.F.**  
 (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(17): 7773-7.
- Stone, J.R. und Marletta, M.A.**  
 (1995) Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 34, 14668-74.
- Stryer, L., Hurley, J.B. und Fung, B.K.**  
 (1981) First stage of amplification in the cyclic nucleotide cascade of vision. *Curr. Top. Membr. Transp.* 15, 93-108.
- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V.**  
 (2003) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* Oct; 83(4):1325-58.
- Taxi, J.**  
 (1969) Morphological and cytochemical studies on the synapses in the autonomic nervous system. *Prog. Brain Res.* 31, 5-20.
- Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A. und Warman, M.L.**  
 (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*;29(1):52, 54.
- Tsutsui, M., Shimokawa, H., Otsuji, Y., Ueta, Y., Sasaguri, Y. und Yanagihara, N.**  
 (2009) Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J.*;73(6):986-93.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.**  
 (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- Ushio-Fukai, M., Griendling, K.K., Akers, M., Lyons, P.R. und Alexander, R.W.**  
 (1998): Temporal dispersion of activation of phospholipase C- $\beta$ 1 and - $\gamma$  isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of  $\alpha$ q/11,  $\alpha$ 12, and  $\beta$ 3 G protein subunits. *J Biol Chem,* 273, 19772-19777.

- Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Tilly, B.C., Houtsmuller, A.B., Ehlert, E.M., Bot, A.G., Edixhoven, M., Boomaars, W.E., Lohmann, S.M. und de Jonge, H.R.**  
**(1998)** Membrane targeting of cGMPdependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 1466-71.
- Van, Vliet B.N., Chafe, L.L. und Montani, J.P.**  
**(2003)** Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57Bl/6J control mice. *J Physiol.* 15;549(Pt 1):313-25.
- Vanneste, G., Dhaese, I., Sips, P., Buys, E., Brouckaert, P. und Lefebvre, R.A.**  
**(2007)** Gastric motility in soluble guanylate cyclase alpha 1 knock-out mice, *J. Physiol.* 584 (Pt. 3) 907–920.
- Wagner, C., Russwurm, M., Jager, R., Friebe, A. und Koesling, D.**  
**(2005)** Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. *J Biol Chem.* 280(18): 17687-93.
- Waldman, S.A., Rapoport, R.M. und Murad, F.**  
**(1984)** Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J. Biol. Chem.* 259, 14332-14334.
- Walter, U. und Gambaryan, S.**  
**(2004)** Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood.* 104(8): 2609.
- Wang, X., Huang, G., Luo, X., Penninger, J.M. und Muallem, S.**  
**(2004)** Role of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in Ca(2+) oscillations and adaptation of Ca(2+) signaling to reduce excitability of RGS2-/- cells. *J Biol Chem*, 279, 41642-41649.
- Ward, S.M., Morris, G., Reese, L., Wang, X.Y. und Sanders, K.M.**  
**(1998)** Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology.* ;115(2):314-29.
- Ward, S.M., Sanders, K.M. und Hirst, G.D.**  
**(2004)** Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil.* Apr;16 Suppl 1:112-7. Review.
- Ward, S.M. und Sanders, K.M.**  
**(2001)** Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec.* Jan 1;262(1):125-35. Review.
- Webb, R.C.**  
**(2003):** Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, 27, 201-206.
- Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. und Liew, F.Y.**  
**(1995)** Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375(6530): 408-11.
- Wernet, W., Flockerzi, V. und Hofmann, F.**  
**(1989)** The cDNA of the two isoforms of bovine cGMPdependent protein kinase. *FEBS. Lett.* 251: 191-6.
- Winquist, R.J., Faison, E.P., Waldman, S.A., Schwartz, K., Murad, F. und Rapoport, R.M.**  
**(1984)** Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7661-7664.

**Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horváth, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., Lemmer, B., Schütz, G., Gutkind, J.S. und Offermanns, S.**

**(2008)** G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat. Med.* 2008;14:64-8.

**Yau, K.W. und Nakatani, K.**

**(1985)** Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. *Nature.* 317: 252-255.

**Yogo, K., Shimokawa, H., Funakoshi, H., Kandabashi, T., Miyata, K., Okamoto, S., Egashira, K., Huang, P., Akaike, T. und Takeshita, A.**

**(2000)** Different vasculoprotective roles of NO synthase isoforms in vascular lesion formation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(11): 96-100.

**Yuen, P.S., Potter, L.R. und Garbers, D.L.**

**(1990)** A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 29, 10872-10878.

**Zhao, Y., Brandish, P.E., Di Valentin, M., Schelvis, J.P., Babcock, G.T. und Marletta, M.A.**

**(2000)** The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Biochemistry.* 39(35): 10848-54.

# 8

## Eigene Publikationen

### Publikationen

- Groneberg D.**, König P., Wirth A., Offermanns S., Koesling D., Friebe A.:  
Deletion of the NO receptor in smooth muscle leads to hypertension  
Hypertension based on smooth muscle-specific deletion of the NO receptor  
guanylyl cyclase. *Circulation*. 2010;121:401 - 409.
- Dangel O., Mergia E., Karlisch K., **Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
NO-sensitive guanylyl cyclase is the only NO receptor mediating platelet  
inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8:1343 - 1352.
- Groneberg D.**, König P., Koesling D., Friebe A.:  
NO-sensitive guanylyl cyclase in gastrointestinal smooth muscle is  
dispensable for nitrgic signalling and gut motility in mice. *Gastroenterology*  
2011. *In press*.

### Abstracts

- Friebe A., **Groneberg D.**, König P., Mergia E., Koesling D.:  
Impaired gastrointestinal motility in mice lacking NO-sensitive guanylyl  
cyclase. 11. NO-Forum Gemeinsame Jahrestagung der Gesellschaft für  
NO, 5. - 7.10.2006, Hamburg.
- Friebe A., **Groneberg D.**, König P., Koesling D.:  
Fiber-free diet rescues mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase from  
fatal gastrointestinal dysmotility. 48. Frühjahrstagung der deutschen  
Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und  
Toxikologie, 13. - 15.03.2007, Mainz. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of  
Pharmacology, Suppl. Vol. 375, R 102.
- Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
Verlust der NO-vermittelten NANC-Relaxation in NO-GC-defizienten  
Mäusen. 48. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle  
und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 13. - 15.03.2007, Mainz.  
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. Vol. 375, R 107.

- Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
Lack of NO-mediated NANC relaxation in mice deficient in NO-sensitive guanylyl cyclase. 3rd Internationale Conference on cGMP. Generators, Effectors and Therapeutic Implications, 15. - 17.06.2007, Dresden.
- Friebe A., **Groneberg D.**, König P., Koesling D.:  
Physiological and pathological effects of complete sGC deletion. 3rd Internationale Conference on cGMP. Generators, Effectors and Therapeutic Implications, 15. - 17.06.2007, Dresden.
- Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
VIP induces relaxation of mouse aorta mainly via NO/cGMP. 12. NO-Forum Gemeinsame Jahrestagung der Gesellschaft für NO, 4. - 6.10.2007, Mainz.
- Groneberg D.**, König P., Koesling D. Friebe A.:  
Deletion of NO-sensitive guanylyl cyclase in smooth muscle is sufficient to cause hypertension 12. NO-Forum Gemeinsame Jahrestagung der Gesellschaft für NO, 4. - 6.10.2007, Mainz.
- Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
VIP-vermittelte Relaxation der Maus Aorta verläuft über NO/cGMP 49. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11. - 13.03.2008, Mainz.
- Groneberg D.**, König P., Koesling D., Friebe A.:  
Deletion der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in der glatten Muskulatur führt zur Hypertonie. 49. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11. - 13.03.2008, Mainz.
- Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
Evaluation of ODQ as specific inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase using mice deficient for the enzyme. 5th EDHF conference, 24. - 27.06.2008, Tampere, Finland.
- Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
Deletion of NO-sensitive guanylyl cyclase in smooth muscle is sufficient to cause hypertension. 5th EDHF conference, 24. - 27.06.2008, Tampere, Finland.
- Groneberg D.**, König P., Koesling D., Friebe A.:  
The nitric oxide receptor guanylyl cyclase in gastrointestinal smooth muscle is dispensable for gastrointestinal motility and survival in mice. 50. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 10. - 12.03.2009, Mainz.
- Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
Evaluation of ODQ as specific inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase using mice deficient for the enzyme. 4th Internationale Conference on cGMP 19. - 21.06.2009, Regensburg.
- Groneberg D.**, König P., Koesling D., Friebe A.:  
NO signalling in mice lacking the NO receptor guanylyl cyclase. 4th Internationale Conference on cGMP 19. - 21.06.2009, Regensburg.



- Karlisch K., **Groneberg D.**, Koesling D., Friebe A.:  
Role of PDE3 on cGMP/cAMP crosstalk in mice deficient in NO-sensitive guanylyl cyclase. 51. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 23. - 25.03.2010, Mainz.
- Groneberg D.**, König P., Koesling D., Friebe A.:  
The NO receptor guanylyl cyclase in either gastrointestinal smooth muscle or in interstitial cells of Cajal is dispensable for motility and survival. 51. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 23. - 25.03.2010, Mainz.
- König P., **Groneberg D.**, Friebe A.:  
Pericyte cells are a major source of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in the murine lung. American thoracic society international conference 14. - 19.05.2010, New Orleans, USA.
- Groneberg D.**, König P., Saur D., Koesling D., Friebe A.:  
Two independent cGMP-mediated pathways mediate nitrgic relaxation in ICC and SMC: studies in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase. Joint International Meeting in Neurogastroenterology and Motility. 26. - 29.08.2010, Boston, USA.
- König P., **Groneberg D.**, Friebe A.:  
Nitric oxide sensitive guanylylcyclase is mainly expressed in pericytes in the murine lung 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft. 29.09. - 01.10.2010, Würzburg.
- Groneberg D.**, König P., Lies B., Friebe A.:  
Two independent cGMP-mediated pathways mediate nitrgic relaxation in ICC and SMC.  
Workshop on Smooth Muscle Function, 20.12.2010, Lübeck.
- Groneberg D.**, König P., Lies B., Friebe A.:  
Two independent cGMP-mediated pathways mediate nitrgic relaxation in ICC and SMC: Studies in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase.  
90th Annual Meeting of the German Physiological Society, 26.03.2011 - 29.03.2011, Regensburg.

### **Preise**

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Poster Preis experimentelle Pharmakologie: Lack of NO-mediated NANC relaxation in mice deficient in NO-sensitive guanylyl cyclase. 48. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 13. - 15.03.2007, Mainz.  
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. Vol. 375, R 107.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Friebe danke ich für die Ermöglichung der Erstellung meiner Doktorarbeit im Bereich der Physiologie, für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Themengebieten und für die allzeit intensive Betreuung. Durch ihn habe ich wissenschaftliches Arbeiten erst richtig erlernt. Dank auch für die Möglichkeit unsere Forschungsergebnisse auf Fachkongressen präsentieren zu können und den uneingeschränkten Zugang zur Kaffeemaschine.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Utz Fischer für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Prof. Dr. Doris Koesling möchte ich mich für die Aufnahme an ihrem Institut (Pharmakologie und Toxikologie in Bochum) und Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken.

Bei dem Team der Pharmakologie und Toxikologie in Bochum, die mich in der ersten Phase der Doktorarbeit immer unterstützt haben (Ronald Jäger, Oliver Dangel, Ulla Krabbe, Arkadius Pacha, Medah Öczan, Friedrich Eichhorst, Erika Mannheim, Corinna Russwurm und Michael Russwurm).

Bei dem neuen Team, Physiologie AG Friebe in Würzburg, für die bisherige und ganz sicher auch in Zukunft hervorragende, lustige und intensive Zusammenarbeit (Michaela Kümmel, Ronald Jäger und Barbara Lies).

Bei den restlichen Mitarbeitern der Physiologie I (Marco Abeßer, Peter Benz, Wen Chen, Beatrice Dankworth, Teresa Fasig, Doreen Fetting, Tobias Fischer, Birgit Gasner, Mirja Hünerberg, Michael Klaiber, Heike Oberwinkler, Christine Siegl, Annett Spitzl, Katharina Völker und Bärbel Zumkeller).

Mein Dank geht auch an Steffen Hampe, Jan Mührmeister, Kai Jannek für zahlreiche königsblaue Stunden.

Selbstverständlich wäre diese Arbeit nicht ohne die grenzenlose Unterstützung meiner Eltern und meines Bruders zu Stande gekommen.

Besonders danke ich Kaja Karlisch für ihre Freude, Unterstützung und unzählige schöne Stunden die da waren und noch kommen werden.