

# Untersuchung zur NO/cGMP-Signaltransduktion in der glatten Muskulatur von NO-GC-defizienten Mäusen

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



vorgelegt von  
Barbara Christiane Lies

aus Marburg

Würzburg 2013



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

---



meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die NO/cGMP- Signalkaskade	1
1.1.1 NO-Synthasen (NOS)	3
1.1.2 Stickstoffmonoxid und seine physiologischen Wirkungen	3
1.2 Guanylyl-Cyclasen (GC)	6
1.2.1 Die NO-GC und ihre Aktivatoren	6
1.3 cGMP und seine Effektoren	7
1.3.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG)	7
1.3.2 cGMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDE)	9
1.3.3 cGMP-regulierte Ionenkanäle	11
1.4 Hemmstoffe der NO-GC	11
1.4.1 ODQ	12
1.4.2 Andere Hemmstoffe	12
1.5 Gastrointestinaltrakt	14
1.5.1 Motilität des Gastrointestinaltrakts	14
1.6 Gastrointestinale Zelltypen	15
1.6.1 Glatte Muskelzellen	15
1.6.2 Interstitielle Zellen von Cajal	17
1.6.3 Fibroblasten-ähnliche Zellen	18
1.7 Zelluläre Mechanismen der Motilität	20
1.8 Unterer Harntrakt	22
1.9 Transgene Mausmodelle	23
1.8.1 KO-Mausmodelle für die NOS	23
1.8.2 KO-Mausmodelle für die NO-GC	24
1.8.3 KO-Mausmodelle für die PKG	25
1.9.4 KO-Mausmodelle für ICC	26
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1 Material	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Antikörper für Western-Blot	31
3.1.3 Antikörper für immunhistochemische Analysen	31
3.1.4 Lösungen und Puffer	31
3.3.5 Verwendete Geräte	33
3.2 Routinemethoden	33
3.2.1 Gelelektrophorese	33
3.2.2 Western-Blot	33
3.2.3 Gewinnung der Western-Blot-Proben	34

3.2.4	Immunhistochemische Analyse	34
3.2.5	Radioimmunoassay (RIA)	35
3.2.6	Messung der cGMP-Menge in Thrombozyten	36
3.3	Tiere und Präparation	36
3.3.1	Haltung und Zucht	36
3.3.2	Induktion der Knockout-Tiere durch Tamoxifen-Injektion	38
3.3.3	Genotypisierung	38
3.4	Organbad	39
3.4.1	Präparation der Gewebe für das Organbad	39
3.4.2	Äquilibrieren und pharmakologische Relaxation der Proben im Organbad	39
3.4.3	Elektrische Feldstimulation (EFS) von Fundus-Gewebe im Organbad	40
3.5	Membranpotenzialmessungen	41
3.5.1	Präparation der Gewebe für Membranpotenzialmessungen	41
3.5.2	Messungen von ‚Inhibitory junction potentials‘	41
3.6	<i>In vivo</i> -Messungen	43
3.6.1	Darmpassagezeit	43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1	Funktionen der NO-GC in Zellen des Gastrointestinaltrakts	44
4.1.1	DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen	46
4.1.2	Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen	46
4.1.3	Membranpotenzialmessungen im proximalen Colon	50
4.1.3.1	Ruhemembranpotenzial im proximalen Colon	50
4.1.3.2	‚Inhibitory junction potentials‘ in WT- und GCKO-Colon	52
4.1.3.3	‚Inhibitory junction potentials‘ in SM-, ICC- und FLC-GCKO-Colon	54
4.1.3.4	Statistische Analyse der ‚Inhibitory junction potentials‘ im Colon	54
4.1.4	<i>In vivo</i> -Messung der Darmpassagezeit	54
4.2	Verteilung und Funktion der NO-GC im unteren Harntrakt	57
4.2.1	NO-induzierte Relaxation der Urethra	57
4.2.2	8-pCPT-cGMP- und Forskolin-induzierte Relaxation der Urethra	60
4.2.3	Immunhistochemische Analyse der Urethra	60
4.2.4	Untersuchungen zur Harnblase	60
4.2.5	Relaxation von Harnblasenmuskulatur	63
4.2.6	Immunhistochemische Analyse von Harnblasenmuskulatur	63
4.3	Untersuchung von Inhibitoren der NO-GC	66
4.3.1	Inhibition der NO-GC durch ODQ in HEK-Zellen und Thrombozyten	66
4.3.2	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der NO-GC-Inhibition durch ODQ	68
4.3.3	Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ	71
4.3.4	Inhibition der NO-induzierten Relaxation des Magen-Fundus durch ODQ	71
4.3.5	Inhibition der Relaxation mittels endogen freigesetzten NOs durch ODQ	74
4.3.6	Inhibition der NO-induzierten Relaxation durch NS2028	78

<b>5. Diskussion</b>	<b>80</b>
5.1 Bedeutung der NO-GC in glatter Muskulatur des Gastrointestinaltrakts	80
5.2 Bedeutung der NO-GC in glatter Muskulatur des unteren Harntrakts	85
5.3 Untersuchung von NO-GC-Inhibitoren	88
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>7. Summary</b>	<b>93</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>9. Eigene Publikationen</b>	<b>109</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>111</b>

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abb. 1:</b>	Die NO/cGMP-Signalkaskade .....	<b>2</b>
<b>Abb. 2:</b>	NO-freisetzende Pharmaka .....	<b>5</b>
<b>Abb. 3:</b>	Aktivatoren der NO-GC .....	<b>8</b>
<b>Abb. 4:</b>	Therapeutisch eingesetzte Hemmstoffe der PDE5.....	<b>10</b>
<b>Abb. 5:</b>	Die prosthetische Häm-Gruppe sowie Häm-oxidierende Inhibitoren.....	<b>13</b>
<b>Abb. 6:</b>	Signalwege in der glatten Muskulatur.....	<b>16</b>
<b>Abb. 7:</b>	Aufbau der glatten Muskulatur im Gastrointestinaltrakt.....	<b>19</b>
<b>Abb. 8:</b>	Generierung der KO-Mausmodelle .....	<b>37</b>
<b>Abb. 9:</b>	Aufbau des Mikroelektroden-Messstandes .....	<b>42</b>
<b>Abb. 10:</b>	NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen I .....	<b>45</b>
<b>Abb. 11:</b>	NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen II .....	<b>47</b>
<b>Abb. 12:</b>	NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen III .....	<b>48</b>
<b>Abb. 13:</b>	EFS-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen .....	<b>49</b>
<b>Abb. 14:</b>	Ruhemembranpotenzial in SMC des proximalen Colons .....	<b>51</b>
<b>Abb. 15:</b>	„Inhibitory junction potentials“ in WT-Colon .....	<b>51</b>
<b>Abb. 16:</b>	„Inhibitory junction potentials“ in GCKO-Colon .....	<b>53</b>
<b>Abb. 17:</b>	„Inhibitory junction potentials“ in SM-, ICC- und FLC-GCKO-Colon .....	<b>55</b>
<b>Abb. 18:</b>	Stärke und Dauer des nitregen „Inhibitory junction potential“ .....	<b>56</b>
<b>Abb. 19:</b>	Messung der Darmpassagezeit .....	<b>56</b>
<b>Abb. 20:</b>	NO-induzierte Relaxation von Urethra-Ringen I .....	<b>58</b>
<b>Abb. 21:</b>	NO-induzierte Relaxation von Urethra-Ringen II .....	<b>59</b>
<b>Abb. 22:</b>	Relaxation der Urethra durch 8-pCPT-cGMP und Forskolin .....	<b>61</b>
<b>Abb. 23:</b>	Immunhistochemische Analyse von Urethra .....	<b>62</b>
<b>Abb. 24:</b>	Harnblasengewicht .....	<b>64</b>
<b>Abb. 25:</b>	Relaxation der Harnblasenmuskulatur .....	<b>64</b>
<b>Abb. 26:</b>	Immunhistochemische Analyse von Harnblasenmuskulatur .....	<b>65</b>
<b>Abb. 27:</b>	Inhibition der NO-GC durch ODQ in HEK-Zellen und Thrombozyten .....	<b>67</b>
<b>Abb. 28:</b>	Rolle der DEA-NO-Konzentration und ODQ-Präinkubation .....	<b>69</b>
<b>Abb. 29:</b>	Rolle der DEA-NO-Inkubationszeit .....	<b>70</b>
<b>Abb. 30:</b>	Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ I .....	<b>72</b>
<b>Abb. 31:</b>	Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ II .....	<b>73</b>
<b>Abb. 32:</b>	Inhibition der NO-induzierten Relaxation des Fundus durch ODQ.....	<b>75</b>
<b>Abb. 33:</b>	ODQ-Inhibition von nitregen Effekten in Fundus-Gewebe .....	<b>76</b>
<b>Abb. 34:</b>	ODQ-Inhibition der Effekte endogen freigesetzten NOs in Aorta .....	<b>77</b>
<b>Abb. 35:</b>	Inhibition der NO-induzierten Relaxation durch NS2028 .....	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

$\alpha$ -SMA	=	$\alpha$ -Glattmuskel-Aktin
ACD	=	Acid-Citrate-Dextrose
ANP	=	Atriales natriuretisches Peptid
BKCa-Kanal	=	Calcium-aktivierter Kaliumkanal
cAMP	=	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCh	=	Carbachol
CFTR	=	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	=	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CGS	=	Citrate glucose saline
ckit	=	Tyrosinkinase-Rezeptor Kit
CNG-Kanäle	=	cGMP-abhängige Ionenkanäle
CreER <sup>T2</sup>	=	Cre-Recombinase mit einer modifizierten Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne
DAG	=	Diacylglycerol
EDRF	=	Endothelium-derived relaxing factor
EGTA	=	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N,N</i> -tetraessigsäure
eNOS	=	Endotheliale NOS
EFS	=	Elektrische Feldstimulation
FLC	=	Fibroblasten-ähnliche Zellen
GCKO	=	Guanylyl-Cyclase Knockout
HEK	=	human embryonic kidney
HEPES	=	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IBMX	=	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICC	=	Interstitielle Zellen von Cajal
ICC-IM	=	Intramuskuläre ICC
ICC-MY	=	Myenterische ICC
IJP	=	Inhibitory junction potential
iNOS	=	Induzierbare NOS
IP <sub>3</sub>	=	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRAG	=	IP <sub>3</sub> -receptor-associated cGMP-dependent kinase-substrate
ISDN	=	Isosorbiddinitrat
ISMN	=	Isosorbidmononitrat
KH-Lösung	=	Krebs-Henseleit-Lösung
LES	=	Unterer Ösophagussphinkter (lower esophagus sphincter)
L-NAME	=	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester
LUT	=	Unterer Harntrakt (lower urinary tract)
MLC	=	Myosin-Leichtkette
MLCK	=	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	=	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
NANC	=	Nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
NO	=	Stickstoffmonoxid
NO-GC	=	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
NOS	=	NO-Synthase
nNOS	=	Neuronale NOS
PAGE	=	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	=	Phosphate buffered saline (Dulbecco's)
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	=	Phosphodiesterase
PDGFR $\alpha$	=	Platelet-derived growth factor receptor $\alpha$
PETN	=	Pentaerythryltetranitrat
pGC	=	Partikuläre Guanylyl-Cyclase
PIP <sub>2</sub>	=	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	=	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	=	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC <sub><math>\beta</math></sub>	=	Phospholipase C <sub><math>\beta</math></sub>
PRP	=	Plättchen-reiches Plasma
ODQ	=	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
RIA	=	Radioimmunoassay
ROK	=	Rho-Kinase
SDS	=	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SMC	=	Glatte Muskelzelle (smooth muscle cell)
SM-GCKO	=	Glattmuskel-spezifischer Guanylyl-Cyclase Knockout
SMMHC	=	Smooth muscle myosin heavy chain
TxA <sub>2</sub>	=	Thromboxan A <sub>2</sub>
VASP	=	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VIP	=	Vasoaktives intestinales Peptid

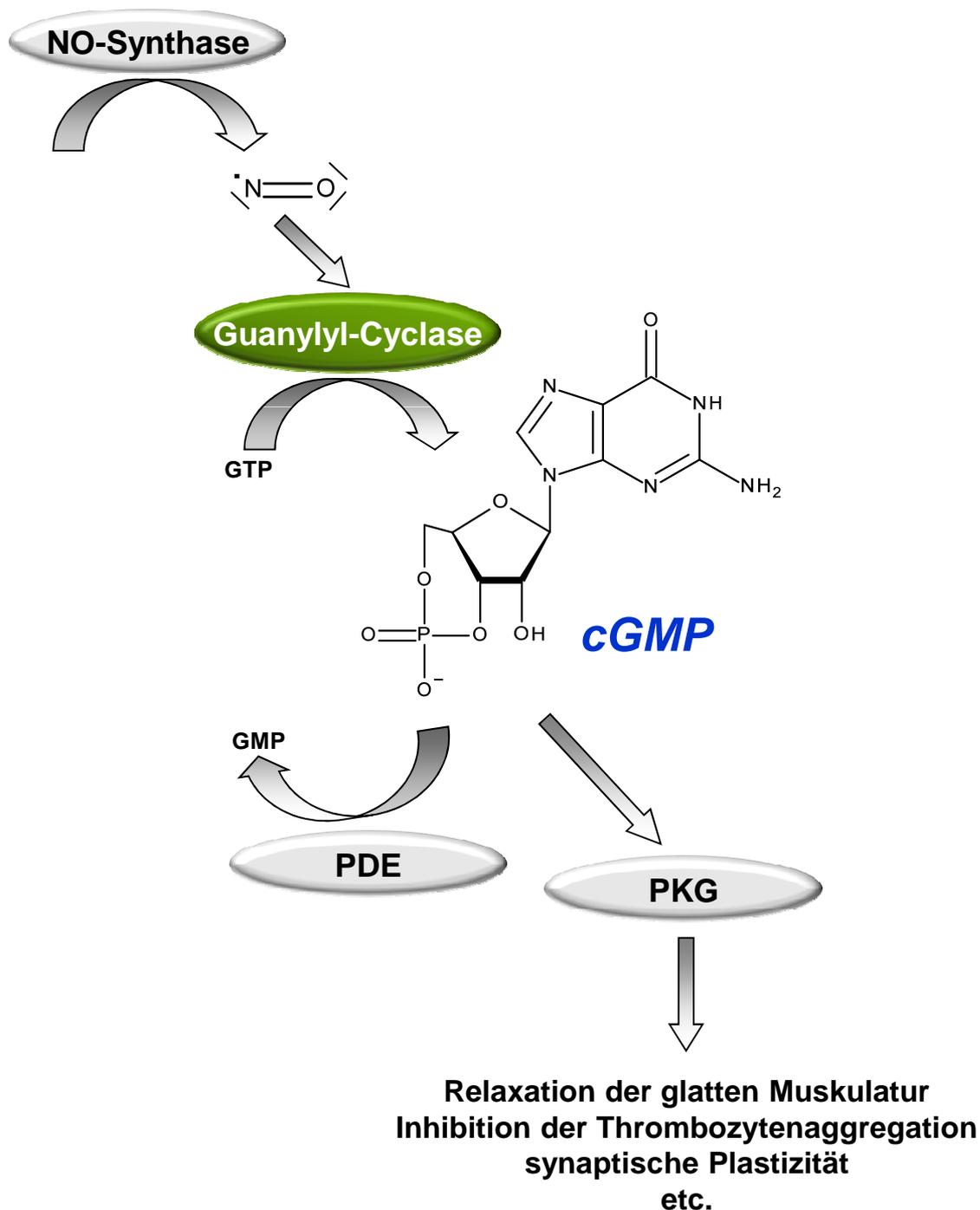


# 1. Einleitung

---

## 1.1 Die NO/cGMP-Signalkaskade

Die NO/cGMP-Signalkaskade ist an einer Vielzahl physiologischer Regulationsprozesse beteiligt. Dabei besitzt die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) eine Schlüsselfunktion als wichtigster Rezeptor für das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO; Abbildung 1). Von besonderer Bedeutung ist die NO/cGMP-Signalkaskade in der glatten Muskulatur des kardiovaskulären Systems. Bereits im Jahr 1980 wurde gezeigt, dass die Hormon-induzierte Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur von Endothelzellen abhängig ist und über eine diffundierende Substanz, genannt EDRF (endothelium-derived relaxing factor), vermittelt wird (Furchgott & Zawadzki, 1980). Im Laufe der darauffolgenden Jahre konnte bewiesen werden, dass es sich bei der Substanz EDRF um das Radikal NO handelt (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Dieses aktiviert die NO-GC, wodurch der sekundäre Botenstoff cGMP gebildet wird, der unter anderem letztendlich zu einer Gefäßrelaxation (Diamond, 1978; Schultz, 1978; Axelsson et al., 1979) sowie zu einer Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion führt (Bohme et al., 1974; Haslam et al., 1978; Mellion et al., 1981; Walter & Gambaryan, 2004). Im neuronalen System vermittelt cGMP die Modulation der synaptischen Transmission (Shibuki & Okada, 1991). Eine weitere wesentliche Rolle übernimmt die NO/cGMP-Signalkaskade im Gastrointestinaltrakt, indem sie wie im kardiovaskulären System eine Relaxation der glatten Muskulatur hervorruft (Bult et al., 1990; Moncada et al., 1991; Murthy, 2006). Sie ist damit unmittelbarer Bestandteil der viszeralen Motilität, die durch stetige Kontraktion und Relaxation des intestinalen Gewebes die Propulsion der Nahrung ermöglicht. Der Relaxationsmechanismus unterscheidet sich jedoch von dem des kardiovaskulären Systems, da die NO-GC hier nicht nur in glatten Muskelzellen, sondern in mehreren Zelltypen vorhanden ist. Eine detaillierte Darstellung bisheriger Erkenntnisse zu der Funktion der NO-GC im Gastrointestinaltrakt erfolgt in den Abschnitten 1.5 - 1.7. Auch im urogenitalen Gewebe liegt NO-GC in verschiedenen Zelltypen vor. Die Datenlage über ihre Funktion im Urogenitaltrakt ist bislang spärlich und wird in Abschnitt 1.8 näher betrachtet.



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

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch NO-Synthasen gebildet und aktiviert die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC). Dies führt zu einer vermehrten cGMP-Synthese. Der sekundäre Botenstoff cGMP aktiviert im Anschluss cGMP-Effektorproteine (z.B. die cGMP-abhängige Proteinkinase, PKG), die verschiedene physiologische Effekte hervorrufen. Phosphodiesterasen (PDE) katalysieren den Abbau des cGMPs im Gewebe.

### **1.1.1 NO-Synthasen (NOS)**

Die enzymatische Bildung von NO wird durch die Familie der NO-Synthasen katalysiert. Sie lassen sich in drei Isoformen einteilen, die als Homodimere vorliegen. Dabei handelt es sich um eine neuronale (nNOS), eine endotheliale (eNOS) und eine induzierbare Isoform (iNOS) (Förstermann et al., 1994). Sowohl nNOS als auch eNOS werden konstitutiv exprimiert und katalysieren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die Bildung von NO (Marletta, 1994). Als Ko-Faktoren sind Tetrahydrobiopterin (BH4), Flavinadeninindinukleotid (FAD), Flavinadeninmononukleotid (FMN) und Häm beteiligt. Bei der Reaktion entstehen aus der Aminosäure L-Arginin, NADPH und Sauerstoff die Substanzen NADP, Citrullin und NO (Knowles & Moncada, 1994; Marletta, 1994; Nathan & Xie, 1994). Die Lokalisation der eNOS wurde, abgesehen von Endothelzellen (Gyurko et al., 2000), unter anderem auch in Cardiomyozyten und in Nervenzellen (Kantor et al., 1996) gezeigt. Die vorwiegend im Gehirn und neuronalen Geweben vorliegende nNOS konnte auch in epithelialen Zellen (Schmidt & Walter, 1994) und Glattmuskelzellen (Loesch & Burnstock, 1995) nachgewiesen werden. Die iNOS wird hauptsächlich in Makrophagen exprimiert und produziert hohe, cytotoxische NO-Konzentrationen, wodurch sie an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt ist (Stuehr et al., 1991).

Die pharmakologische Hemmung der NOS mittels  $\text{N}^G$ -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) lag klinischen Studien zur Pharmakotherapie des septischen Schocks zu Grunde. Die Gabe des Hemmstoffs führte zu einer Dosis-abhängigen Erhöhung des Gefäßwiderstands und auch zu einem Anstieg des Blutdrucks der Patienten, wodurch der begrenzte Therapienutzen deutlich wurde. Durch Arginin-Infusionen konnten die Effekte wieder rückgängig gemacht werden (Lorente et al., 1993; Avontuur et al., 1998).

### **1.1.2 Stickstoffmonoxid und seine physiologischen Wirkungen**

NO ist ein freies Radikal und liegt unter atmosphärischen Bedingungen als Gas vor. Aufgrund seiner geringen Molekülgröße und elektrischen Neutralität hat es gute Diffusionseigenschaften und dient als intra- und interzellulärer Gasotransmitter. Die meisten physiologischen Effekte von NO sind auf die Stimulation der NO-GC zurück zu führen. Durch seine sehr kurze Halbwertszeit im Bereich weniger Sekunden (Palmer et al., 1987) übt NO vorwiegend eine lokale Wirkung aus.

Die physiologischen Funktionen von NO sind sehr vielseitig. Das in Endothelzellen gebildete NO kann in Thrombozyten diffundieren und dort über Aktivierung der NO-GC eine Hemmung der Thrombozyten-Aggregation verursachen (Moncada & Higgs, 1995). Im peripheren Nervensystem wird NO aus nitrergen Neuronen ausgeschüttet und führt

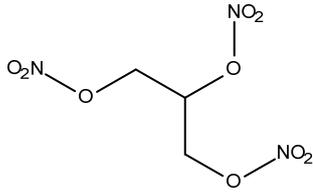
dort letztendlich zu einer Relaxation der glatten Muskulatur (Sanders et al., 1992). Eine weitere wesentliche Rolle spielt NO im Gefäßsystem, indem es zur Vasodilatation führt und somit an der Regulation des Blutdrucks (Groneberg et al., 2010), an der Durchblutung von Skelettmuskulatur sowie an der Erektion des Penis (Groneberg et al., 2012) beteiligt ist. Die gefäßdilatierende Wirkung von NO wird in der Therapie der koronaren Herzkrankheit durch Gabe von Nitrovasodilatoren genutzt. Organische Nitratester, zu denen beispielsweise Nitroglycerin, Isosorbidmononitrat (ISMN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Pentaerythryltetranitrat (PETN) gehören, sind die bekannteste Klasse der NO-Donatoren (Abbildung 2). Sie werden in der glatten Muskulatur der Gefäße enzymatisch in ihre denitrierten Metaboliten und NO gespalten (Ahlner et al., 1991; Chen et al., 2005). Eine unerwünschte Begleiterscheinung bei Dauertherapie mit Nitraten ist die rasche Entwicklung einer Toleranz, die bereits nach 24 Stunden einsetzen kann und zu einer Abschwächung der vasodilatatorischen Wirkung führt. Durch eine intermittierende Behandlung kann die Toleranzentwicklung jedoch vermieden werden. Dabei wird empfohlen, ein nitratfreies Intervall von 8 bis 12 Stunden einzuhalten. Diese Maßnahme bietet eine einfache und effektive Lösung, kann aber bei manchen Formen der Angina pectoris problematisch sein und begrenzt damit den Einsatz der Nitrate auf die Behandlung akuter anginöser Zustände (Megson & Miller, 2009). Die Mechanismen, die der Nitrattoleranz zu Grunde liegen, sind multifaktoriell und bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Parker & Gori, 2001). Systemisch spielen vermutlich neurohumorale Gegenregulationen, wie die Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems eine Rolle. Auf Zellebene steht die gesteigerte Superoxidbildung im Mittelpunkt, wodurch NO vermehrt zu Peroxynitrit reagiert (Munzel et al., 1995). Zudem wurde nachgewiesen, dass kontinuierlich hohe Nitrat-Dosen zu einer Herunterregulation von mitochondrialer Aldehyddehydrogenase, dem Nitrat-metabolisierenden Enzym, führen können; dies hätte unter anderem eine veränderte Zellatmung und Energiebereitstellung zur Folge (Chen et al., 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Problem der Nitrattoleranz, obwohl es therapeutisch gut lösbar ist, auf eine Reihe von bisher nicht bekannten Reaktionen in der Zelle hinweist. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der NO-Freisetzung und -Wirkung könnten wertvolle Erkenntnisse bringen.

Das Pharmakon Molsidomin gehört zu den Sydnomin-Derivaten, die oftmals als nicht-enzymatische NO-Donatoren bezeichnet werden. Molsidomin liegt als Prodrug vor und wird in der Leber zu seinem aktiven Metaboliten Linsidomin (SIN-1) umgesetzt. SIN-1 zerfällt spontan in Anwesenheit von Sauerstoff, wobei Superoxid und NO entstehen, die sehr schnell zu Peroxynitrit reagieren. Aus diesem Grund wird als korrekte Bezeichnung der Substanzklasse auch Peroxynitrit-Donatoren vorgeschlagen

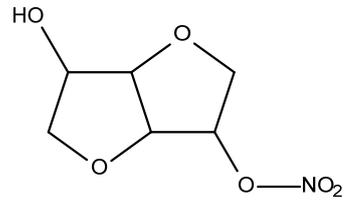
## Organische Nitratester

---

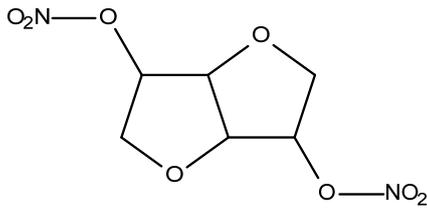
Nitroglycerin



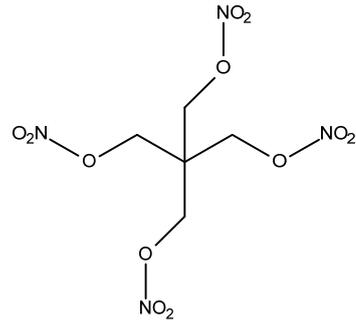
Isosorbidmononitrat (ISMN)



Isosorbiddinitrat (ISDN)



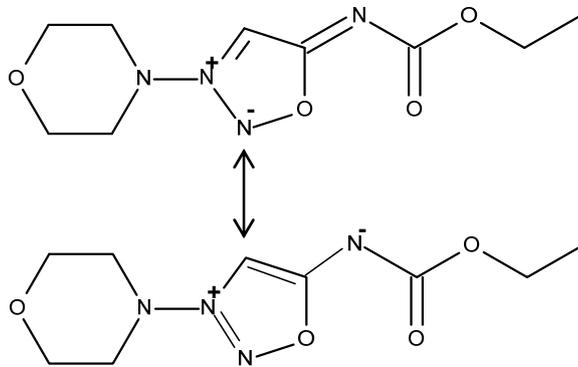
Pentaerythryltetranitrat (PETN)



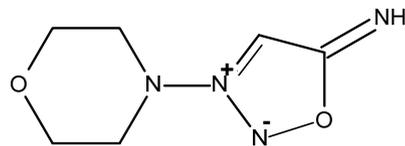
## Sydnominin-Derivate

---

Molsidomin



Linsidomin (SIN-1)



### Abb. 2: NO-freisetzende Pharmaka

Beispiele für therapeutisch eingesetzte NO-Donatoren, die enzym-vermittelt NO abgeben, sind organische Nitratester, die durch die mitochondriale Aldehyddehydrogenase aktiviert werden. Das Sydnominin-Derivat Molsidomin hingegen setzt spontan NO frei. Es wird in der Leber zu dem Metaboliten Linsidomin (SIN-1) verstoffwechselt. Aus diesem entsteht der aktive Metabolit SIN-1A, der spontan NO abgibt.

(Megson & Miller, 2009). Molsidomin weist ein ähnliches Wirkungsspektrum wie die Nitrate auf. Da die Wirkung erst ca. 20 Minuten nach Applikation eintritt, wird es nur zur Angina-pectoris-Prophylaxe und nicht zur Anfallskupierung eingesetzt.

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

Die Guanylyl-Cyclasen bilden eine Familie von Enzymen, die die Umsetzung von GTP zu cGMP katalysieren. Sie können unterteilt werden in die NO-sensitive Form der GC (NO-GC), die durch Bindung des Botenstoffs NO aktiviert wird (Schultz & Schultz, 1977; Böhme et al., 1978; Murad et al., 1978), sowie in die Peptid-aktivierte Form der GC (pGC), die durch natriuretische Peptide stimuliert wird (Waldman et al., 1984; Winquist et al., 1984). Die NO-GC wurde auch als „lösliche“ oder „cytosolische“ GC bezeichnet, um sie von der membranständigen pGC zu unterscheiden. Da sie jedoch mittlerweile auch Plasmamembran-assoziiert nachgewiesen werden konnte (Russwurm et al., 2001), wird die Einteilung in „cytosolisch“ und „membrangebunden“ nicht mehr getroffen. Da im Rahmen dieser Arbeit die NO-GC untersucht wurde, soll im Folgenden eine nähere Beschreibung dieses Enzyms erfolgen.

### **1.2.1 Die NO-GC und ihre Aktivatoren**

Die NO-GC ist der wichtigste Rezeptor für das Signalmolekül NO. Sie liegt als Heterodimer bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit vor, die eine prosthetische Häm-Gruppe binden. Die Primärstruktur zeigt eine Einteilung der Untereinheiten in drei Domänen: eine C-terminale katalytische Domäne, einen zentralen Teil und eine N-terminale Region. Die N-terminale Region beinhaltet die Häm-bindende Domäne. Für die Aktivierbarkeit des Enzyms ist die Häm-Gruppe zwingend notwendig (Friebe & Koesling, 2003). Im Gegensatz zu anderen Häm-Proteinen, wie Hämoglobin oder Myoglobin, besitzt die NO-GC eine höhere Affinität zu NO als zu Sauerstoff (Gerzer et al., 1981a). NO bindet dabei direkt an die prosthetische Häm-Gruppe und bildet einen Eisen-Nitrosyl-Komplex. Auch Kohlenmonoxid (CO) ist in der Lage, an das Häm der NO-GC zu binden, führt aber lediglich zu einer 4-fachen Aktivierung des gereinigten Enzyms, während NO eine 100- bis 200-fache Aktivierung bewirkt (Gerzer et al., 1981b).

Untersuchungen zur Struktur der NO-GC zeigten mehrere Isoformen mit verschiedenen zusammengesetzten Untereinheiten. Die am häufigsten vorkommende Isoform ist die Kombination aus  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit, die zuerst aus Ratten- und Rinderlunge aufgereinigt werden konnte (Koesling et al., 1988; Nakane et al., 1988). Der  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform wird eine mögliche Rolle bei der synaptischen Transmission zugeschrieben, da

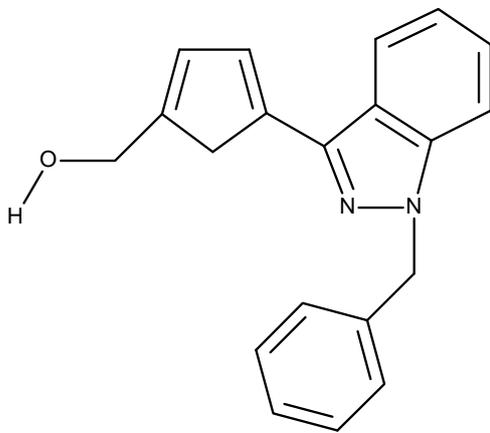
sie vorwiegend im Gehirn exprimiert wird (Burette et al., 2002). Gleichwohl findet hier aber auch die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit statt, die abgesehen vom Gehirn, in allen anderen Geweben stärker als die  $\alpha_2$ -Untereinheit exprimiert wird (Mergia et al., 2003). Aufgrund ihrer herausragenden Rolle als Rezeptor für NO bietet die NO-GC einen zentralen Angriffspunkt für Arzneistoffe. Neben der bekannten NO/Häm-vermittelten Stimulation der NO-GC durch Nitrovasodilatoren (s.o.), sind zwei weitere neue Aktivierungsmechanismen entdeckt worden, die pharmakotherapeutisches Potenzial aufweisen. Durch NO-Sensibilisierung der NO-GC führt die Substanz YC-1, ein Benzylindazol-Abkömmling, zu einer gesteigerten NO-Antwort (Friebe et al., 1996; Friebe & Koesling, 1998). Eine NO-unabhängige Aktivierung wird durch den Stoff BAY 58-2667, eine lipophile Aminodicarbonsäure, hervorgerufen, die besonders stark an Häm-freier NO-GC sichtbar wird. Sowohl YC-1 als auch BAY 58-2667 (Abbildung 3) weisen nutzbare pharmakologische Wirkungen wie Vasodilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation auf (Stasch et al., 2002). Bei kardiovaskulären Erkrankungen könnten diese Substanzen und ihre Derivate daher neue Ansätze in der Pharmakotherapie bieten.

### **1.3 cGMP und seine Effektoren**

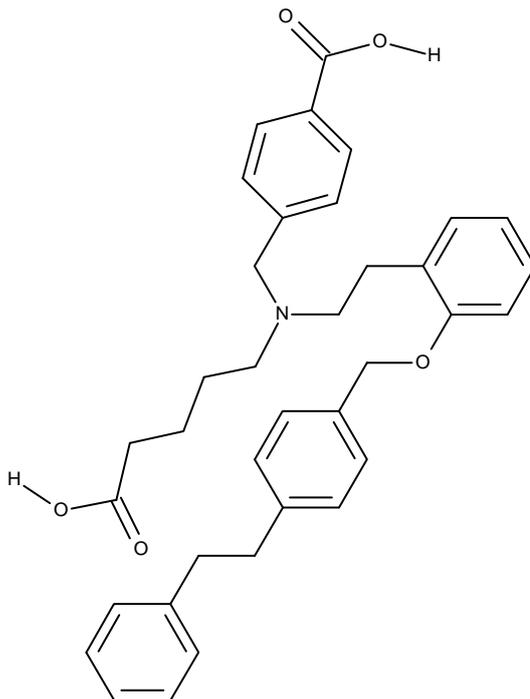
Nachdem 1957 Earl Wilbur Sutherland das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) entdeckt hatte, wurde nach weiteren cyclischen Nukleotiden gesucht, die als sekundäre Botenstoffe in Frage kamen. cGMP wurde 1963 erstmals im Rattenurin (Ashman et al., 1963) und später in vielen Säugetiergeweben nachgewiesen (Goldberg et al., 1969). Das von Guanylyl-Cyclasen gebildete cGMP aktiviert mehrere Effektorproteine, auf die im Folgenden eingegangen werden soll, und vermittelt so das extrazelluläre Signal (Lucas et al., 2000).

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

Die PKG gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Durch Bindung von cGMP wird sie aktiviert und katalysiert die Übertragung eines Phosphat-Restes auf Aminosäureseitenketten des jeweiligen Zielproteins. Funktionell lässt sich die PKG in die N-terminale, die regulatorische und die katalytische Domäne unterteilen. cGMP bindet dabei an zwei Bindungsstellen, die in der regulatorischen Domäne lokalisiert sind, und nach Bindung zu einer veränderten Sekundärstruktur des Enzyms führen (Landgraf et al., 1990). Bisher sind zwei Isoformen der PKG bekannt, die als PKGI (Wernet et al., 1989) und PKGII (Jarchau et al., 1994) bezeichnet werden.



YC-1



Bay 58-2667

**Abb. 3: Aktivatoren der NO-GC**

YC-1 und BAY 58-2667 sind Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, die die cGMP-Produktion unabhängig von NO steigern. YC-1 potenziert die stimulierende Wirkung von NO und fungiert somit als "NO-Sensitizer". BAY 58-2667 aktiviert bevorzugt die Häm-freie Form des Enzyms.

Die cytosolisch vorliegende PKGI besteht aus zwei Spleißvarianten, PKGI $\alpha$  und PKGI $\beta$ , die Variationen in der N-terminalen Domäne aufweisen und dadurch bedingt unterschiedliche Affinitäten für cGMP besitzen. Vorherrschend wird die PKGI in Thrombozyten und glatter Muskulatur exprimiert (Keilbach et al., 1992). Damit ist auch die der PKG zugeschriebenen Rolle als wichtigster Effektor für cGMP im kardiovaskulären System zu erklären (Lincoln & Cornwell, 1993; Francis & Corbin, 1999). Als Haupteffektor der NO/cGMP-Kaskade vermittelt sie in Thrombozyten eine Hemmung der Aggregation und bedingt in der glatten Muskulatur eine Relaxation.

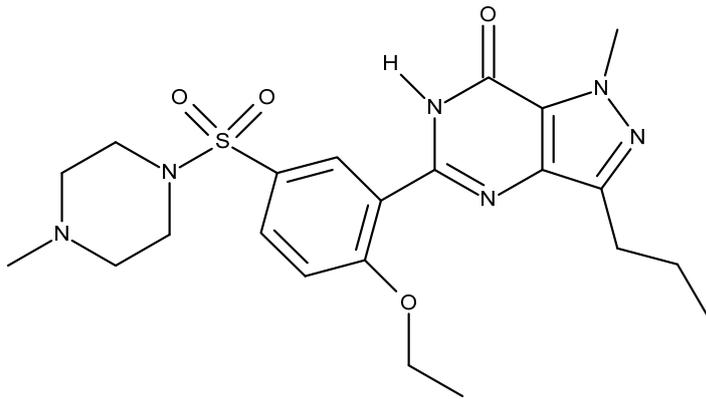
Die Expression der membrangebundenen PKGII findet vorwiegend im Gehirn, in gastrointestinaler Mukosa, der Niere, Chondrozyten und der Lunge (Lohmann et al., 1997) statt. Als wichtiges Effektorprotein der PKGII ist der CFTR-Kanal (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) hervorzuheben, der durch Phosphorylierung in der Aktivität moduliert wird. Er ist wesentlich am Salz- und Flüssigkeitstransport vieler epithelialer Gewebe beteiligt und spielt somit auch eine zentrale Rolle bei Sekretionsprozessen im Gastrointestinaltrakt (Vaandrager et al., 1998).

### **1.3.2 cGMP-regulierte Phosphodiesterasen**

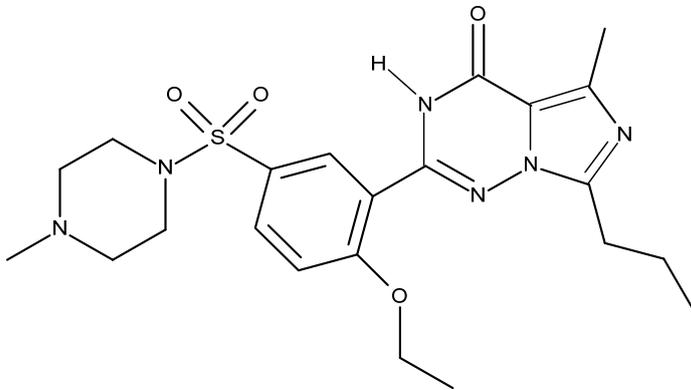
Der Abbau der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP wird durch Phosphodiesterasen (PDE) reguliert. Neben der Aktivität der NO-Synthasen und der Guanylyl-Cyclasen ist die Aktivität der PDE entscheidend an der Modulation des cGMP-Spiegels beteiligt. Mechanistisch betrachtet katalysieren PDE selektiv die Hydrolyse der Phosphodiester-Bindung zwischen der 3'-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe, wobei die Nukleotide AMP und GMP entstehen.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind elf PDE-Familien bekannt, die unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen und infolge dessen in drei Gruppen eingeteilt werden können: cAMP-spezifische PDE-Familien, cGMP-spezifische PDE-Familien und PDE mit gemischter Spezifität (Francis et al., 2001; Bender & Beavo, 2006).

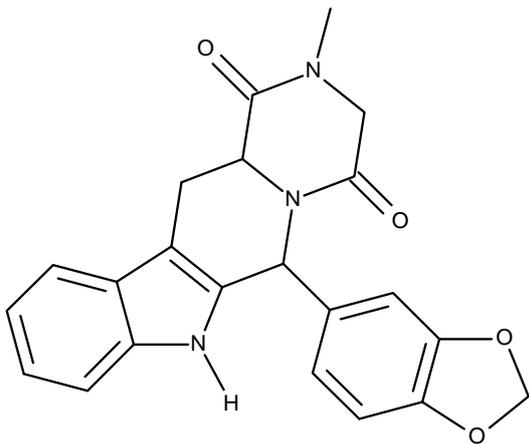
Eine hohe cGMP-Spezifität weisen PDE5, PDE6 und PDE9 auf, wobei die PDE5 zur Gruppe der cGMP-bindenden, cGMP-spaltenden PDE gehört. Die PDE5 wurde durch die Entdeckung ihrer regulatorischen Funktion von vaskulärem Glattmuskeltonus bekannt und ist mittlerweile zum gezielten Angriffspunkt in der Pharmakotherapie geworden (Bender & Beavo, 2006). Der Einsatz von PDE5-Hemmstoffen wie Sildenafil und seinen Analoga Vardenafil und Tadalafil (Abbildung 4) findet vor allem in der Behandlung von erektiler Dysfunktion und pulmonaler Hypertonie statt. Durch Blockade der PDE5 wird der intrazelluläre cGMP-Spiegel erhöht und damit der Effekt des endogenen Vasodilatators NO potenziert. Eine vergleichende Betrachtung der PDE5-Inhibitoren lässt erkennen, dass Sildenafil und Vardenafil ein sehr ähnliches



Sildenafil



Vardenafil



Tadalafil

**Abb. 4: Therapeutisch eingesetzte Hemmstoffe der PDE5**

Durch Inhibition der PDE5 führen die Wirkstoffe Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil zu einem verminderten cGMP-Abbau und damit zu erhöhten cGMP-Spiegeln, was eine Relaxation der glatten Muskulatur bewirkt. Da die PDE5 im Corpus cavernosum wesentlich für den Abbau des cGMP verantwortlich ist, werden die PDE5-Hemmstoffe bei erektiler Dysfunktion eingesetzt.

pharmakodynamisches und -kinetisches Profil besitzen. Vardenafil inhibiert allerdings weniger potent die PDE6, die den Phototransduktionsprozess der Retina reguliert, und führt daher seltener zu der damit assoziierten Nebenwirkung der Farbsehstörung. Da diese Nebenwirkung jedoch relativ selten auftritt, ist Sildenafil, insbesondere dank seines bekannten Sicherheits- und Verträglichkeitsprofils, das Mittel der Wahl (Doggrell, 2005). Unter Tadalafil-Einnahme wurden bisher ebenfalls keine Störungen des Farbsehens berichtet. Der größte Unterschied zu Sildenafil und Vardenafil aber liegt in seiner deutlich längeren Eliminationshalbwertszeit (Doggrell, 2005). Sie beträgt bei Tadalafil 17 Stunden, bei Sildenafil und Vardenafil lediglich 3 bis 5 Stunden.

### **1.3.3 cGMP-regulierte Ionenkanäle**

Eine weitere Möglichkeit der cGMP-gesteuerten Signalvermittlung liegt in der direkten Aktivierung von Ionenkanälen, die erstmals 1985 von Fesenko et al. in Photorezeptorzellen der Retina gezeigt wurde. Diese cyclisch Nukleotid-gesteuerten nicht-selektiven Kationen-Kanäle (CNG-Kanäle; cyclic nucleotide-gated channels) liegen allerdings auch in anderen Geweben vor, wie beispielsweise im Darmepithel, in Hoden, Niere, Gehirn und Herz (Biel et al., 1994; Distler et al., 1994). Aktivierung der Kanäle durch intrazelluläres cGMP ermöglicht den Einstrom von Calcium- und Natrium-Ionen in die Zelle, die als sogenannte „tertiäre Botenstoffe“ Folgekaskaden induzieren (Biel et al., 1999).

## **1.4 Hemmstoffe der NO-GC**

Um die NO/cGMP-Signalkaskade näher zu untersuchen, finden standardmäßig spezifische NO-GC-Inhibitoren Verwendung, die die NO-induzierte cGMP-Synthese hemmen. Interessanterweise ist es möglich, trotz der Gegenwart von NO-GC-Inhibitoren, unter bestimmten Bedingungen NO-induzierte Effekte zu zeigen. Aus diesem Grund werden NO-GC-Inhibitoren im Allgemeinen dazu verwendet, cGMP-abhängige und -unabhängige Effekte nachzuweisen. Diese cGMP-unabhängigen Effekte wurden unter anderem der S-Nitrosylierung, S-Glutathionylierung und Tyrosin-Nitrierung zugeschrieben; es gibt jedoch auch Studien, in denen kein schlüssiger Mechanismus für eine cGMP-unabhängige Reaktion infolge einer NO-Stimulation nachgewiesen werden konnte (Marcondes et al., 2006; Lima et al., 2010; Martinez-Ruiz et al., 2011; Hess & Stamler, 2012; Meng et al., 2012).

### 1.4.1 ODQ

Insbesondere der NO-GC-Hemmstoff ODQ, ein Chinoxalin-Derivat, wird häufig eingesetzt, um NO-GC-vermittelte Reaktionen zu blockieren (Abbildung 5). Es konnte gezeigt werden, dass ODQ ein potenter und selektiver Inhibitor der NO-GC ist, der nicht zur Inhibition der membranständigen GC oder der Adenylyl-Cyclase führt (Garthwaite et al., 1995). Diese Eigenschaften haben ODQ die Rolle des am häufigsten eingesetzten NO-GC-Inhibitors zugetragen.

Mit Hilfe von aufgereinigter NO-GC konnte gezeigt werden, dass der Inhibitionsmechanismus von ODQ auf die NO-kompetitive Bindung an die prosthetische Häm-Gruppe der NO-GC zurück zu führen ist. Spektralanalysen belegten, dass ODQ durch Oxidation des Häm-gebundenen Eisens die Hemmung verursacht (Schrammel et al., 1996; Zhao et al., 2000). Dieses Ergebnis wurde auch bestätigt durch die Tatsache, dass ODQ eine Stimulation der NO-GC durch Eisen-freies Protoporphyrin IX nicht inhibiert (Koesling & Friebe, 1999).

In vitro-Studien zeigten, dass ODQ eine irreversible Hemmung des stimulierten Enzyms bewirkt. Die  $IC_{50}$  lag dabei zwischen 0,2 und 0,7  $\mu$ M abhängig von der eingesetzten NO-Donator-Konzentration (Schrammel et al., 1996). Dementsprechend ist zu erwarten, dass der Einsatz von 10  $\mu$ M ODQ eine nahezu vollständige Inhibition der NO-GC hervorruft.

### 1.4.2 Andere Hemmstoffe

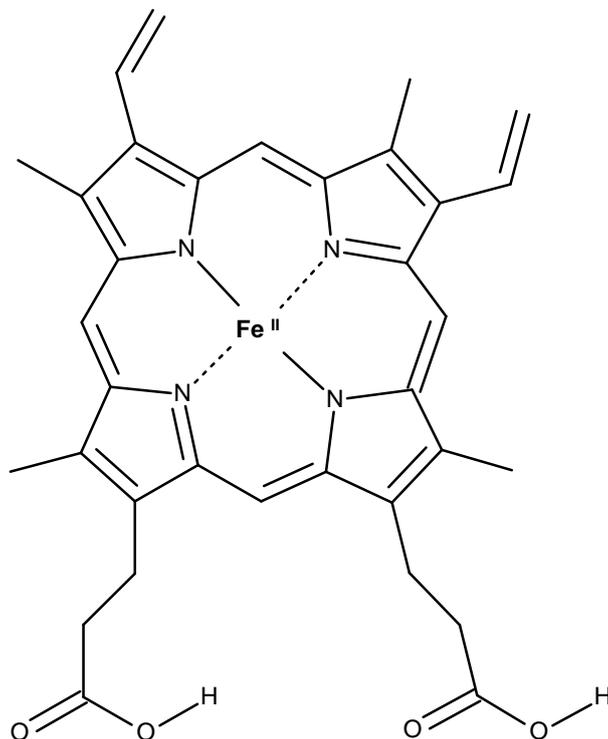
NS2028, ein Analogon von ODQ, hat sich ebenfalls in der Praxis bewährt (Abbildung 5). Mit einer  $IC_{50}$  von 0,2  $\mu$ M zeigt es eine ähnliche inhibitorische Fähigkeit wie ODQ und wird daher ebenfalls in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zur NO-GC-Hemmung eingesetzt (Olesen et al., 1998).

Weitere Inhibitoren der NO-GC wie Methylenblau oder LY-83583 weisen eine geringere Spezifität als ODQ auf und inhibieren beispielsweise olfaktorische CNG-Kanäle (Leinders-Zufall & Zufall, 1995) oder beeinträchtigen die Bildung und Freisetzung von NO durch NO-Synthasen (Mülsch et al., 1988; Mayer et al., 1993). Vor diesem Hintergrund sind ODQ oder NS2028 zur spezifischen NO-GC-Hemmung anderen Inhibitoren vorzuziehen.

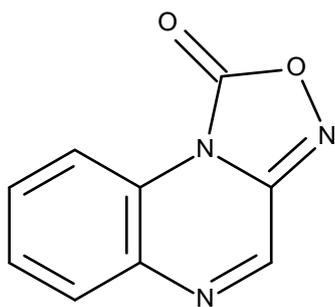
## Die prosthetische Häm-Gruppe sowie Häm-oxidierende Inhibitoren

---

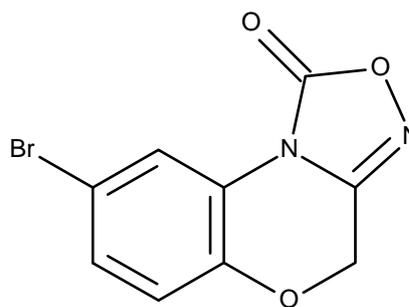
Häm



ODQ



NS2028



**Abb. 5: Die prosthetische Häm-Gruppe sowie Häm-oxidierende Inhibitoren**

Die Chinoxalin-Derivate ODQ und NS2028 werden als spezifische Inhibitoren der NO-GC eingesetzt. Der Mechanismus beruht *in vitro* auf einer irreversiblen NO-kompetitiven Hemmung durch Bindung an die prosthetische Häm-Gruppe der NO-GC und Oxidation des Häm-gebundenen Eisens.

## **1.5 Gastrointestinaltrakt**

Der Gastrointestinaltrakt stellt den größten Teil des Verdauungsapparates dar, der von der Mundhöhle bis zum Anus reicht. Er wird in Magen, Dünndarm, Dickdarm und Anus eingeteilt.

Nach der Aufnahme und Zerkleinerung der Nahrung in der Mundhöhle wird der durch Speichel gleitfähig gemachte Nahrungsbrei über die Speiseröhre in den Magen transportiert, in dem Protein- und Fettverdauung beginnen. Im Dünndarm setzt sich die Verdauung durch Ausschüttung von Enzymen und Hydrogencarbonat aus der Bauchspeicheldrüse sowie von Gallenflüssigkeit fort. Daraufhin werden die freigesetzten Nährstoffe resorbiert. Wasser und Elektrolyte werden sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm aufgenommen. Darüber hinaus übernimmt der Gastrointestinaltrakt eine wesentliche Rolle bei der Ausscheidung unverdaulicher Nahrungsmittelbestandteile und potenziell schädlicher Stoffe. Er ist neben der Niere das wichtigste Ausscheidungsorgan des Körpers.

Zusätzlich ist der Gastrointestinaltrakt Teil des körpereigenen Abwehrsystems, wobei vorwiegend nicht immunologische Mechanismen eine Rolle spielen. So können Erreger beispielsweise durch die Magensäure abgetötet werden. Im Darm wird das Eindringen von Erregern in den Organismus durch einen Schleimfilm und die Epithelzellbarriere erschwert. Zudem führt letztendlich die Peristaltik zum Abtransport von Erregern und zur Ausscheidung mit dem Stuhl.

### **1.5.1 Motilität des Gastrointestinaltrakts**

Die gastrointestinale Motilität kann in Magen- und Darmmotilität unterteilt werden. Funktion der Magenmotilität ist es, die Nahrung zu durchmischen, zu zerkleinern und weiter zu transportieren. Der proximale Magen (Fundus und ein Drittel Korpus) übernimmt überwiegend eine Speicherfunktion, während der distale Magen (zwei Drittel von Korpus und Antrum) Durchmischung, Zerkleinerung und Weitertransport reguliert. Die Darmmotilität wird in zwei Phasen eingeteilt: die digestive Phase, die auch als postprandial bezeichnet wird, sowie die interdigestive Phase. In der digestiven Phase finden Segmentationen statt, die zur Durchmischung der Nahrung führen und dadurch sowohl Verdauung als auch Resorption erleichtern. Zusätzlich fördern Pendelbewegungen den Kontakt des Chymus mit der Schleimhaut. Durch propulsive Bewegungen wird der Chymus in Richtung des Anus transportiert, um letztendlich die nichtverdaulichen Bestandteile auszuschleiden. Um Chymus in einem bestimmten Bereich eine Zeitlang speichern zu können, verhindern Sphinkteren den Weitertransport. Der davorliegende Bereich relaxiert dabei, um den Inhalt ohne zu starken Druckanstieg fassen zu können; dieses Phänomen wird auch Akkommodation

genannt. In der interdigestiven Phase werden unverwertbare Nahrungsreste sowie gastrointestinale Sekrete durch die Peristaltik abtransportiert, wodurch die Bakterienvermehrung im Dünndarm unter Kontrolle gehalten wird. In Intervallen von 30 bis 120 Minuten wandern dabei rhythmische Kontraktionen, die als „migrating motor complex“ bezeichnet werden, vom Magen bis zum Colon (Deloose et al., 2012).

## 1.6 Gastrointestinale Zelltypen

Auf Zellebene wird die Motilität des Gastrointestinaltraktes wesentlich durch Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur gesteuert. Neben den glatten Muskelzellen gibt es noch zwei weitere Zelltypen, die mit der gastrointestinalen Motilität in Zusammenhang gebracht werden; dabei handelt es sich um interstitielle Zellen von Cajal (ICC) und Fibroblasten-ähnliche Zellen (FLC). Alle drei Zelltypen exprimieren NO-GC, die die nitrege Relaxation vermittelt (Iino et al., 2008; Groneberg et al., 2011). Die Beteiligung von ICC und FLC an der inhibitorischen Neurotransmission und im Besonderen am nitregeren Relaxationsmechanismus wird zurzeit jedoch noch kontrovers diskutiert (Sivarao et al., 2001; Goyal & Chaudhury, 2010).

### 1.6.1 Glatte Muskelzellen

Glatte Muskelzellen (SMC) sind größtenteils langgestreckte spindelförmige Zellen, die in der Regel Bündel von parallel ausgerichteten Zellen bilden. Diese Glattmuskelbündel sind nicht willkürlich steuerbar und kommen beispielsweise in Darm, Blase sowie Blut- und Lymphgefäßen vor. Durch Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und/oder der Aktivierung der Rho-Kinase in SMC, kommt es zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, die durch NO inhibiert werden kann. Wie in Abbildung 6 gezeigt, kann durch Bindung von Liganden (z.B. Endothelin und Histamin) an Gq-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine Kontraktion der glatten Muskulatur ausgelöst werden. Grund dafür ist eine Konformationsänderung der Rezeptoren, die zu einer Aktivierung der Phospholipase  $\text{C}_\beta$  ( $\text{PLC}_\beta$ ) führt (Ushio-Fukai et al., 1998; Wang et al., 2004). Diese spaltet das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG).  $\text{IP}_3$  kann daraufhin den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor, der ein  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Ionenkanal ist, aktivieren und induziert somit einen vermehrten Ausstrom von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol (Bootman et al., 2002; Hisatsune et al., 2005). Calcium-Ionen bilden im Folgenden einen Komplex mit Calmodulin, der die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) aktiviert. Diese phosphoryliert die Myosin-Leichtkette (MLC) (Somlyo & Somlyo, 2003) und ermöglicht so eine Interaktion von Aktin und Myosin, die letztendlich die Kontraktion bedingt (Webb, 2003). Zusätzlich zu diesem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Weg gibt es auch eine



Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Kaskade, die zur MLC-Phosphorylierung und damit zur Kontraktion führt (Klages et al., 1999). Bei diesem Weg aktivieren Hormone, wie beispielsweise Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) G-Proteine der G<sub>12/13</sub>-Familie und stimulieren somit die kleine GTPase RhoA, die infolgedessen die Rho-Kinase (ROK) aktiviert (Somlyo & Somlyo, 2003). ROK kann daraufhin die MLCP phosphorylieren, wodurch das Enzym inaktiviert wird. Das führt zum Anstieg des phosphorylierten Myosins und somit zu einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kontraktion.

Die Relaxation der glatten Muskulatur wird durch die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP ausgelöst. cAMP aktiviert dabei die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die die Inhibition der MLCK vermittelt und auf diesem Weg zu einer verminderten MLC-Phosphorylierung führt. cGMP stimuliert, wie bereits in Abschnitt 1.3.1 erwähnt, die PKGI. Diese kann über mehrere Mechanismen eine Relaxation herbeiführen. Zum einen phosphoryliert die PKGI die MLCP, was eine Dephosphorylierung der MLC zur Folge hat, und damit die Aktin-Myosin-Interaktion reduziert. Zum anderen ist für die Spleißvariante PKGI<sub>β</sub> bekannt, das Protein IRAG (IP<sub>3</sub>-receptor-associated cGMP-dependent kinase-substrate) zu phosphorylieren, was in einer Hemmung der IP<sub>3</sub>-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum resultiert (Schlossmann et al., 2000). Einen dritten Mechanismus stellt die Phosphorylierung des Calcium-aktivierten Kaliumkanals (BK<sub>Ca</sub>-Kanal) dar. Diese erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, was einen vermehrten K<sup>+</sup>-Ausstrom und folglich eine Hyperpolarisation der Zellmembran bedingt. Durch die Hyperpolarisation kommt es zur Hemmung spannungsabhängiger L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, wodurch der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom verringert wird und infolgedessen eine Relaxation zustande kommt (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999; Sausbier et al., 2000).

### **1.6.2 Interstitielle Zellen von Cajal**

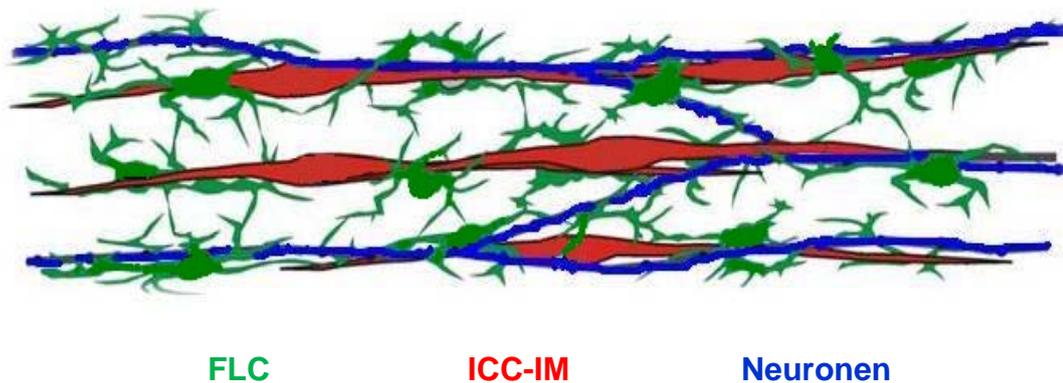
Der Namensgeber der Interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) Santiago Ramón y Cajal beschrieb diese Zellen erstmals Ende des 19. Jahrhunderts und postulierte zunächst, es seien Neuronen, die an der enterischen Signaltransduktion beteiligt sind (Cajal, 1893; Garcia-Lopez et al., 2009). Das Verständnis über die Funktion von ICC wuchs rasch mit der Entdeckung der Expression von ckit, einem Proto-Onkogen, das für den Tyrosinkinase-Rezeptor Kit kodiert (Ward et al., 1994; Huizinga et al., 1995; Torihashi et al., 1995). Mit Hilfe von Antikörpern gegen ckit konnten ICC in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Immunhistochemische Bilder haben dazu beigetragen, dass ihre Struktur aufgeklärt werden konnte und aufgrund ihrer Anatomie und Lokalisation eine Einteilung in verschiedene Kategorien stattgefunden hat. Intramuskuläre ICC (ICC-IM) liegen entlang von Nervenbündeln in der zirkulären und

longitudinalen Muskulatur. ‚Deep muscular plexus‘ ICC (DMP-ICC) befinden sich in der zirkulären Muskelschicht und sind spezialisierte ICC-IM, die im Dünndarm vorkommen und eng mit dem ‚deep muscular plexus‘ assoziiert sind. Myenterische ICC (ICC-MY) haben eine multipolare Form mit vielen Fortsätzen und befinden sich in der Schicht des Plexus myentericus (Iino et al., 2011). Jede dieser Subgruppen erfüllt unterschiedliche Aufgaben. So fungieren ICC-MY beispielsweise als Schrittmacher in verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltraktes und ICC-IM werden mit der enterischen Neurotransmission in Verbindung gebracht (Garcia-Lopez et al., 2009). In dieser Arbeit stehen die ICC-IM im Mittelpunkt der Untersuchungen, daher werden diese im Folgenden näher beschrieben.

ICC-IM sind bipolare, spindelförmige nicht-glattmuskuläre Zellen, die in der Tunica muscularis des Gastrointestinaltrakts vorkommen. Sie sind mesenchymalen Ursprungs und nehmen eine Vermittlerfunktion in der enterischen Neurotransmission ein (Taxi, 1969; Thuneberg, 1982; Burns et al., 1996; Ward & Sanders, 2001). In der Regel liegen sie in direkter Nachbarschaft von exzitatorischen oder inhibitorischen Neuronen. Durch gap junctions sind sie untereinander gekoppelt und formen ein Netzwerk zwischen Nervenendigungen und glatten Muskelzellen in der Tunica muscularis aus (Komuro, 1999; Horiguchi et al., 2003). Es existieren ebenfalls gap junctions zwischen ICC und Glattmuskelzellen, die eine elektrische Verbindung mit niedrigem Widerstand und damit ein Synzytium zwischen ICC und Glattmuskelzellen schaffen (Daniel et al., 1998). Untersuchungen zeigten, dass neben Glattmuskelzellen auch ICC-IM als Ziel der nitrergen Relaxation in Frage kommen (Burns et al., 1996; Ward et al., 1998). Grundlegend dafür ist auch das Vorliegen von Proteinen der nitrergen Signaltransduktion in ICC. So wurde beispielsweise eine starke Expression von NO-GC und PKGI in ICC nachgewiesen (Iino et al., 2009b; Groneberg et al., 2011). Zudem sind ICC zumeist eng mit nNOS-positiven Nerven-Varikositäten assoziiert (Salmhofer et al., 2001), was einen weiteren Hinweis auf ihre Rolle in der nitrergen inhibitorischen Neurotransmission darstellt.

### **1.6.3 Fibroblasten-ähnliche Zellen**

Neben den ICC wurden Fibroblasten-ähnliche Zellen (FLC) identifiziert, die in vielen glattmuskulären Geweben vorkommen und deren Verteilung der von ICC ähnlich ist. Sie sind unter anderem Teil der Tunica muscularis des Gastrointestinaltrakts und befinden sich in engem Kontakt zu Nervenzellen. Vorwiegend zeigen sie einen parallelen Verlauf zu ICC und Glattmuskelzellen (Abbildung 7). Ihre Zellmorphologie ist daher meist langgestreckt, aber zeigt im Gegensatz zu ICC feine, lange Fortsätze auf (Iino et al., 2009a). Wie die ICC formen auch FLC gap junctions mit Glattmuskelzellen



nach Cobine et al., 2011

**Abb. 7: Aufbau der glatten Muskulatur im Gastrointestinaltrakt**

Intramuskuläre interstitielle Zellen von Cajal (ICC-IM; rot) liegen entlang von Nervenbündeln in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts. Sie modulieren die enterische Neurotransmission auf die glatte Muskulatur und steuern so Kontraktion und Relaxation. Fibroblasten-ähnliche Zellen (FLC; grün) sind eng assoziiert mit inhibitorischen und exzitatorischen enterischen Neuronen (blau) und bilden gap junctions mit glatten Muskelzellen. Ihre Rolle bei der enterischen Neurotransmission ist noch unklar. Zusammen bilden ICC-IM und FLC-IM ein netzartiges Zellgeflecht, das intermediär zwischen Neuronen und glatten Muskelzellen angeordnet ist.

(Horiguchi & Komuro, 2000) und werden mit der inhibitorischen Neurotransmission im Darmgewebe in Verbindung gebracht (Burns et al., 1996; Kurahashi et al., 2011). Es ist also denkbar, dass FLC zusammen mit ICC und SMC eine Zelleinheit bilden, die neuronale Signale transduzieren können und als „Tricytium“ die inhibitorische Neurotransmission ermöglichen.

FLC exprimieren den platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ), der wie ckit zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehört, und werden daher auch PDGFR $\alpha$ -positive Zellen genannt (Sanders et al., 2010; Kurahashi et al., 2011). Aufgrund immunhistochemischer Analysen mit Antikörpern gegen PDGFR $\alpha$  wurde deutlich, dass sich FLC trotz ihres ICC-ähnlichen Vorkommens in ihrer Ultrastruktur von ICC unterscheiden. So besitzen FLC beispielsweise keine Basallamina und keine Caveolae, aber ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum (Iino et al., 2009a). Zudem exprimieren sie P2Y(1)-Rezeptoren und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$ -channels; SK3), die speziell mit purinergem inhibitorischer Neurotransmission assoziiert werden (Klemm & Lang, 2002; Vanderwinden et al., 2002; Gallego et al., 2006; Kurahashi et al., 2011). Umfassende Informationen zu Rezeptorexpression, enzymatischer Ausstattung und Funktion der FLC sind jedoch bisher noch nicht bekannt.

## **1.7 Zelluläre Mechanismen der Motilität**

Gastrointestinale Motilität entsteht auf Zellebene durch Änderungen des Membranpotenzials der SMC. Die genauen Abläufe und Mechanismen, die dazu führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und sollen im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet werden.

In bestimmten Regionen des Darmes befinden sich Schrittmacherzellen, die bereits oben erwähnten myenterischen ICC (ICC-MY). Sie unterliegen rhythmischen Membranpotenzialschwankungen. Obgleich nur vereinzelt, so wurden doch gap junctions zwischen ICC-MY und SMC gefunden, was die Vermutung nahelegte, dass ICC-MY als elektrische Leiter dienen und somit einen Schrittmacher-Strom auf die glatte Muskulatur vermitteln können (Taylor et al., 1977; Sanders, 1996). In diesem Fall breiten sich die Membranpotenzialschwankungen passiv über gap junctions aus, ohne zunächst zu einer Kontraktion zu führen, da die Depolarisationen nicht stark genug sind. Diese elektrischen Wellen, die mit extrazellulären Elektroden gemessen werden können, werden als „slow waves“ bezeichnet. Durch verschiedene Faktoren, wie Dehnung oder Acetylcholin-Ausschüttung, können die Depolarisationen einen Schwellenwert überschreiten, wodurch Aktionspotenziale und somit Kontraktionen ausgelöst werden. Studien zur cholinergen Neurotransmission zeigten, dass auch ICC-

IM an der exzitatorischen Signalvermittlung und somit der Entstehung von sogenannten „excitatory junction potentials“ beteiligt sind (Ward et al., 2000; Zhu et al., 2011). Das Ausmaß der Beteiligung von ICC ist jedoch, trotz der unmittelbar benachbarten Lokalisation zu cholinergen Neuronen, umstritten (Zhang et al., 2011). Im Gegensatz dazu steht die Hyperpolarisation von glatten Muskelzellen durch inhibitorische Neurone, die auch „inhibitory junction potential“ (IJP) genannt wird. Durch elektrische Stimulationen bei gleichzeitiger Blockade der exzitatorischen Neurone konnte gezeigt werden, dass sich das IJP in den meisten Bereichen des Gastrointestinaltraktes aus einer schnellen und einer langsamen Komponente zusammensetzt (Keef et al., 1993; Pluja et al., 1999; Gallego et al., 2008). Weiterhin wurde in verschiedenen Geweben dokumentiert, dass die schnelle Komponente P2Y(1)-Rezeptor-vermittelt und somit purinerg ist (Fernandez et al., 1998; Gallego et al., 2006; Wang et al., 2007; Grasa et al., 2009), wohingegen die langsame Komponente durch NOS vermittelt wird und somit nitrogenen Ursprungs ist (Keef et al., 1993; Mashimo et al., 1996; Pluja et al., 1999). Durch enge Assoziation mit nitrogenen Neuronen (Salmhofer et al., 2001) wurde für ICC auch hier eine vermittelnde Rolle in der nitrogenen Neurotransmission vermutet, die in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte (Burns et al., 1996; Ward et al., 1998). Nichtsdestotrotz bleibt die Beteiligung der ICC an der nitrogenen Neurotransmission weiter umstritten (Goyal & Chaudhury, 2010).

Aktuelle Studien zur Rolle der FLC weisen auf eine Partizipation bei der purinergen Neurotransmission hin (Kurahashi et al., 2011). Dabei wurde immunhistochemisch eine unmittelbare Nachbarschaft von FLC und Nervenendigungen bestätigt, die purinerge Neurotransmitter ausschütten. Zudem konnte die Expression von P2Y(1)-Rezeptoren und SK3-Kanälen nachgewiesen werden, die die purinerge Signaltransduktion vermitteln.

Die genauen Interaktionsmechanismen von SMC, ICC und FLC bei exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission sind größtenteils noch ungeklärt. Die Erforschung der physiologischen Grundlagen gastrointestinaler Motilität sind von großer Bedeutung, um ein besseres Verständnis von Krankheiten, wie beispielsweise Achalasie, chronischer Obstipation, Gastroparese und Reizdarmsyndrom zu ermöglichen. Durch die Aufklärung der zellübergreifenden Signalwege könnten neue Ansatzpunkte für die Therapie dieser Krankheiten gefunden werden.

## 1.8 Unterer Harntrakt

Der untere Harntrakt (lower urinary tract, LUT) besteht aus der Harnblase und der Urethra. Beide Gewebe besitzen glatte Muskelzellen, die an der Kontraktion und Relaxation des jeweiligen Gewebes beteiligt sind und dadurch zur Regulation von Harnspeicherung und Miktion beitragen. Eine komplexe Koordination von Kontraktions- und Relaxationsmechanismen wird benötigt, um problemloses Füllen und Entleeren der Blase zu gewährleisten. Bei Dysfunktionen der Harnspeicherung treten Symptome wie ständiger Harndrang und übermäßig häufiges Wasserlassen mit nur geringen Mengen (Pollakisurie), Dranginkontinenz und nächtlicher Harndrang auf. Diese sind die Hauptsymptome der hyperaktiven Blase. Funktionsstörungen bei der Blasenentleerung umfassen vor allem Harnverhalt, unvollständige Blasenentleerung und postmiktionelles Tröpfeln. Diese Beschwerden des unteren Harntrakts werden als LUTS (lower urinary tract symptoms) bezeichnet und stellen besonders in der älteren Bevölkerung ein zunehmendes Problem dar, da sie sich stark auf die Lebensqualität auswirken (Andersson & Arner, 2004). Aus diesem Grund ist die Erforschung von Regulationsmechanismen der Kontraktion und Relaxation der unteren Harnwege von großer Bedeutung.

Verschiedene Studien zeigen, dass die NO/cGMP-Signalkaskade zu unterschiedlichem Ausmaß an der NO-induzierten Urethra- und Blasenrelaxation beteiligt ist (Burnett et al., 1997; Persson et al., 2000). Allerdings konnte bisher insbesondere der funktionelle Einfluss von NO auf Blasengewebe noch nicht abschließend aufgeklärt werden. Neben der unklaren Funktion der im LUT vorliegenden NO-GC, herrscht auch eine kontroverse Diskussion über die Beteiligung von anderen Zelltypen wie ICC und FLC an den Motilitätsmechanismen im LUT. Vor allem zu der Existenz von ckit-positiven ICC herrscht eine verwirrende Datenlage, da es immunhistochemische Beweise für (McCloskey et al., 2009) als auch wider (Pezzone et al., 2003) diese Zellen in der murinen Blase gibt. Neuere Daten weisen darauf hin, dass die interstitiellen Blaszellen PDGFR $\alpha$ -positiv und somit potentiell FLC sind; gleichzeitig konnte ein Großteil dieser Zellen aber auch mit Vimentin angefärbt werden, ein Intermediär-Filament-Marker, der neben ckit auch als Marker zur Identifizierung von ICC im Gastrointestinaltrakt verwendet wird (Koh et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Verteilung und die Funktion der NO-GC im LUT näher betrachtet. Die Kombination von immunhistochemischen Analysen und funktionellen Experimenten bietet dabei eine einzigartige Möglichkeit, Antworten auf die noch offenen Fragen bezüglich der nitrergen Relaxation im LUT zu finden.

## 1.9 Transgene Mausmodelle

Die medizinische Forschung stellt eines der wichtigsten Felder im Einsatz von transgenen Tiermodellen dar. Durch gezieltes Einführen bzw. Deletion eines Gens im Genom eröffnet sich beispielsweise auf physiologischer Ebene die Möglichkeit, ein Enzym auf seine Funktion hin detailliert zu untersuchen; auf pathophysiologischer Ebene können spezifische Krankheitsbilder näher beleuchtet werden.

Der Modellorganismus Maus hat sowohl wissenschaftliche als auch praktische Vorzüge. Neben dem geringen räumlichen Anspruch und relativ niedriger Kosten in der Tierhaltung stellt die hohe Reproduktionsrate und im Zuge dessen die schnelle Generationenfolge einen Vorteil dar. Zudem wird die Arbeit mit transgenen Mäusen dadurch vereinfacht, dass murine embryonale Stammzellen in Kultur gehalten werden können (Capecchi, 1989a, b). Ein wesentlicher positiver Aspekt ist zusätzlich die Tatsache, dass 99% des Mausgenoms ein Korrelat im menschlichen Erbgut besitzen, wovon 96% sogar in vergleichbarer Nachbarschaft vorliegen (Capecchi, 1994; Houdebine, 2007).

Gegenwärtig existieren verschiedene KO-Mausmodelle, bei denen Gene deletiert wurden, die für wesentliche Proteine der NO/cGMP-Signalkaskade kodieren. Zusätzlich gibt es Mausmodelle, bei denen ganze Zelltypen depletiert sind. Nachfolgend soll auf vier dieser KO-Mauslinien eingegangen werden.

### 1.9.1 KO-Mausmodelle für die NOS

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, existieren drei Isoformen der NOS, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden (Tsutsui et al., 2009). Für jede der Isoformen wurde eine KO-Mauslinie generiert, deren jeweiliger Phänotyp auf die physiologische Bedeutung der zugehörigen Isoform rückschließen lässt.

Für die nNOS bestehen zwei verschiedene KO-Linien. Bei einer der beiden wurde Exon 2 genomisch deletiert. Diese Tiere weisen ein aggressives Verhalten auf (Nelson et al., 1995) und besitzen einen stark vergrößerten Magen mit einer Hypertrophie des Pylorus-Sphinkters (Huang et al., 1993). Im Zusammenhang damit steht auch die Bildung von Bezoaren, die bei den Tieren regelmäßig auftritt (Sivarao et al., 2008). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in diesem KO-Modell noch eine Spleißvariante der nNOS in verschiedenen Organen, wie z.B. Gehirn und Darm, gebildet wird und aktiv ist (Eliasson et al., 1997). Aus diesem Grund wurde eine zweite KO-Mauslinie für die nNOS erzeugt, bei der Exon 6 deletiert wurde. Bei diesen Tieren wurde in den untersuchten Geweben keine nNOS-Aktivität mehr festgestellt. Identisch zu den KO-Tieren mit deletiertem Exon 2, wurde auch bei diesen Tieren eine Pylorus-Stenose diagnostiziert (Gyurko et al., 2002). Diese Erkenntnisse veranschaulichen die zentrale

Bedeutung des von nNOS gebildeten NOs als inhibitorischer Neurotransmitter für die gastrointestinale Motilität und die damit verbundene Sphinkteren-Relaxation.

Eine KO-Mauslinie spezifisch für eNOS wurde von Huang et al. etabliert (Huang et al., 1995). Diese Mäuse zeigen einen stark erhöhten Blutdruck und weisen keine Acetylcholin-induzierte Gefäßrelaxation mehr auf. Darüber hinaus zeigen eNOS-defiziente Mäuse Defekte bei der Angio- und Arteriogenese (Dai & Faber, 2010), was auf die antiproliferativen Effekte von endotheliale NO für die glatte Gefäßmuskulatur hinweist (Moroi et al., 1998; Rudic et al., 1998).

Für iNOS sind mehrere KO-Mauslinien entwickelt worden, die aber keine besonderen Auffälligkeiten zeigen. Es konnte lediglich eine erhöhte Infekt-Anfälligkeit, aber gleichzeitig auch eine höhere Resistenz gegen septischen Schock festgestellt werden (Laubach et al., 1995).

### **1.9.2 KO-Mausmodelle für die NO-GC**

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Mausmodell generiert, bei dem die NO-GC durch Deletion der  $\beta_1$ -Untereinheit ubiquitär ausgeschaltet ist (Friebe et al., 2007). Diese NO-GC Knockout-Tiere (GCKO) besitzen eine verminderte Lebenserwartung und eine starke Wachstumsretardierung. Über 80% der Tiere sterben bis zum zweiten Tag nach der Geburt. Die restlichen Tiere werden maximal 3 bis 5 Wochen alt, was mit dem Zeitpunkt des Absetzens der Tiere und der Umstellung auf feste Nahrung korreliert. Untersuchungen ergaben, dass GCKO-Tiere eine stark verlängerte Darmpassagezeit aufweisen, was auf eine gastrointestinale Dysmotilität schließen lässt. Durch die Nahrungsumstellung auf eine ballaststoffarme Diät konnte die Überlebensrate der Tiere gesteigert werden.

Neben den gastrointestinalen Problemen, zeigen adulte GCKO-Tiere einen stark erhöhten systolischen Blutdruck im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren. Übereinstimmend damit erwiesen Organbad-Versuche mit isolierter GCKO-Aorta ein vollständiges Ausbleiben der NO-induzierten Relaxation (Friebe et al., 2007). Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass NO in GCKO-Tieren nicht die Thrombin-induzierte Aggregation in Thrombozyten hemmt. Weder die ADP-induzierte Adhäsion, noch die Thrombin-induzierte  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung wird von NO-Donatoren in GCKO-Tieren beeinflusst. Physiologisch zeigt sich dies auch in einer deutlich reduzierten Blutungszeit der GCKO-Tiere. Diese Daten legen eindeutig dar, dass NO-GC der einzige NO-Rezeptor in murinen Thrombozyten ist, der die Inhibition der  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung, Adhäsion und Aggregation vermittelt (Dangel et al., 2010).

Neben den Knockout-Tieren für die  $\beta_1$ -Untereinheit wurden auch KO-Mäuse für die  $\alpha_1$ - und die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NO-GC generiert (Mergia et al., 2006; Vanneste et al.,

2007). Die Deletion einer der beiden Untereinheiten führte nicht zu einer verstärkten Expression der jeweils anderen Untereinheit, wodurch keine Kompensation stattfand. Untersuchungen dieser Mauslinien ließen erkennen, dass die jeweils noch vorhandene NO-GC-Isoform die Funktion der deletierten Isoform übernehmen kann. Die NO-GC Expression in Aorta von  $\alpha_1$ -Knockout-Tieren belief sich auf 6%, die auf die  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform zurück zu führen sind. Dem gegenüber steht eine 94%-ige Expression der NO-GC in Aorta von  $\alpha_2$ -Knockout-Tieren, die durch die noch vorhandene  $\alpha_1\beta_1$ -Isoform erklärbar ist. Die  $\alpha_2$ -Knockout-Tiere weisen keinen, die  $\alpha_1$ -Knockout-Tiere lediglich einen leicht erhöhten Blutdruck (7 mmHg) im Vergleich zu den GCKO-Tieren (30 mmHg) auf. Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass bereits geringe Mengen noch vorhandener NO-GC ausreichen, um einen funktionalen Effekt von NO zu erhalten. Die starke Expression der NO-GC kann daher mit einer Reservefunktion assoziiert werden, die eine NO-Responsibilität gewährleistet und die Sensitivität gegenüber NO erhöht. Im Gastrointestinaltrakt überwiegt die  $\alpha_1$ -Untereinheit. Eine Deletion bewirkt aber lediglich bei männlichen Mäusen eine leichte Erhöhung der Darmpassagezeit. Die nitrege Relaxation von Jejunum-Gewebe ist jedoch in beiden Geschlechtern fast gänzlich verschwunden. Eine Rest-Relaxation konnte durch NO-GC-Hemmung mit ODQ vollständig inhibiert werden, was darauf schließen lässt, dass die verbleibende Relaxation durch die  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform bedingt ist (Dhaese et al., 2008; Dhaese et al., 2009).

### **1.9.3 KO-Mausmodelle für die PKG**

Wie in Abschnitt 1.3.1 erwähnt ist die PKGI besonders stark in Thrombozyten sowie glatter Gefäßmuskulatur vorhanden. Zusätzlich wird sie auch im Gastrointestinaltrakt ubiquitär exprimiert (Geiselhoringer et al., 2004). Das Ausschalten dieses Enzyms in der Maus zeigt multiple Veränderungen des Phänotyps (Pfeifer et al., 1998). Die KO-Tiere besitzen eine stark reduzierte Lebenserwartung, was in der gastrointestinalen Dysmotilität begründet sein kann, die durch eine verlangsamte Darmpassage belegt ist. Zudem wurde bei den Tieren eine Dilatation des Magens, Duodenums und Caecums sowie ein hypertrophierter stenotischer Pylorus gefunden (Ny et al., 2000). Untersuchungen der Aorta von PKGI-defizienten Mäusen zeigen keine Relaxation nach Acetylcholin-Gabe und eine verminderte Relaxation infolge von NO-Donator-Applikation. Männliche PKGI-Knockout-Tiere weisen eine verringerte Reproduktionsfähigkeit auf, die auf eine erektile Dysfunktion hindeutet (Hedlund et al., 2000). Alle diese Erkenntnisse untermauern die Annahme, dass die PKGI ein zentraler Effektor der NO/cGMP-Signalkaskade in glatten Muskelzellen ist.

#### 1.9.4 KO-Mausmodelle für ICC

Der sogenannte „dominant-white spotting“-Lokus im Chromosom 5 des Mausgenoms liegt auf dem gleichen Allel wie das Proto-Onkogen *ckit* (Chabot et al., 1988; Geissler et al., 1988). Die Expression von *ckit* ist essentiell für die Bildung von verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Melanocyten, Mastzellen und ICC (Maeda et al., 1992; Lennartsson et al., 2005). Viele verschiedene spontane Mutationen des *ckit*-Gens wurden bei W-Maus-Mutanten beobachtet. Phänotypisch auffällig sind die depigmentierten Bereiche, die sowohl bei heterozygoten als auch bei homozygoten Tieren im Fell auftreten.

Da ICC in ihrer Entwicklung abhängig von der *ckit*-vermittelten Signalwirkung sind, werden verschiedene W-Mutanten als Zell-Knockout-Mausmodelle zur Untersuchung der Funktion von ICC verwendet. Einsatz und Nutzen dieser Tiere hängen vom Grad der ICC-Deletion ab. W/Wv-Mäuse werden momentan vorwiegend zu der Aufklärung funktioneller Effekte von ICC verwendet (Takaki, 2003). Im Dünndarm der W/Wv-Tiere fehlen die myenterischen ICC fast vollständig, während die intramuskulären ICC noch vorhanden sind (Ward et al., 1994). Entgegengesetzt dazu sind myenterische ICC in verschiedenen Magenregionen noch erhalten, während dort die intramuskulären ICC stark vermindert sind (Burns et al., 1996; Ward et al., 1998).

Besonders bei der Erforschung gastrointestinaler Motilitätsstörungen werden W/Wv-Mäuse oftmals eingesetzt, da diese dysmotilen Krankheitsbilder mit einer Verminderung an ICC assoziiert werden (Farrugia, 2008; Ordog et al., 2009). Unter der Annahme, dass ICC wichtige Vermittler der Neurotransmission sind, resultiert ein Verlust von ICC in einer verminderten Kommunikation zwischen enterischem Nervensystem und glatter Muskulatur und bedingt somit eine verringerte neuronale Motilität. Ursache und Wirkung motorischer Dysfunktionen sind beim Menschen allerdings schlecht voneinander zu unterscheiden, da sich die Betroffenen oft erst lange nach dem Auftreten der Symptome einer ärztlichen Kontrolle unterziehen. Tiermodelle mit defizitären ICC-Netzwerken sollen daher dazu beitragen, die Bedeutung der ICC aufzuklären.

40% der W/Wv-Mäuse zeigen einen gastrointestinalen Phänotyp mit Bildung von Magenulcera sowie -papillomen (Kitamura et al., 1980). Auf Zellebene konnten mehrere Studien zeigen, dass die post-junktionalen Antworten auf Ausschüttung nitriger und cholinergischer Neuronen in verschiedenen gastrointestinalen Geweben von W/Wv-Mäusen reduziert sind (Burns et al., 1996; Ward et al., 1998; Suzuki et al., 2003). Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch Untersuchungen, die darlegen, dass ein Verlust von ICC die cholinerge und purinerge Neurotransmission nicht wesentlich beeinflusst und die nitrerge Innervation nicht unterbricht (Huizinga et al., 2008; Zhang et al., 2010). Es ist unklar, worauf die Unterschiede in den Ergebnissen beruhen. Eine

Möglichkeit besteht darin, dass Remodelling und andere Kompensationsmechanismen durch kongenitale ICC-Deletion stattgefunden haben. Aber auch die gewählten Versuchsbedingungen, z.B. bei Nervenstimulation, spielen eine zentrale Rolle und können die divergenten Ergebnisse bedingen. Die Schwierigkeiten, die sich vor allem aus unvollständiger Deletion der Zellen und nicht vorhersehbarer Kompensationsmechanismen ergeben, verhindern daher allgemeingültige und abschließende Rückschlüsse auf die Funktion der ICC.

## 2. Zielsetzung

---

Die NO/cGMP-Signalkaskade übernimmt eine wesentliche Rolle bei der Relaxation von glattmuskulärem Gewebe. Durch das von der NOS gebildete NO kommt es zu einer Aktivierung der NO-GC, was eine Bildung von cGMP zur Folge hat. Erhöhte cGMP-Spiegel führen in der Zelle zur Aktivierung der PKG und letztendlich zu einer Relaxation der glatten Muskulatur.

Die Bedeutung dieses Signalweges für die Regulation von Kontraktion und Relaxation innerhalb von glatten Muskelzellen (SMC), interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) und Fibroblasten-ähnlichen Zellen (FLC) sollte im Rahmen dieser Arbeit anhand von zwei Organsystemen untersucht werden.

### *Gastrointestinaltrakt*

KO-Mäuse für NO-GC zeigen eine erhebliche gastrointestinale Dysfunktion, was unter anderem eine verlangsamte Motilität zur Folge hat. Vorangegangene Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die NO-GC im Gastrointestinaltrakt in mindestens drei verschiedenen Zellen exprimiert wird: glatte Muskelzellen (SMC), interstitielle Zellen von Cajal (ICC) und Fibroblasten-ähnliche Zellen (FLC). Um die Funktion der NO-GC in diesen drei Zelltypen zu untersuchen, waren KO-Mäuse im Labor generiert worden, bei denen die NO-GC in SMC, ICC und in beiden Zelltypen (SMC + ICC) ausgeschaltet ist. Innerhalb dieser Arbeit sollten zunächst ein FLC-spezifischer GCKO und durch Kreuzung der Linien Doppel-GCKO-Tiere (FLC + SMC, FLC + ICC) sowie eine Tripel-GCKO-Linie generiert werden. An diesen Mäusen sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Messung der Relaxation des Magenfundus durch NO und elektrische Feldstimulation
- *In vivo*-Messung der Darmpassagezeit
- Elektrophysiologische Messung der Membranpotenziale in glatten Muskelzellen von Colon-Gewebe

### *Unterer Harntrakt*

Die Lokalisation und die Bedeutung der NO-GC für die Regulation des unteren Harntrakts sind noch unklar. Bei KO-Mäusen für die PKG konnte eine verminderte urethrale Relaxation festgestellt werden, auch KO-Mäuse für nNOS zeigten eine veränderte Relaxation sowie zusätzlich eine vergrößerte Blase. Anhand folgender Versuche sollte die Funktion der NO-GC im unteren Harntrakt untersucht werden:

- Messung der Relaxation von Urethra- und Blasen-Gewebe durch NO und 8-pCPT-cGMP
- Überprüfung der cAMP-Signalkaskade in Urethra und Blase
- Bestimmung der Blasengewichte
- Nachweis der NO-GC in Urethra und Blase mittels Immunhistochemie

Abschließend sollte im Rahmen dieser Arbeit die Effektivität der NO-GC-Inhibitoren ODQ und NS2028 überprüft werden. Viele Studien im Bereich der NO/cGMP-Signalkaskade verwenden diese NO-GC-Inhibitoren als Nachweis cGMP-abhängiger wie auch cGMP-unabhängiger Effekte. Die Effektivität der Inhibitoren, insbesondere im Hinblick auf den Einsatz als Nachweis cGMP-unabhängiger Effekte, sollte mittels folgender Untersuchungen bestimmt werden:

- Messung des cGMP-Anstiegs in NO-GC-exprimierenden HEK-Zellen und Thrombozyten durch NO in An- und Abwesenheit von ODQ
- Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der ODQ-vermittelten NO-GC-Inhibition anhand von Western-Blot-Analysen und Organbad-Versuchen
- Inhibition der NO-induzierten Relaxation in Aorta- und Fundus-Gewebe von WT- und GCKO-Tieren durch ODQ und NS2028
- Inhibition der Relaxation durch endogen freigesetztes NO in Aorta- und Fundus-Gewebe von WT- und GCKO-Tieren durch ODQ

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

##### Hersteller

---

8-pCPT-cGMP	Alexis, Lausen (CH)
Atropin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bay 41-2272	Calbiochem, Darmstadt
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt
Carbachol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carmin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEA-NO	Alexis, Lausen (CH)
Diclofenac	Cayman Chemical, MI (USA)
EGTA	Roth, Karlsruhe
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin 85%	Merck, Darmstadt
GSNO	Alexis, Lausen (CH)
Guanethidin	ABCR GMBH, Karlsruhe
HEPES	Applichem, Darmstadt
IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-NAME	Alexis, Lausen (CH)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Miglyol 812	Apotheke des Uniklinikums
MRS 2500	Tocris Bioscience
Natriumhypochloritlösung	ChemSolute, Renningen
Nifedepin	Alexis, Lausen (CH)
NS2028	Alexis, Lausen (CH)
ODQ	Alexis, Lausen (CH)
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phentolamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Propranolol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti-Block	Roth, Karlsruhe
SDS	Applichem, Darmstadt
Sildenafil	Pfizer, Berlin
SNP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trinatriumcitrat	ChemSolute, Renningen
Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
U46619	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle weiteren Salze, die Verwendung bei der Zubereitung von Puffern fanden, wurden bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bestellt. Alle weiteren eingesetzten Fertiglösungen wurden von ChemSolute (Renningen) bezogen.

### 3.1.2 Antikörper für Western-Blot

---

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
pVASP (Ser 239, human)	1:3000	Nanotools, Teningen
pVASP (Ser 235, murin)	1:1000	Nanotools, Teningen
Aktin	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
PKG	1:1000	Dr. Stepan Gambaryan, Würzburg

### 3.1.3 Antikörper für immunhistochemische Analysen

---

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
$\beta_1$ -NO-GC, Kaninchen	1:800	in unserem Labor hergestellt
$\alpha$ -SMA, Maus (Klon 1A4)	1:500	Sigma-Aldrich, München
PDGFR $\alpha$ , Ratte (Klon APA5)	1:200	eBioscience, Frankfurt
ckit, Ratte (Klon ACK4)	1:200	Linaris, Wertheim
Alexa 555 anti-Kaninchen IgG	1:800	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 488 anti-Ratte IgG	1:800	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.4 Lösungen und Puffer

---

#### Western-Blot

---

##### **SDS-haltiger Probenpuffer für Gelelektrophorese:**

10% (v/v) Glycerin  
5%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
1% (w/v) SDS  
0,005% (w/v) Bromphenolblau  
62,5 mM Tris Base pH 6,6

##### **Ponceau-Reagenz:**

0,2% (w/v) Ponceau S  
10% (v/v) Trichloressigsäure

#### Thrombozyten-Aufbereitung

---

##### **ACD (für murine Thrombozyten):**

85 mM Trinatriumcitrat  
65 mM Zitronensäure  
2% Glukose

##### **ACD (für humane Thrombozyten):**

15 mM Trinatriumcitrat  
12 mM Zitronensäure  
25 mM Glukose  
2  $\mu$ M EGTA

**PBS (10x Stammlösung):**

80,0 g NaCl  
2,0 g KCl  
14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4 mit HCl  
ad 1000 ml mit Aqua dest.

**Plättchen-Puffer:**

15 mM NaCl  
0,055 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,7 mM NaHCO<sub>3</sub>  
0,27 mM KCl  
0,05 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 mM HEPES pH 7,4  
5 mM Glukose

**CGS-Puffer:**

120 mM NaCl  
12,9 mM Trinatriumcitrat pH 6,5  
30 mM Glukose

**HEPES-Puffer:**

150 mM NaCl  
5 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM HEPES pH 7,4  
10 mM Glukose

**Organbad und Membranpotentialmessung**

---

**Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung):**

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>  
pH 7,4 bei Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)  
7,5 mM Glukose

**Stammlösung A:**

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

**Stammlösung B:**

52,5 g NaHCO<sub>3</sub>  
ad 1000 ml mit Aqua dest.

Die KH-Lösung wurde jeden Tag frisch aus Stammlösung A und B (je 40 ml für 1000 ml KH-Lösung) unter Zusatz von Glukose hergestellt, ständig mit Carbogen begast und im Wärmebad auf 37°C gehalten.

Die verwendeten Stoffe (Carbachol, PE, U46619, NO-Donatoren, 8-pCPT-cGMP, Sildenafil, Nifedipin, Atropin, Guanethidin, Propranolol, Phentolamin) wurden regelmäßig vor Versuchen frisch angesetzt. Aus den Stammlösungen wurden je nach Bedarf Verdünnungsreihen hergestellt.

### ***In vivo*-Messungen**

---

**Carmin-Farbstoff-Lösung:**

0,6 g Carmin  
 0,05 g Methylzellulose  
 ad 10 ml mit Leitungswasser

<b>3.1.5 Geräte</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Organbad	Multi Myograph Model 610M	Danish Myo Tech
PowerLab	PowerLab 4/25	AD Instruments
PowerLab	PowerLab 8/30	AD Instruments
Booster	Multiplexing Pulse Booster	Ugo Basile
Lichtisolierte Kammer	Biochemi™ GDS 8000 System	UVP
UV-Transilluminator	Fluo-Link	Biometra
CCD-Kamera	QuickStore	MS-Laborgeräte
Elektrometer	DUO773 Electrometer	WPI Instruments
Stimulator	Grass S48 Stimulator	Astro-Med
Isolation Unit	Grass SIU5 RF Transformer	Astro-Med
Oszilloskop	40 MHz-Dig-Speicher-Oszill.	Reichelt Elektronik
Mikroelektroden	GB100F-10	Science Products
Puller	Model P-97	Sutter Instr. Co
Mikromanipulator	Leitz Mikromanipulator M	Leica Microsystems
Speed Vac	Speed Vac Concentrator	Bachofer Labora- toriumsgeräte

## **3.2 Routinemethoden**

### **3.2.1 Gelelektrophorese**

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) wurden nach Angaben von Laemmli (1970) durchgeführt.

### **3.2.2 Western-Blot**

Der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) folgend, wurden Western-Blots (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Dabei wurden die aufgetrennten Proteine in Mini-Gelkammern (Mini-Protean II Cell, Biorad) durch

elektrischen Transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Biorad) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Erfolg des Transfers wurde mittels Ponceau-Färbung überprüft (Inkubation mit Ponceau-Reagenz für 5 min, RT). Nach Sichtbarwerden der Proteinbanden, wurden die Größenstandards markiert und die Membran für 30 min bei RT in Milchpulver-Lösung zur Absättigung unspezifischer Proteinbindestellen inkubiert. Im Anschluss erfolgte zunächst die Inkubation der Blots mit den jeweiligen Primär-Antikörpern und als nächstes eine zweite Inkubation mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, Immunglobulin-spezifischen Sekundär-Antikörper. Zur Detektion der Antikörper wurde das ‚Super Signal West Dura Extended Duratice Substrate‘ (Thermo Scientific) verwendet. Die Chemolumineszenz wurde mit einer 16-bits CCD-Kamera in einer lichtisolierten Kammer aufgenommen.

### **3.2.3 Gewinnung von Western-Blot-Proben**

Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert. Die Blutentnahme (400 - 800 µl) erfolgte mit Hilfe einer Glaskapillare aus dem Orbitalsinus. Das Blut wurde in einem mit 200 µl ACD gefüllten Reaktionsgefäß gesammelt, mit 400 µl PBS (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei) versetzt und 10 min (100 x g) bei RT zentrifugiert. Daraufhin wurde die obere Phase Plättchenreichen Plasmas (PRP) abgenommen und die untere Phase erneut mit der Menge PBS versetzt, die zuvor entnommen wurde. Nach nochmaliger Zentrifugation (10 min, 100 x g, RT) wurde der Überstand mit dem PRP vereinigt und das gesammelte PRP ein weiteres Mal 10 min (700 x g) bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Thrombozyten in Plättchen-Puffer resuspendiert. Für Western-Proben wurden die Thrombozyten auf 2 x 10<sup>8</sup> Thrombozyten/ml eingestellt.

Die Gewinnung von humanen Thrombozyten erfolgte nach Gambaryan et al. (2010). Blut wurde im Verhältnis 1:7 in ACD aufgenommen. Das PRP wurde durch 5 min Zentrifugation bei 330 x g und RT erhalten und anschließend erneut zentrifugiert (10 min, 430 x g, RT). Die sedimentierten Thrombozyten wurden einmal in CGS-Puffer gewaschen und in HEPES-Puffer resuspendiert, bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

Die Inkubationen von murinen und humanen Thrombozyten erfolgte bei 37°C für die jeweils angegebenen Zeiten mit unterschiedlichen Konzentrationen von DEA-NO in An- und Abwesenheit von ODQ (10 µM; 10 min Präinkubation).

### **3.2.4 Immunhistochemische Analyse**

Mäuse wurden durch eine Überdosis Isofluran getötet. Das jeweilige Gewebe wurde unmittelbar im Anschluss präpariert, in durch Flüssigstickstoff gekühltes 2-Methylbutan getaucht und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Kryoschnitte (20 µm)

wurden geschnitten, luftgetrocknet und mit verschiedenen Antikörpern (siehe Auflistung) über Nacht bei 4°C inkubiert. In Kaninchen hergestellte Antikörper wurden mit Alexa 555-konjugiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper, in Ratten hergestellte Antikörper mit Alexa 488-konjugiertem anti-Ratten IgG Antikörper für jeweils eine Stunde bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden in Mowiol fixiert und mit einem Konfokal-Mikroskop (Leica TCS Sp5) ausgewertet.

### **3.2.5 Radioimmunoassay (RIA)**

Im Allgemeinen wird ein Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen verwendet. In der vorliegenden Arbeit war die Quantifizierung des im Gewebe produzierten cGMPs von Bedeutung. Für diese Versuche wurde radioaktiv-markiertes cGMP (<sup>125</sup>Iod-2'-Succinyl-cGMP-Tyrosylmethylester) eingesetzt, das als Tracer genutzt wurde. Bereits geringe Mengen dieses Tracers können mittels immunologischer Präzipitation durch Verwendung eines spezifischen Antiserums bestimmt werden.

Bei Inkubation des Tracers mit Antiserum stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form des Tracers ein, das durch nicht radioaktiv-markiertes cGMP in Richtung des freien Tracers verschoben werden kann. Der präzipitierbare gebundene Anteil sinkt dadurch ab. Im Anschluss an die Proteinfällung und Dekantieren des Überstands kann daher die im Präzipitat befindliche gebundene Tracer-Menge durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden. Die Verwendung einer Standardkurve mit bekannten Mengen von nicht markiertem cGMP ermöglicht die Ermittlung des cGMP-Gehalts einer unbekannt Probe. Die Durchführung des RIA, die Behandlung der Proben sowie die Antikörperinkubation wurden bei Steiner et al. (1972) beschrieben.

Getrocknete Überstände von Thrombozyten, die zuvor unterschiedliche Zeit mit bestimmten Konzentrationen von DEA-NO bei 37°C inkubiert und mit absolutem Ethanol lysiert wurden, wurden in Reaktionspuffer (100 mM Natriumacetat, pH 6) aufgenommen und mit 3 µl eines Gemisches aus Triethylamin und Acetanhydrid (2:1) acetyliert. Acetylierung des in den Proben enthaltenen cGMPs führt zu einer 40-fachen Erhöhung der Sensitivität des RIAs (Harper & Brooker, 1975). 50 µl Reaktionspuffer wurden in Polypropylen-Röhrchen vorgelegt und mit 10 µl einer acetylierten Probe sowie mit 100 µl des in Schweine-γ-Globulin (0,5 mg/ml) verdünnten Antiserums (final 1:200000) versetzt. 40 µl des in Reaktionspuffer verdünnten Tracers wurden hinzugefügt und gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 16 bis 20 Stunden. Durch Zugabe von 3 ml Polyethylenglykol-Puffer (16% PEG 6000 in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) fand eine Proteinfällung im Reaktionsansatz statt, die eine Trennung von freiem und

gebundenem cGMP ermöglichte. 50 µl einer 0,8%igen Schweine-γ-Globulin-Lösung wurden zugesetzt, um eine ausreichende Proteinmenge für die quantitative Fällung des Antikörpers zu gewährleisten. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 4°C, wurde 30 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden daraufhin abgesaugt und die Radioaktivität in den Sedimenten im γ-Counter gemessen. Das Verhältnis von Tracer-Menge (7000 - 10000 cpm) und Antikörperverdünnung (1:200000) führt im Normalfall zu einer Fällung von 30 - 40% der eingesetzten Aktivität. Dieses Verhältnis wurde durch den Zusatz von Antikörperverdünnungen zu einer festgelegten Tracer-Menge bestimmt. Bei der Herstellung der Standardreihe wurden neun cGMP-Mengen (2 - 512 fmol) verwendet. Die Konzentrationen der Standard-cGMP-Lösungen wurden photometrisch bei 252 nm bestimmt.

### **3.2.6 Messung der cGMP-Menge in Thrombozyten**

Die Blutentnahme und Isolation der Mäusethrombozyten wurde durchgeführt wie bei der Herstellung von Western-Blot Proben beschrieben. Die Thrombozyten-Suspensionen wurden auf eine Menge von  $3 \times 10^8$  Thrombozyten/ml eingestellt und für 60 min bei RT inkubiert.

Die einzelnen Proben (Ansatz je 100 µl) wurden 5 min bei 37°C äquilibriert und anschließend 10 min mit unterschiedlichen DEA-NO- und GSNO-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von OEQ (10 µM; 10 min Präinkubation) inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von eisgekühltem absolutem Ethanol gestoppt (final 66%). Alle Proben enthielten den PDE5-Hemmstoff Sildenafil (100 µM), um den cGMP-Abbau zu verhindern. Im Anschluss wurden die Proben in einer Speed Vac unter Wärmezufuhr getrocknet und mittels RIA die cGMP-Mengen bestimmt.

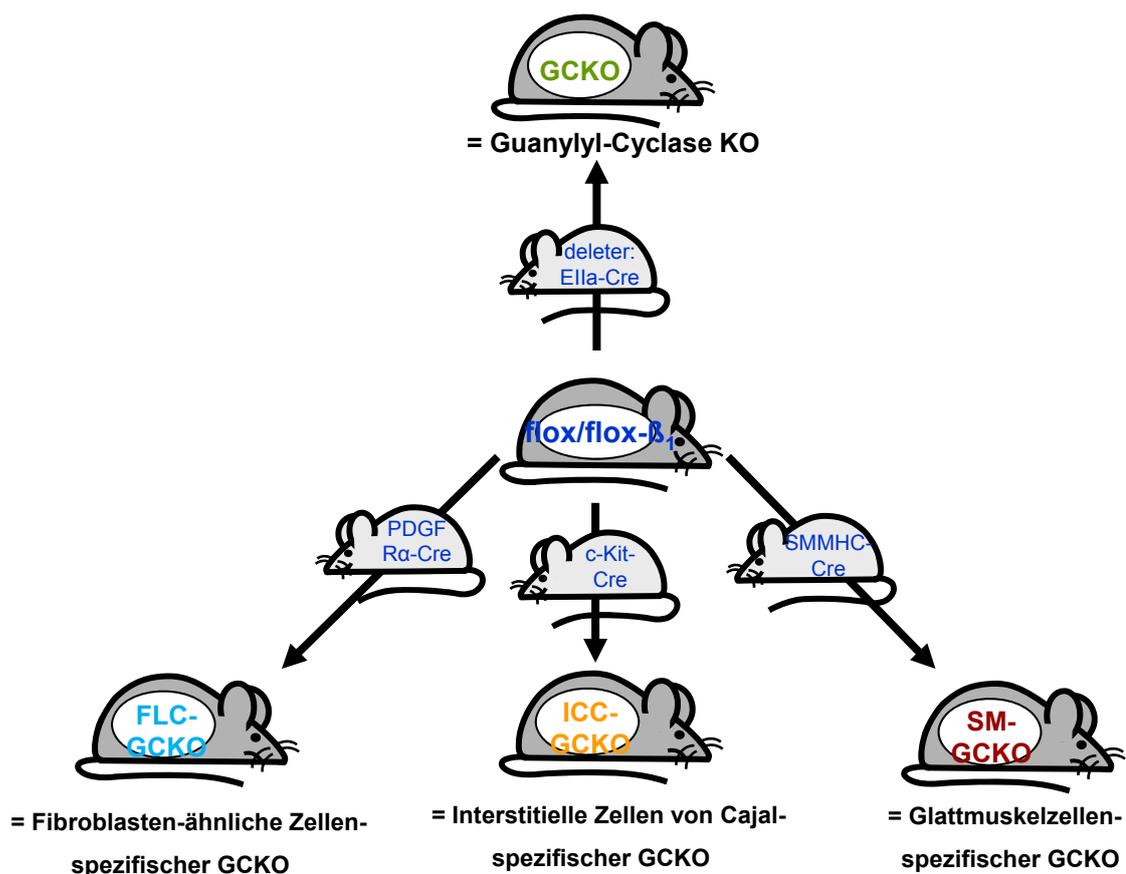
## **3.3 Tiere und Präparation**

### **3.3.1 Haltung und Zucht**

Die Mäuse wurden in Makrolon-Typ-III-Käfigen (bis 3 adulte Tiere) oder Makrolon-Typ-II-Käfigen (bis 6 adulte Tiere) den Anforderungen entsprechend gehalten. Die verwendeten Mauslinien (GCKO, SM-GCKO, ICC-GCKO, FLC-GCKO, SM/ICC-GCKO, FLC/SM-GCKO, FLC/ICC-GCKO und Tripel-GCKO) wurden von Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe zur Verfügung gestellt. Das Kreuzungsschema der Mauslinien zum Erhalt der verschiedenen NO-GC-Knockout-Linien ist in Abbildung 8 dargestellt.

Alle Versuche wurden mit adulten Mäusen (8 bis 24 Wochen) beider Geschlechter durchgeführt. Eine Ausnahme stellen die SM-GCKO-Tiere dar: Das SMMHC-Cre Transgen ist auf dem Y-Chromosom lokalisiert, so dass nur männliche Nachkommen das Gen tragen. Versuche mit SM-GCKO-, SM/ICC-GCKO- und FLC/SM-GCKO-

## Generierung der KO-Mausmodelle



### Weitere Kreuzungen:

Knockout	NO-GC Defizienz	Promoter
<b>FLC/ICC-GCKO</b>	Fibroblasten-ähnliche Zellen Interstitielle Zellen von Cajal	PDGFRα c-Kit
<b>FLC/SM-GCKO</b>	Fibroblasten-ähnliche Zellen Glattmuskelzellen	PDGFRα SMMHC
<b>SM/ICC-GCKO</b>	Glattmuskelzellen Interstitielle Zellen von Cajal	SMMHC c-Kit
<b>Tripel-GCKO</b>	Glattmuskelzellen Interstitielle Zellen von Cajal Fibroblasten-ähnliche Zellen	SMMHC c-Kit PDGFRα

### Abb. 8: Generierung der KO-Mausmodelle

Mäuse mit gefloxtem Exon 10 der NO-GC (flox/flox-β<sub>1</sub>) wurden mit Mäusen gekreuzt, die ubiquitär Cre exprimieren (Ella-Cre), wodurch vollständige KOs der NO-GC (GCKO) entstanden.

Die flox/flox-β<sub>1</sub>-Mäuse wurden ebenfalls mit Mäusen verpaart bei denen die Cre gewebespezifisch exprimiert wurde (SMC-spezifische Cre, SMMHC-Cre; ICC-spezifische Cre, ckit-Cre; FLC-spezifische Cre, PDGFRα-Cre), wodurch gewebespezifische KOs entstanden. Aus diesen Tieren wurden Doppel-KOs und ein Tripel-KO erzeugt, die in den jeweiligen Kombinationen in SMC, ICC und/oder FLC keine NO-GC mehr exprimierten.

Tieren wurden daher nur mit männlichen Tieren durchgeführt. Als Kontrollen wurden wenn möglich WT- oder heterozygote Geschwistertiere für GCKO-Mäuse sowie heterozygote Cre-exprimierende Geschwistertiere für die zellspezifischen induzierbaren GCKO-Tiere verwendet.

GCKO-Tiere wurden ad libitum mit einer ballaststoffarmen Diät (Altromin 1013) gefüttert und mit Wasser versorgt. Als Einstreu für die Käfige wurden Holzspäne benutzt. Zur Zucht wurden je zwei heterozygote Weibchen im gebärfähigen Alter (8 bis 45 Wochen) und ein heterozygoten Männchen (7 Wochen bis 1 Jahr) zusammengesetzt. 21 Tage nach Geburt wurden die Nachkommen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Alle WT- und zellspezifischen Knockout-Tiere erhielten eine Nager-Standarddiät (Altromin 1320).

### **3.3.2 Induktion von Knockout-Tieren durch Tamoxifen-Injektion**

Mäuse (heterozygote Kontrolltiere, SM-GCKO, ICC-GCKO, FLC-GCKO, SM/ICC-GCKO, FLC/SM-GCKO, FLC/ICC-GCKO und Tripel-GCKO) im Alter von 6 bis 8 Wochen wurden mit Tamoxifen (1 mg i.p.; gelöst in Miglyol 812) an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert. Die Tiere wurden zum Einsatz bei Experimenten ab Tag 50 nach der letzten Injektion verwendet, da vorangegangene Untersuchungen ergaben, dass nach diesem Zeitraum keine NO-GC mehr nachweisbar und somit auch die Funktionalität verschwunden ist (Groneberg et al., 2010).

### **3.3.3 Genotypisierung**

Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte im Alter von 18 bis 21 Tagen durch Analyse von Schwanz- und Ohrgewebe. Dazu wurde zunächst das Gewebe nach der HotSHOT Methode lysiert, wie bei Truett et al. (2000) beschrieben. Daraufhin wurden die so erhaltenen Proben mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) aufgearbeitet (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988a; Saiki et al., 1988b). Definierte DNA-Sequenzen können so aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen amplifiziert werden. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch ihre unterschiedliche negative Ladung und Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese horizontal aufgetrennt (Aaij & Borst, 1972). Zur Sichtbarmachung wurde eine Ethidiumbromidfärbung der DNA durchgeführt. Die Agarosegele wurden auf einem UV-Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt und zur Dokumentation wurde ein Bild mit einer CCD-Kamera erstellt.

### **3.4 Organbad**

#### **3.4.1 Präparation der Gewebe für das Organbad**

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Isofluran getötet. Die jeweils zu untersuchenden Organe wurden direkt nach Entnahme aus der Maus in Carbogen-begaste KH-Lösung überführt.

Für Organbadversuche mit gastrointestinalem Gewebe wurde der Magen entnommen. Durch einen Schnitt entlang der Grenze zwischen Fundus und Corpus wurde der Magen geöffnet und durch sanftes Spülen mit KH-Lösung vom Mageninhalt befreit. Der Fundus wurde längs in Streifen geschnitten, die eine Größe von ca. 2 x 4 mm hatten. Diese wurden durch Befestigung an den Haken der Organbadkammern längs eingespannt, was die Untersuchung der Längsmuskulatur ermöglichte.

Für Experimente mit vaskulärem Gewebe wurde die Aorta aus der Maus herauspräpariert und mit KH-Lösung vorsichtig durchspült. Die Aorta wurde von Bindegewebe befreit und in Ringe von je ca. 2 mm Breite geschnitten. Diese wurden über die Haken der Organbadkammern gezogen, wodurch eine Untersuchung der Ringmuskulatur möglich war.

Für die Untersuchung von urogenitalem Gewebe wurden Blase und Urethra als Einheit entnommen und vorsichtig in KH-Lösung von Bindegewebe befreit. Zur Trennung von Blase und Urethra wurde ein Schnitt im unteren Bereich des Blasenhalses gesetzt. Die Blase wurde längs aufgeschnitten und in Streifen einer Größe von ca. 2 x 4 mm unterteilt. Diese wurden längs zur Untersuchung der Längsmuskulatur in die Organbadkammern eingespannt. Zur Betrachtung des urethralen Gewebes wurde von der proximalen Urethra ein Ring mit ca. 2 mm Breite geschnitten, der den internen Blasensphinkter beinhaltete. An dieser Stelle befindet sich auch das Blasenzipfchen, das die Blase gegenüber der Urethra abdichtet und somit der Erhaltung der Kontinenz dient. Analog zu Aorta wurde der Ring zur Untersuchung der Ringmuskulatur über die Haken der Organbadkammern gezogen.

#### **3.4.2 Äquilibrieren und pharmakologische Relaxation der Proben im Organbad**

Für die Untersuchungen wurden zwei 4-Kanal-Multi-Myographen (Modell 610M, Danish Myo Technology) verwendet, deren Kammern jeweils 5 ml KH-Lösung enthielten, die konstant mit Carbogen begast wurden.

Nach der Fixierung der Fundus-Streifen in den Organbadkammern wurden die Gewebe mit einer Vorspannung von 2 - 4 mN für 30 - 45 äquilibriert. Die KH-Lösung wurde bis zum Versuchsbeginn alle 15 min durch frische KH-Lösung ersetzt, um eine Ansammlung von Mukus und Verdauungsenzymen zu vermeiden. Nach der Äquilibrierungsphase wurden die Gewebestücke mit Carbachol (CCh; 0,1  $\mu$ M)

kontrahiert. Im Anschluss an eine stabile Kontraktion erfolgte die Zugabe von Stoffen zur Untersuchung des Relaxationsvermögens.

Die Aorten-Ringe wurden auf 5 mN vorgespannt und mit Hilfe des  $\alpha_1$ -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin (PE; 1  $\mu$ M) in Anwesenheit von Diclofenac (Inhibitor der Cyclooxygenase; 3  $\mu$ M) und L-NAME (Inhibitor der NOS; 200  $\mu$ M) kontrahiert. Bei der endogenen Ausschüttung von NO mittels CCh wurde das Thromboxan  $A_2$ -Analogon U46619 (10 nM) zur Kontraktion verwendet, da es bei diesem Agonisten im Gegensatz zu PE nur zu einer geringen Voraktivierung der NOS kommt; der vorherige Zusatz von Diclofenac und L-NAME blieb hier somit aus. Die Relaxation der Aorten-Ringe wurde erst nach Einstellen eines konstanten Kontraktionsniveaus gestartet.

Blasen-Stücke wurden analog zu Fundus-Gewebe behandelt.

Die Vorspannung von Urethra-Ringen lag zwischen 6 und 9 mN. Um eine konstante Vorspannung zu gewährleisten, lag die Äquilibrierzeit bei mindestens einer Stunde, wobei die KH-Lösung auch hier alle 15 min erneuert wurde. Zur Kontraktion des Gewebes wurden 0,1  $\mu$ M PE verwendet.

Zur Feststellung der vollen Relaxation wurde am Ende aller Versuche 100  $\mu$ M des unspezifischen PDE-Hemmstoffs IBMX in die Organbadkammern gegeben. Dieser Wert wurde zur prozentualen Auswertung der vorangehenden Relaxation herangezogen.

### **3.4.3 Elektrische Feldstimulation (EFS) von Fundus-Gewebe im Organbad**

Die Fundus-Streifen wurden wie für unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben präpariert und in die Organbadkammern eingespannt. In jede der Kammern wurden zwei Platinstabelektroden mit einer Länge von 5 mm eingetaucht, die sich jeweils in einem Abstand von ca. 3 mm zum Gewebe befanden. Durch Anlegen elektrischer Felder (0,5 ms Einzelpulsdauer) von unterschiedlichen Hertzahlen wurde das Fundus-Gewebe stimuliert, wodurch endogen Neurotransmitter ausgeschüttet wurden. Um die inhibitorische Wirkung von NO auf die Kontraktion der Gewebe zu untersuchen, wurden Stimulationen von 10 s in An- und Abwesenheit von ODQ durchgeführt. Dabei wurde nach Hinzufügen des ODQs mindestens 10 min gewartet, bevor eine erneute Stimulation erfolgte, um eine vollständige Inhibition der NO-GC zu gewährleisten. Um die direkte relaxierende Wirkung von NO zu untersuchen, wurden die Fundus-Streifen mit Atropin und Guanethidin (je 1  $\mu$ M) zur Schaffung von nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen (NANC-Bedingungen) für mindestens 20 min vor Beginn der Stimulation inkubiert. Zur Kontraktion wurde daher nicht Carbachol, sondern 100 nM

des Thromboxan  $A_2$ -Analogons U46619 eingesetzt. Die Stimulationen erfolgten bei diesen Versuchen für jeweils 3 s.

### **3.5 Membranpotenzialmessungen**

#### **3.5.1 Präparation der Gewebe für Membranpotenzialmessungen**

Die Entnahme des Fundus erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Nach Entleerung des Mageninhalts, wurde das Gewebe in einer mit Sylgard beschichteten Schale in KH-Lösung mit vier Nadeln zu einem Quadrat aufgespannt. Die zirkuläre Muskulatur wurde freigelegt, indem Mucosa und Submucosa vorsichtig abpräpariert wurden. Mit der zirkulären Muskelschicht nach oben zeigend wurde daraufhin ein Gewebestück von ca. 4 x 10 mm in einer mit Silikon ausgelegten Kammer mit kleinen Nadeln aufgespannt. Die Kammer wurde durch ein Wasserbad auf 37°C erwärmt und das Gewebe mit KH-Lösung (37°C, mit Carbogen begast) konstant perfundiert (Flussrate 3 ml/min).

Für Versuche mit Colon-Gewebe wurde das gesamte Colon entnommen, indem ein Schnitt am Übergang Caecum-Colon und ein weiterer Schnitt im Rektum gesetzt wurde. Für die Versuche wurde ausschließlich der proximale Teil des Colons verwendet, der sich im Gegensatz zur längsgestreiften Schleimhaut des distalen Colons durch eine schräggestreifte Schleimhaut auszeichnet, wie es in der Ratte von Lindström et al. (1979) gezeigt wurde. Der Darmschlauch wurde entlang des Mesocolons geöffnet und vorsichtig von Mucosa und Submucosa befreit. Das so präparierte Gewebestück (ca. 4 x 10 mm) wurde wie Fundus-Gewebe in die mit Silikon ausgelegte Messkammer eingespannt. Der Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 9 dargestellt. Nach mindestens eine Stunde Äquilibration wurde das Membranpotenzial von zirkulären Muskelzellen mit scharfen Glaselektroden (30 - 50 M $\Omega$ ), die mit 3 M KCl luftblasenfrei befüllt waren, bestimmt. Die Messung wurde mit einem Elektrometer (DUO 773) vorgenommen. Die Signale wurde auf einem Oszilloskop (40 MHz) abgebildet und gleichzeitig mit einem PowerLab System (PowerLab 4/25, 10kHz) und der Chart Software für Windows digitalisiert.

#### **3.5.2 Messung von „Inhibitory junction potentials“ (IJP)**

Die aufgespannten gastrointestinalen Gewebestücke wurden mit KH-Lösung versorgt, die mit Atropin (muskarinerges Achetylcholinrezeptorantagonist; 1  $\mu$ M), Propranolol (unspezifischer Betablocker; 1  $\mu$ M) sowie Phentolamin (unspezifischer Alphablocker; 1  $\mu$ M) versetzt war. Dadurch wurden exzitatorische Antworten auf elektrische Feldstimulation (EFS) unterbunden. Nifedipin (L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanalblocker; 1  $\mu$ M) wurde hinzugefügt, um Kontraktionen des Gewebes und damit Bewegungs-abhängige



**Abb. 9: Aufbau des Mikroelektroden-Messtandes**

Rechts im Bild sind die zwei Messkammern zu erkennen, in die mit Hilfe des Binokulars die Gewebeprouen eingespannt werden. In der Mitte sind die Stimulations- und Messgerate angeordnet (Oszilloskop, Stimulator, Elektrometer). Links steht der Computer, auf dem die Aufzeichnungen mittels eines PowerLab Systems erfolgen.

Messartefakte bei der Membranpotenzialbestimmung zu verhindern. Der Zusatz von Nifedipin hatte dabei keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotenzial (RMP) sowie die Qualität und Quantität der Hyperpolarisationen nach elektrischer Stimulation. Durch Anlegen von elektrischen Feldern wurden vorübergehende Hyperpolarisationen induziert, die als „inhibitory junction potentials“ (IJP) bezeichnet werden. Dazu wurden zwei Silberchlorid-Elektroden 1,5 cm voneinander entfernt und rechtwinklig zu dem longitudinal gespannten Gewebestück in die Messkammer getaucht. Die Stimulation wurde mit einer Pulsdauer von 0,9 ms bei einer Frequenz von 10 Hz und einer Spannung von 90 V mittels eines Stimulators (Grass S48 Stimulator) durchgeführt. Zwischen Stimulator und Stimulationselektroden wurde eine Isolationseinheit (Grass SIU5) geschaltet, um Stimulationsartefakte zu minimieren und die Sicherheit beim Anlegen hoher Spannungen zu verbessern.

### **3.6 *In vivo*-Messungen**

#### **3.6.1 Darmpassagezeit**

Zur Bestimmung der Darmpassagezeit von Mäusen wurden jeder Maus 50 µl einer Carmin-Farbstoff-Lösung oral mit einer Schlundsonde in den Magen verabreicht. Anschließend wurden die Tiere jeweils einzeln in Käfige mit einem weißen Blatt Papier und freiem Zugang zu Wasser und Futter gesetzt. Die Darmpassagezeit entsprach dabei der Zeit ab der Applikation des Farbstoffs bis zur Exkretion des ersten roten Fäzes.

## 4. Ergebnisse

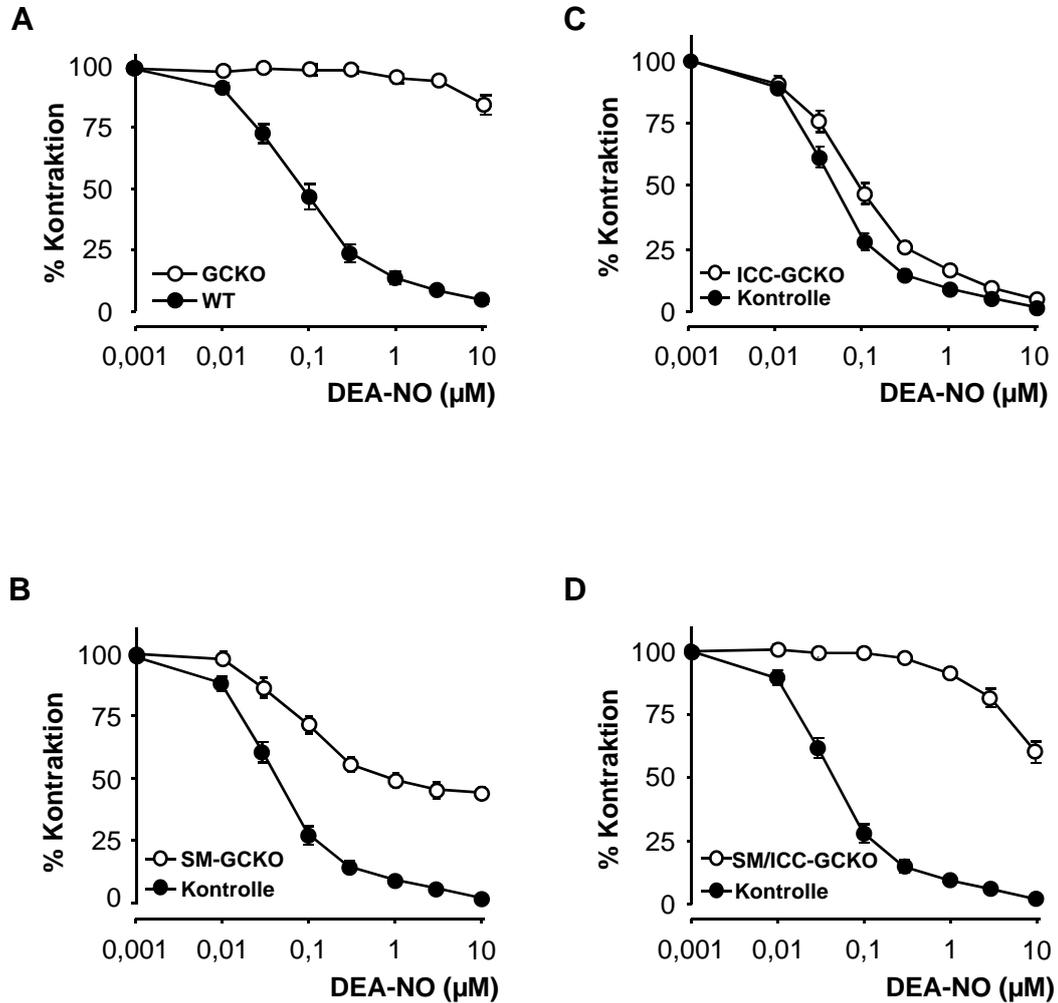
---

### 4.1 Funktion der NO-GC in Zellen des Gastrointestinaltrakts

GCKO-Tiere zeigen erhebliche Störungen gastrointestinaler Funktionen. Diese äußern sich unter anderem in einer verlangsamten Motilität, die zu einer erhöhten Sterblichkeit führt. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die NO-GC im Gastrointestinaltrakt in mindestens drei verschiedenen Zellen exprimiert wird: glatte Muskelzellen (SMC), interstitielle Zellen von Cajal (ICC) und Fibroblasten-ähnliche Zellen (FLC) (Groneberg et al., 2011). Es wurden daraufhin Untersuchungen mit Mäusen durchgeführt, bei denen die NO-GC ubiquitär (GCKO) sowie spezifisch in SMC (SM-GCKO), ICC (ICC-GCKO) oder in beiden Zelltypen (SM/ICC-GCKO) ausgeschaltet ist (Groneberg et al., 2013). Versuche zur NO-induzierten Relaxation im Organbad zeigten dabei, dass DEA-NO beim WT-Fundus zu einer konzentrationsabhängigen, vollständigen Relaxation führte, während GCKO-Fundus-Streifen keine NO-induzierte Relaxation aufwiesen (Abbildung 10 A). Fundus-Streifen von SM-GCKO-Tieren zeigten nur noch eine 50%ige Relaxation (Abbildung 10 B). ICC-GCKO-Fundus-Gewebe konnte überraschenderweise vollständig relaxiert werden, zeigte jedoch eine Rechtsverschiebung der DEA-NO-Konzentrations-Wirkungskurve (Abbildung 10 C), was auf eine geringere Sensitivität gegenüber DEA-NO hinwies. SM/ICC-GCKO-Tiere wiesen eine stark eingeschränkte Relaxation infolge von DEA-NO-Gabe auf. Erst ab 3  $\mu\text{M}$  DEA-NO trat dort eine leichte Relaxation ein (Abbildung 10 D).

In Fortführung der vorangegangenen Arbeiten sollte innerhalb dieses Projektes zunächst ein FLC-spezifischer GCKO und, durch Kreuzung der Linien, Doppel-GCKO-Tiere (FLC + SM, FLC + ICC) sowie eine Tripel-GCKO-Linie generiert werden. Hierzu wurde eine Maus in die flox/flox- $\beta_1$ -Linie eingekreuzt, die das Gen der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des PDGF-Rezeptor  $\alpha$ -Promotors trug, da die Expression dieses Rezeptors in den FLC des gastrointestinalen Gewebes bereits nachgewiesen wurde (Iino et al., 2009a; Sanders et al., 2010; Kurahashi et al., 2011). Homozygot gefloxt, PDGFR $\alpha$ -Cre-positive Mäuse wurden intraperitoneal mit Tamoxifen gespritzt (FLC-GCKO) und nach 50 Tagen zu Untersuchungen eingesetzt. Zusätzlich wurden PDGFR $\alpha$ -Cre-positive Mäuse mit SM-GCKO-Tieren (SMMHC-Cre) und ICC-GCKO-Tieren (ckit-Cre) verpaart, um FLC/SM-GCKO-, FLC/ICC-GCKO- sowie Tripel-GCKO-Mauslinien zu erhalten. Alle diese erwähnten Mauslinien wurden mit Tamoxifen behandelt und nach 50 Tagen zu verschiedenen Experimenten eingesetzt.

## NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen I



**Abb. 10: NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen I**

Fundus-Streifen der verschiedenen NO-GC-Knockout-Tiere wurden mit 0,1 µM CCh vorkontrahiert. Anschließend erfolgte eine Relaxation mit DEA-NO. Die Daten entstammen den bereits publizierten Ergebnissen aus Groneberg et al. (2013).

**A)** GCKO- und WT-Mäuse

**B)** SM-GCKO- und Kontroll-Mäuse

**C)** ICC-GCKO- und Kontroll-Mäuse

**D)** SM/ICC-GCKO- und Kontroll-Mäuse

Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n=6 pro Genotyp.

#### **4.1.1 DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen**

Nach der Generierung der FLC-GCKO-Tiere sollte bei diesen Tieren die NO-induzierte Relaxation von Fundus-Gewebe untersucht werden. Der Fundus des Magens eignet sich sehr gut für Organbadversuche, da dieses Gewebe keine Schrittmacherzellen aufweist; somit sind die Kraftmessungen im Organbad nicht durch Schrittmacher-induzierte Eigenkontraktionen des Gewebes gestört.

Fundus-Streifen der FLC-GCKO-Tiere wurden ins Organbad eingespannt und mit 0,1  $\mu$ M Carbachol kontrahiert. Überraschenderweise relaxierten die Gewebe von FLC-GCKO-Tieren durch DEA-NO-Applikation vollständig. Die Relaxation stimmte mit der von WT-Fundus-Streifen überein (Abbildung 11 A vgl. mit Abbildung 10 A).

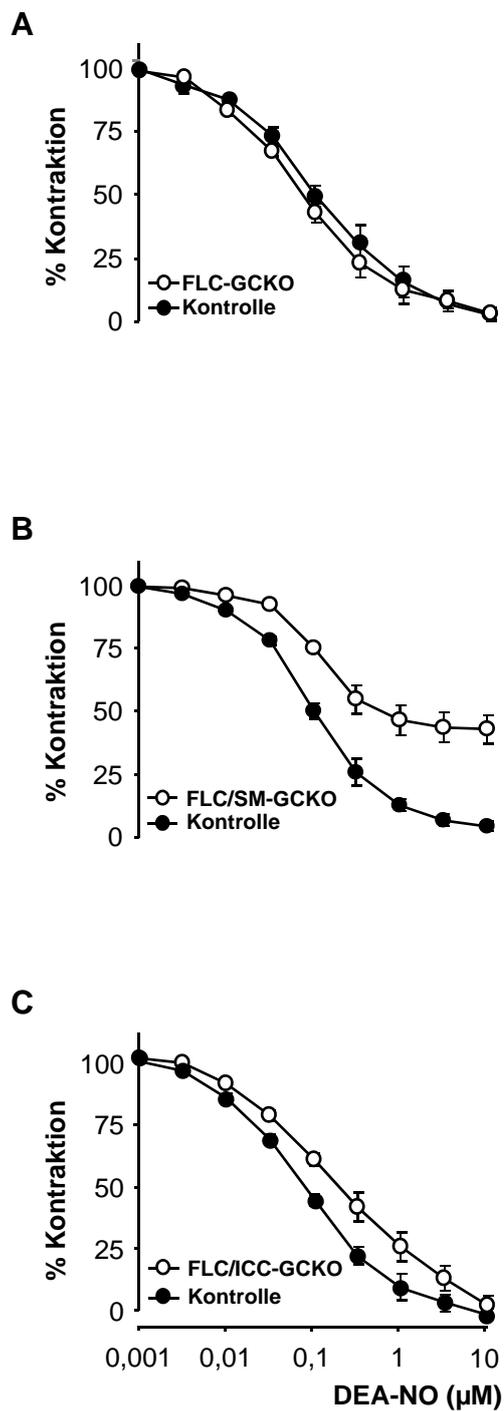
Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Doppel-GCKO-Tiere. Untersuchungen mit Fundus-Streifen von FLC/SM-GCKO zeigten eine 50%ige Relaxation infolge von DEA-NO-Applikation, die der des SM-GCKO gleich (Abbildung 11 B vgl. mit Abbildung 10 B). Gabe von DEA-NO zu Fundus-Streifen von FLC/ICC-GCKO-Tieren verursachte eine vollständige Relaxation, wobei die Dosis-Wirkungskurve leicht nach rechts verschoben war, und somit den Ergebnissen von ICC-GCKO-Tieren ähnelte (Abbildung 11 C vgl. mit Abbildung 10 C). Diese Ergebnisse ließen zunächst keinen Rückschluss auf die Funktion der NO-GC in FLC zu.

Abbildung 12 A zeigt eine Originalkurve von Fundus-Streifen eines Tripel-GCKOs. Die Auswertung lässt erkennen, dass Fundus-Gewebe von Tripel-GCKO-Tieren nach DEA-NO-Gabe nicht mehr relaxiert (Abbildung 12 B); dies entsprach den Ergebnissen aus GCKO-Tieren (siehe Abbildung 10 A). Die NO-GC in FLC führte unter diesen Bedingungen also ausschließlich in Kombination mit dem Knockout der NO-GC in den beiden weiteren NO-GC-haltigen Zellen zu einem funktionellen Effekt.

#### **4.1.2 Elektrische Feldstimulation von Fundus-Streifen**

Um nicht nur die Reaktion der Gewebe auf pharmakologisch appliziertes NO zu beobachten, wurden elektrische Feldstimulationen (EFS) durchgeführt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden endogen Neurotransmitter freigesetzt. Dies ermöglicht einen Versuchsansatz, der den physiologischen Bedingungen näher liegt. Um gezielt die Wirkung endogen produzierten NOs zu untersuchen, wurde die EFS-induzierte Relaxation unter NANC-Bedingungen durchgeführt. Das Protokoll beinhaltete dabei zunächst Stimulationen von 0,5 bis 4 Hz. In Fundus-Gewebe aus WT tritt mit steigender Hertzzahl eine stärker werdende Relaxation ein (Abbildung 13 A). In Folge wurde das Protokoll in der Anwesenheit des NO-Sensitizers Bay 41-2272 wiederholt. Dieser verstärkt die cGMP-abhängige Relaxation und erlaubt damit eine eindeutige Auswertung der cGMP-abhängigen Effekte. Ohne Bay 41-2272 lag die

## NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen II



**Abb. 11: NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen II**

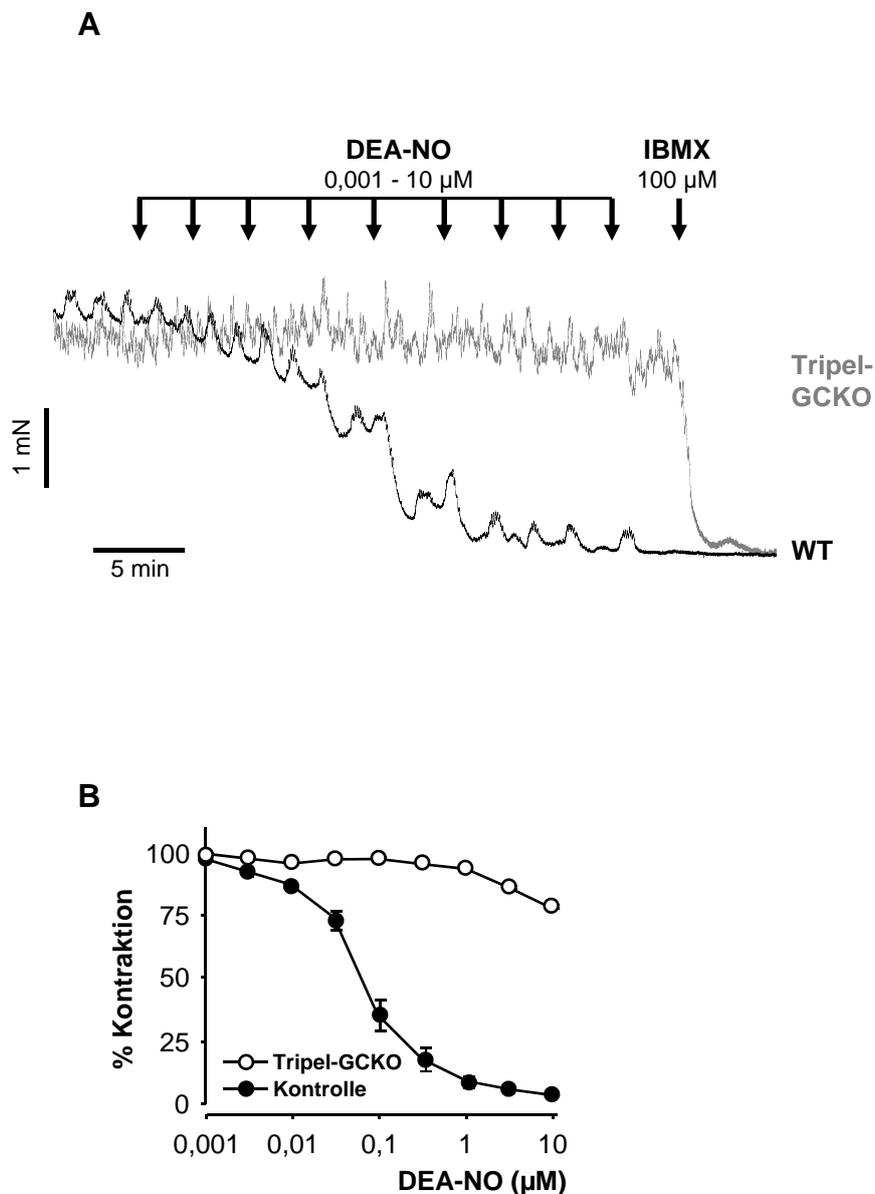
Fundus-Streifen der verschiedenen NO-GC-Knockout-Tiere wurden mit 0,1  $\mu\text{M}$  CCh vorkontrahiert. Anschließend erfolgte eine Relaxation mit DEA-NO.

A) FLC-GCKO- und Kontroll-Mäuse

B) FLC/SM-GCKO- und Kontroll-Mäuse

C) FLC/ICC-GCKO- und Kontroll-Mäuse

Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n=6 pro Genotyp.

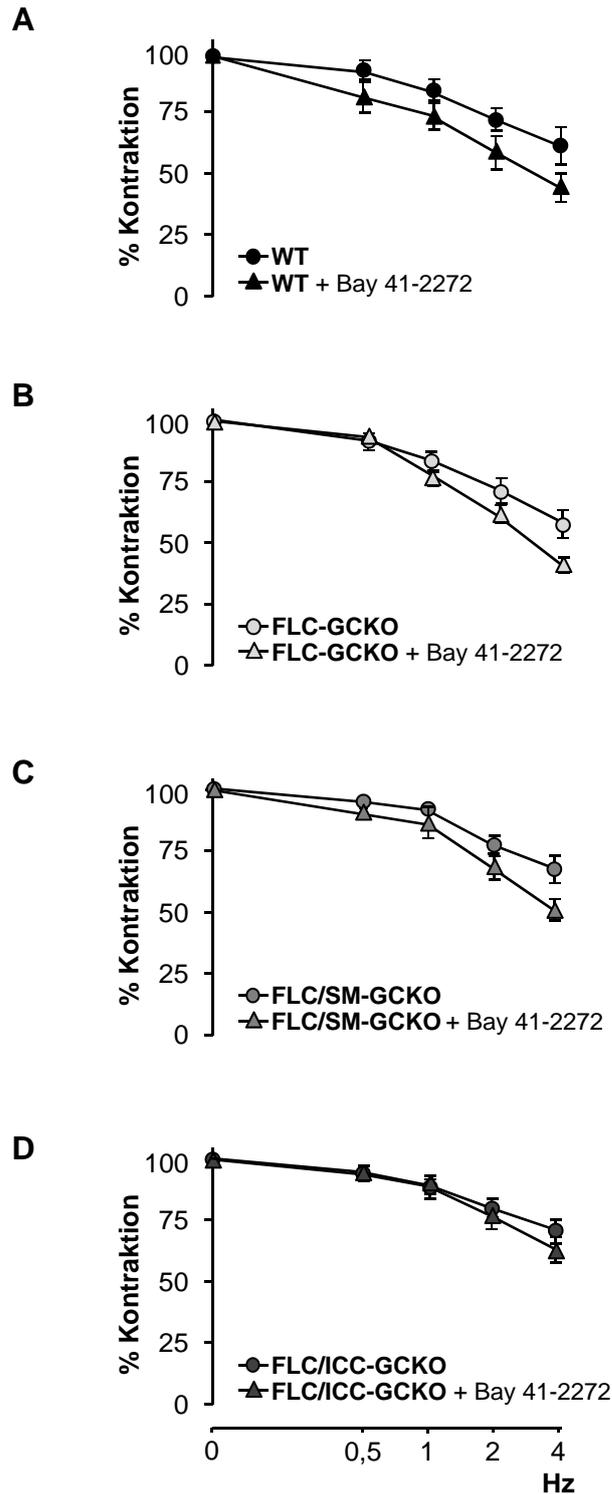


**Abb. 12: NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen III**

**A)** Originalkurven der DEA-NO-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen eines Tripel-GCKO- und eines Kontroll-Tieres. Fundus-Streifen wurden mit 0,1 µM CCh vorkontrahiert und anschließend mit DEA-NO (0,001 – 10 µM) relaxiert. IBMX-Zugabe (100 µM) führte zum Schluss des Experiments zu maximaler Relaxation.

**B)** Statistische Auswertung der DEA-NO-induzierten Relaxation in Fundus-Streifen aus Tripel-GCKO- und Kontroll-Tieren. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=4 pro Genotyp.

## EFS-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen



**Abb. 13: EFS-induzierte Relaxation von Fundus-Streifen**

Fundus-Streifen wurden unter NANC-Bedingungen mit 100 nM U46619 kontrahiert. Anschließend wurde durch EFS (10 V; 0,5 ms; 0,5 - 4 Hz) in An- und Abwesenheit des NO-GC-Sensitizers Bay 41-2272 die Relaxation von Fundus-Streifen aus

- A) WT-Tieren,
- B) FLC-GCKO-Tieren,
- C) FLC/SM-GCKO-Tieren und
- D) FLC/ICC-GCKO-Tieren induziert.

Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n=6 pro Genotyp.

maximale Relaxation (4 Hz-Stimulation) im WT bei ca. 40%; dieser Wert stieg in Anwesenheit von Bay 41-2272 um 25% an (Abbildung 13 A). Gleiche Ergebnisse wurden auch für Fundus-Gewebe aus FLC-GCKO- und FLC/SM-GCKO-Tieren gemessen (Abbildungen 13 B+C). Fundus-Streifen aus FLC/ICC-GCKO-Tieren hingegen wiesen bei gleicher Stimulation eine geringere Relaxation von lediglich 30% auf, die durch Inkubation mit dem NO-Sensitizer Bay 41-2272 nur um 16% gesteigert werden konnte (Abbildung 13 D). Dies lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein der NO-GC in FLC und ICC eine wesentliche Rolle bei der durch endogenes NO induzierten Relaxation hat.

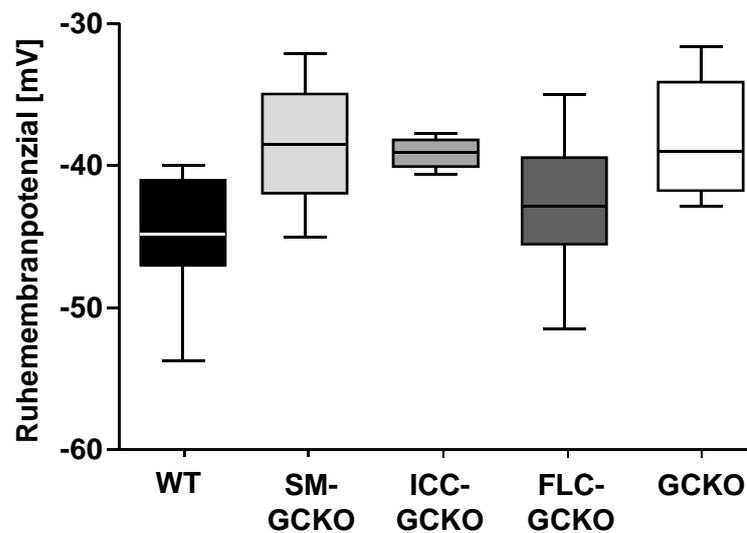
#### **4.1.3 Membranpotenzialmessungen im proximalen Colon**

Als nächstes sollten Membranpotenzialmessungen in glatten Muskelzellen (SMC) des Gastrointestinaltrakts am Beispiel von proximalem Colon-Gewebe durchgeführt werden. Dabei wurde sowohl das Ruhemembranpotenzial als auch die ‚Inhibitory junction potentials‘ (IJP) in SMC bestimmt. In der Literatur wird proximales Colon-Gewebe standardmäßig für diese Untersuchungen verwendet. Die Effekte von elektrischer Stimulation sind in diesem Gewebe bereits detailliert untersucht worden. Fundus-Gewebe hingegen wird für Membranpotenzialmessungen eher selten benutzt. Der Grund dafür ist, dass im Fundus kleinere SMC vorliegen und das Gewebe eine größere Festigkeit aufweist. Ein stabiles und erfolgreiches Eindringen einer Mikroelektrode in SMC (‚impalement‘) gelingen in Fundus-Gewebe daher nur gelegentlich und benötigen viel Zeit. Die Messungen in Fundus-SMC befinden sich momentan in Arbeit.

##### **4.1.3.1 Ruhemembranpotenzial im proximalen Colon**

Das Membranpotenzial der SMC in proximalem Colon wurde ermittelt, indem eine hochohmigen Mikroelektrode ( $>30 \text{ M}\Omega$ ) in eine SMC gestochen wurde. Das Ruhemembranpotenzial (RMP) wurde daraufhin aus dem Mittelwert der Membranpotenzialmessungen einer Zelle über ca. 30 s errechnet. Dabei wurden lediglich die Membranpotenziale von Zellen verwendet, die nach elektrischer Stimulation ein IJP zeigten. In Abbildung 14 ist die Verteilung der RMP der einzelnen Knockout-Tiere in Boxplots aufgetragen. Das RMP von SMC in WT-Colon lag bei  $-45 \pm 1,3 \text{ mV}$  (11 Zellen aus 4 Tieren). SMC von NO-GC-Knockout-Tieren zeigten ein depolarisiertes RMP: dieses lag bei  $-39 \pm 1,4 \text{ mV}$  (SM-GCKO-Colon; 16 Zellen aus 4 Tieren),  $-39 \pm 0,6 \text{ mV}$  (ICC-GCKO-Colon; 4 Zellen aus 2 Tieren) und  $-38,5 \text{ mV} \pm 1,1 \text{ mV}$  (GCKO-Colon; 13 Zellen aus 3 Tieren). SMC in FLC-GCKO-Colon zeigten ein RMP von  $-43 \pm 1,3 \text{ mV}$  (17 Zellen aus 3 Tieren) und ließen daher keinen signifikanten

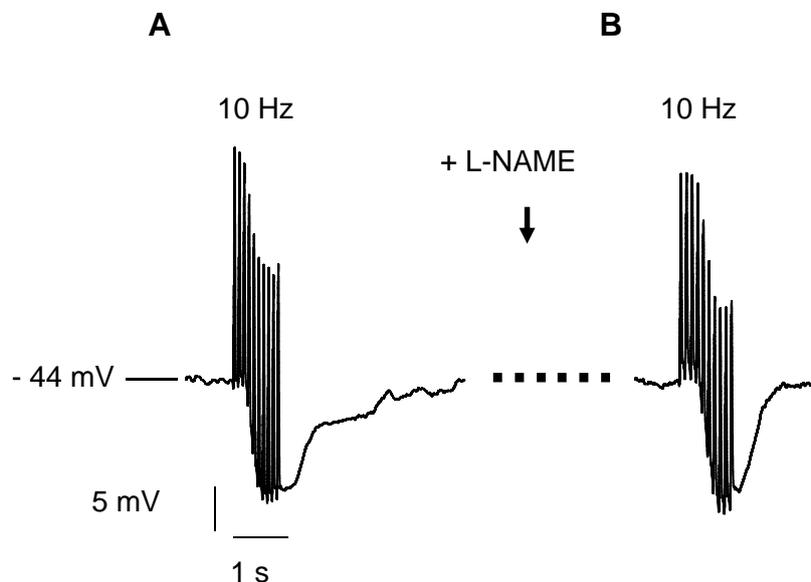
## Ruhemembranpotenzial in SMC des proximalen Colons



### Abb. 14: Ruhemembranpotenzial in SMC des proximalen Colons

Ruhemembranpotenziale in proximalem Colon-Gewebe wurden bestimmt aus WT- ( $-45 \pm 1,3$  mV; 11 Zellen aus 4 Tieren), SM-GCKO- ( $-39 \pm 1,4$  mV; 16 Zellen aus 4 Tieren), ICC-GCKO- ( $-39 \pm 0,6$  mV; 4 Zellen aus 2 Tieren), FLC-GCKO- ( $-43 \pm 1,3$  mV; 17 Zellen aus 3 Tieren) und GCKO-Tieren ( $-38,5$  mV  $\pm$  1,1 mV; 13 Zellen aus 3 Tieren). Der Strich innerhalb der Box stellt jeweils den Median dar.

## ‚Inhibitory junction potentials‘ in WT-Colon



### Abb. 15: ‚Inhibitory junction potentials‘ in WT-Colon

Messung von IJPs in WT-Colon durch elektrische Stimulation (90 V; 0,9 ms; 10 Hz) vor (A) und nach (B) Inkubation mit L-NAME (200  $\mu$ M). Die langsame Komponente des IJPs war nach L-NAME-Gabe nicht mehr detektierbar, was auf ihren nitrogen Ursprung hinweist.

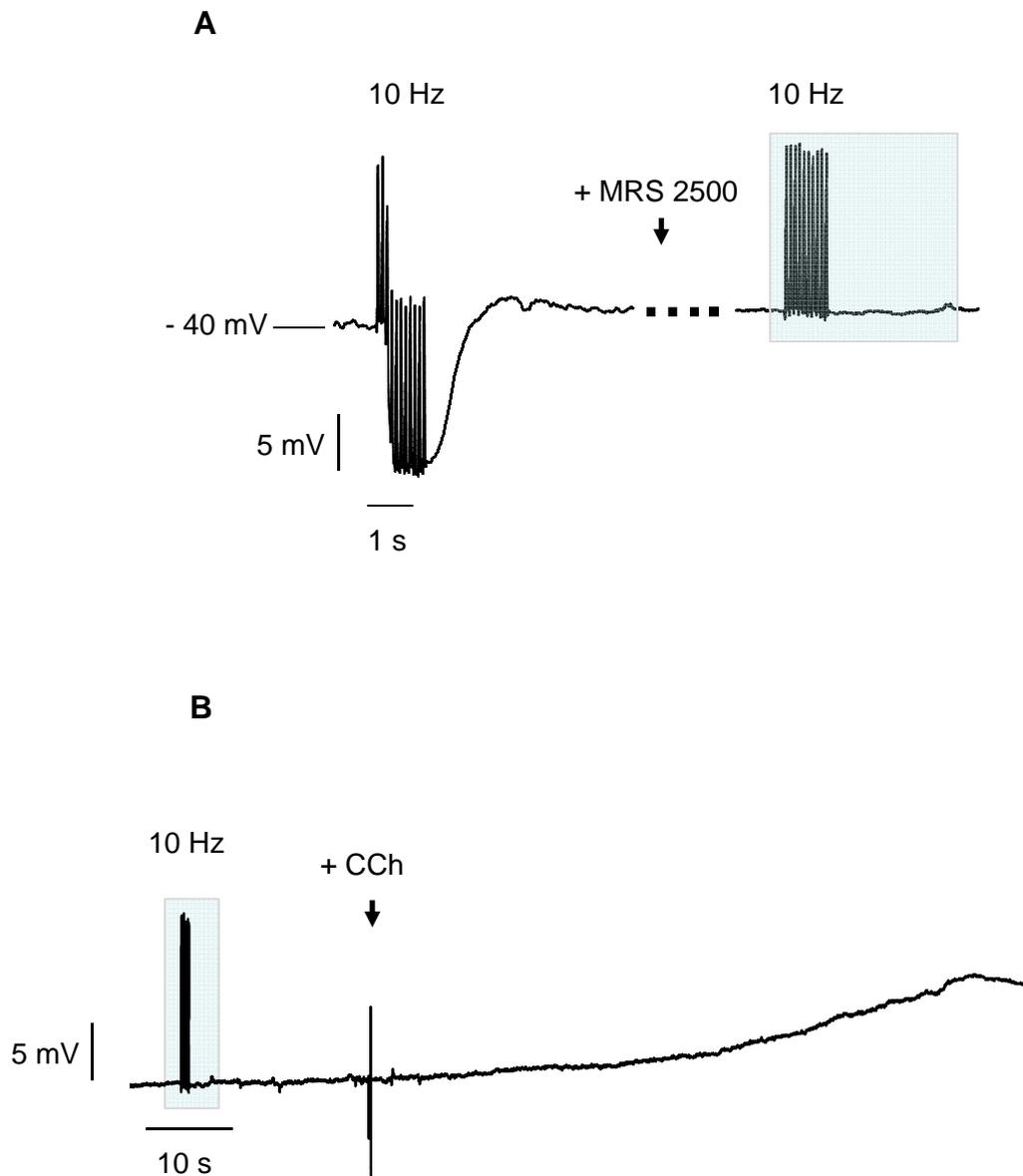
Unterschied zu SMC in WT-Colon erkennen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die NO-GC vor allem in SMC und ICC eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des RMP von SMC in proximalem Colon-Gewebe einnimmt. Die NO-GC in FLC dagegen scheint in diesem Zusammenhang keinen wesentlichen Einfluss auf das RMP zu haben.

#### **4.1.3.2 ‚Inhibitory junction potentials‘ in WT- und GCKO-Colon**

Als IJPs werden Hyperpolarisationen der SMC bezeichnet, die durch elektrische Stimulationen bei gleichzeitiger Blockade der exzitatorischen Neurotransmission im Gastrointestinaltrakt hervorgerufen werden können. Im proximalen Colon bestehen sie aus einer schnellen und einer langsamen Komponente (Keef et al., 1993; Pluja et al., 1999; Gallego et al., 2008). Weiterhin wurde gezeigt, dass die schnelle Komponente P2Y(1)-Rezeptor-vermittelt und somit purinerg ist (Fernandez et al., 1998; Gallego et al., 2006; Wang et al., 2007; Grasa et al., 2009), während die langsame Komponente durch NOS vermittelt wird und folglich nitrergen Ursprungs ist (Keef et al., 1993; Mashimo et al., 1996; Pluja et al., 1999).

In Abbildung 15 A ist eine Originalaufnahme eines IJPs in SMC von proximalem WT-Colon nach elektrischer Stimulation (90 V; 0,9 ms; 10 Hz) zu sehen. Das IJP bestand, wie aus der Literatur bekannt, aus einer schnellen und einer langsamen Hyperpolarisation. Die langsame Komponente des IJPs konnte durch Inkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NAME vollständig ausgeschaltet werden (Abbildung 15 B), was ihren nitrergen Ursprung bestätigt. Aus diesem Grund wird im Folgenden die langsame Komponente des IJPs als nitrerges IJP bezeichnet.

In SMC des proximalen Colon-Gewebes aus GCKO-Tieren war nur noch die schnelle Komponente des IJPs messbar (Abbildung 16 A). Durch Inkubation mit MRS 2500, einem P2Y(1)-Rezeptorantagonisten, wurde das schnelle IJP vollständig geblockt. Um sicherzugehen, dass die Messelektrode nach Zugabe von MRS 2500 noch in der Zelle war, wurde nach der elektrischen Stimulation Carbachol in die Messkammer gegeben. Abbildung 16 B zeigt die in Abbildung 16 A abgebildete 10 Hz-Stimulation nach MRS 2500-Applikation sowie die anschließende Zugabe von Carbachol und die darauf eintretende Depolarisation. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die schnelle Komponente des IJP in proximalem Colon-Gewebe von GCKO-Tieren erhalten ist und ausschließlich purinerg vermittelt wird.



**Abb. 16:** „Inhibitory junction potentials‘ in GCKO-Colon

**A)** Messung von IJPs in GCKO-Colon durch elektrische Stimulation (90 V; 0,9 ms; 10 Hz) vor und nach Inkubation mit MRS 2500 (1  $\mu$ M). Die schnelle Komponente der IJPs war in GCKO-Colon erhalten und konnte durch MRS 2500 vollständig geblockt werden.

**B)** Der blaue Kasten stellt die 10 Hz-Stimulation aus Abbildung 16 A in gestauchter Form dar. Da nach Inkubation mit MRS 2500 (1  $\mu$ M) in GCKO-Colon kein IJP mehr ausgelöst werden konnte, wurde Carbachol (CCh) in die Messkammer appliziert. Die nachfolgende Depolarisation zeigte an, dass die Messelektrode noch korrekt in der Zelle fixiert war.

#### **4.1.3.3 ‚Inhibitory junction potentials‘ in SM-, ICC-, und FLC-GCKO-Colon**

Die Messung der IJPs in Colon-Gewebe aus SM-GCKO-, ICC-GCKO- und FLC-GCKO-Tieren zeigten, dass das nitrerge IJP in allen drei KO-Linien noch erhalten ist (Abbildungen 17 A-C). Das Ausschalten der NO-GC in lediglich einem der drei Zelltypen reicht demnach nicht aus, um das nitrerge IJP zu eliminieren. Die Stärke und Dauer der IJPs in den einzelnen Knockout-Geweben variierten allerdings, was in der statistischen Auswertung deutlich wird.

#### **4.1.3.4 Statistische Analyse der ‚Inhibitory junction potentials‘ im Colon**

Um die nitrergen IJPs in Colon-Gewebe auszuwerten, wurden zum einen die Stärke (Abbildung 18 A) und zum anderen die Dauer der Hyperpolarisation (Abbildung 18 B) gemessen.

Das nitrerge IJP lag im WT-Colon bei einem Wert von  $-7,8 \pm 0,4$  mV (6 Zellen aus 3 Tieren). Colon-Gewebe von SM- und FLC-GCKO zeigten mit  $-9,1 \pm 0,5$  mV (7 Zellen aus 3 Tieren) und  $-7,5 \pm 0,2$  mV (7 Zellen aus 4 Tieren) vergleichbare Werte zum WT. Lediglich Colon-Gewebe von ICC-GCKO-Tieren erwies ein deutlich vermindertes nitrerges IJP mit  $-2,2 \pm 0,5$  mV (5 Zellen aus 2 Tieren).

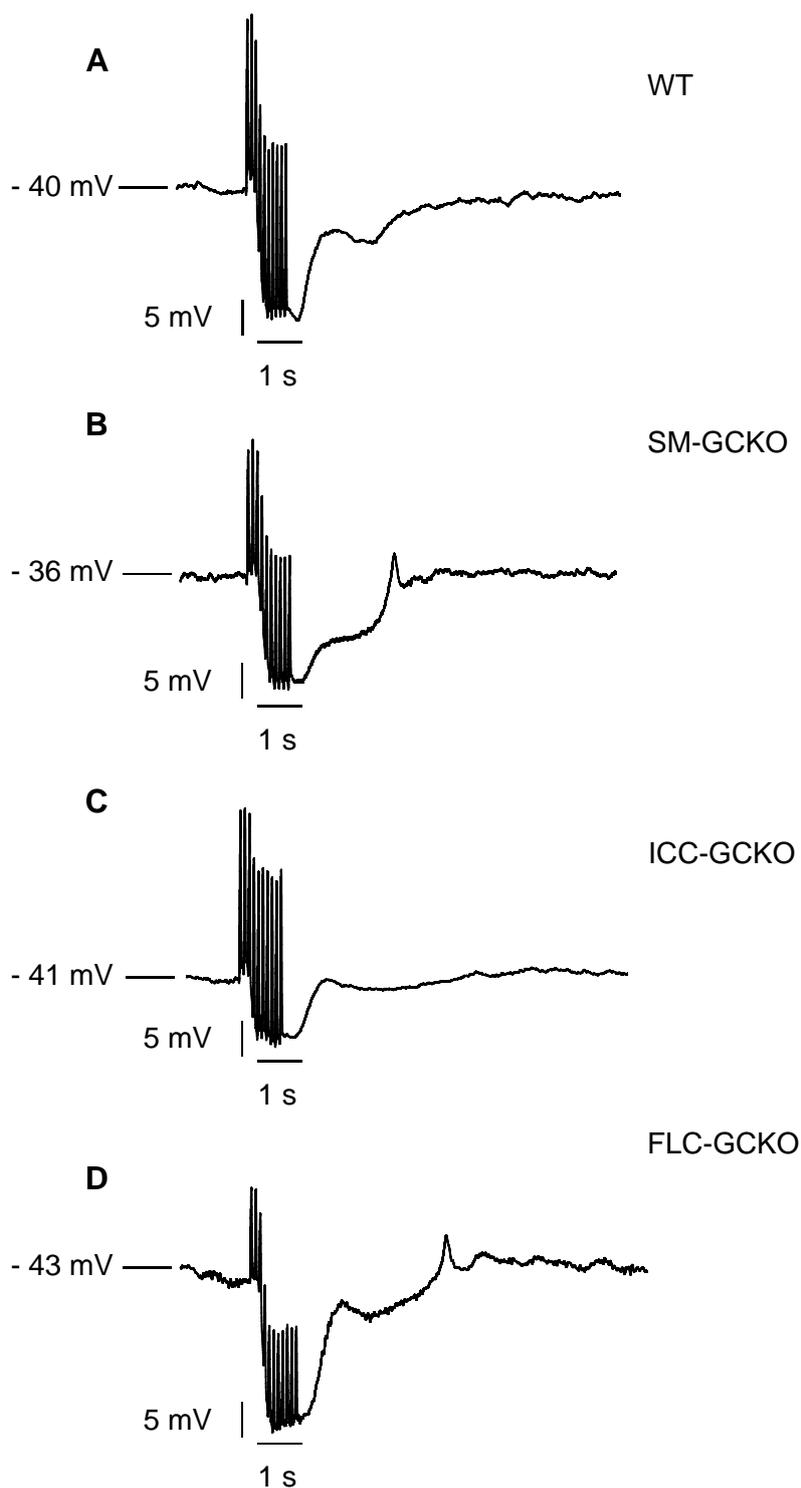
Die Dauer des nitrergen IJPs lag im WT-Colon bei  $4,4 \pm 0,1$  s (5 Zellen aus 3 Tieren). Bei Colon-Gewebe von ICC- und FLC-GCKO wurden Werte von  $4,6 \pm 0,4$  s (4 Zellen aus 2 Tieren) bzw.  $3,6 \pm 0,6$  s (9 Zellen aus 4 Tieren) ermittelt. Stark verringert war die Dauer des nitrergen IJPs in Colon-Gewebe aus SM-GCKO-Tieren mit  $2,7 \pm 0,2$  s (8 Zellen aus 3 Tieren).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das nitrerge IJP im Colon in zwei Phasen unterteilt werden kann. Dabei würde die erste Phase hauptsächlich durch die NO-GC in ICC vermittelt (Stärke des IJP in SM-GCKO und FLC-GCKO erhalten, in ICC-GCKO vermindert), wohingegen die zweite Phase hauptsächlich durch die NO-GC in SMC bestimmt würde (Dauer des IJP in ICC-GCKO und FLC-GCKO erhalten, in SM-GCKO verkürzt).

#### **4.1.4 *In vivo*-Messung der Darmpassagezeit**

Um die physiologischen Auswirkungen der NO-GC-Deletion in den FLC-, FLC/SM-, FLC/ICC- sowie Tripel-GCKO-Tieren zu betrachten, wurden die Darmmotilitäten der Tiere untersucht (Abbildung 19). Hierzu wurde die Darmpassagezeit bestimmt, die bei WT-Tieren bei ca. 170 min lag. Überraschenderweise war diese in FLC-GCKO-Tieren gegenüber WT-Tieren verringert (ca. 150 min). Auch FLC/SM-GCKO-Tiere und Tripel-GCKO-Tiere zeigten eine kürzere Darmpassagezeit zum WT (beide ca. 145 min). Nur bei FLC/ICC-GCKO-Tieren war die Darmpassagezeit mit ca. 220 min deutlich erhöht.

## „Inhibitory junction potentials“ in SM-, ICC und FLC-GCKO-Colon



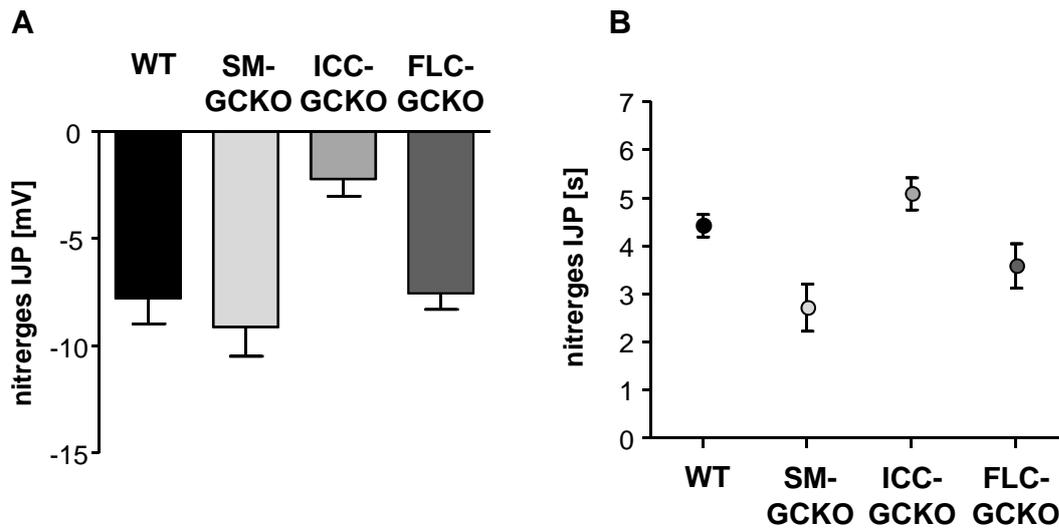
### Abb. 17: „Inhibitory junction potentials“ in SM-, ICC- und FLC-GCKO-Colon

In allen drei Einzelzell-spezifischen NO-GC-Knockout-Tieren waren sowohl die schnelle als auch die langsame Komponente des IJPs noch erhalten. Gezeigt ist das IJP nach elektrischer Stimulation (90 V; 0,9 ms; 10 Hz) in

- A) WT-Colon,
- B) SM-GCKO-Colon,
- C) ICC-GCKO-Colon und
- D) FLC-GCKO-Colon.

Die entsprechenden Ruhemembranpotenziale sind gegeben.

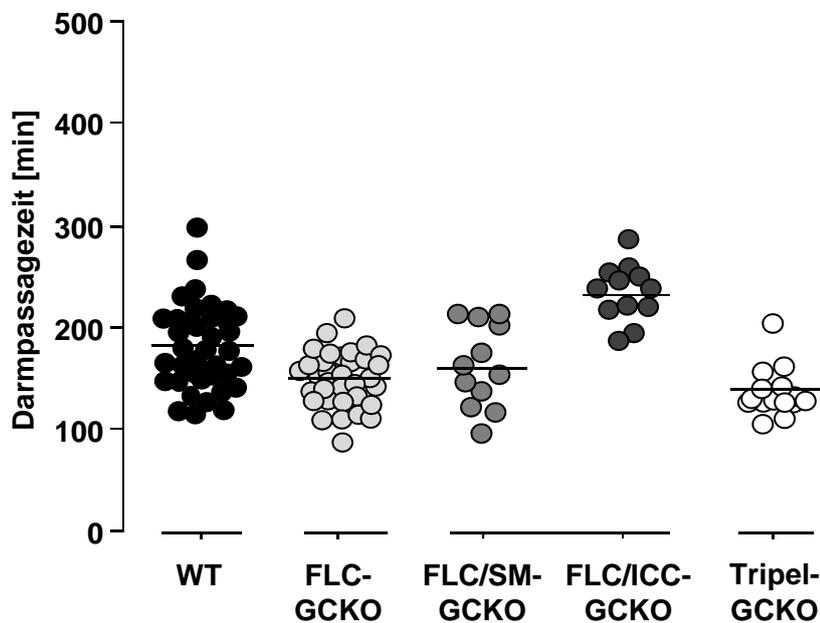
## Stärke und Dauer der nitrogenen ‚Inhibitory junction potentials‘



**Abb. 18: Stärke und Dauer der nitrogenen ‚Inhibitory junction potentials‘**

Auswertung der Stärke (A) und der Dauer (B) der nitrogenen IJPs in proximalem Colon-Gewebe aus WT-, SM-GCKO-, ICC-GCKO- und FLC-GCKO-Tieren. SMC aus ICC-GCKO-Colon zeigten ein reduziertes nitrogenes IJP bei erhaltener Dauer, während SMC aus SM-GCKO-Colon ein unverändert starkes IJP aufwiesen, das verkürzt war.

## In vivo-Messung der Darmpassagezeit



**Abb. 19: Messung der Darmpassagezeit**

Um die Darmpassagezeit der Nahrung zu messen, wurde den Mäusen (WT, FLC-GCKO, FLC/SM-GCKO, FLC/ICC-GCKO, Tripel-GCKO) ein roter Farbstoff (Carmin) mit einer Magensonde in den Magen appliziert. Die Zeit bis zum ersten austretenden rotgefärbten Kot wurde gemessen. FLC-GCKO-, FLC/SM-GCKO- sowie Tripel-GCKO-Tiere zeigten eine verringerte, FLC/ICC-GCKO-Tiere eine verlängerte Darmpassagezeit im Vergleich zu WT-Mäusen.

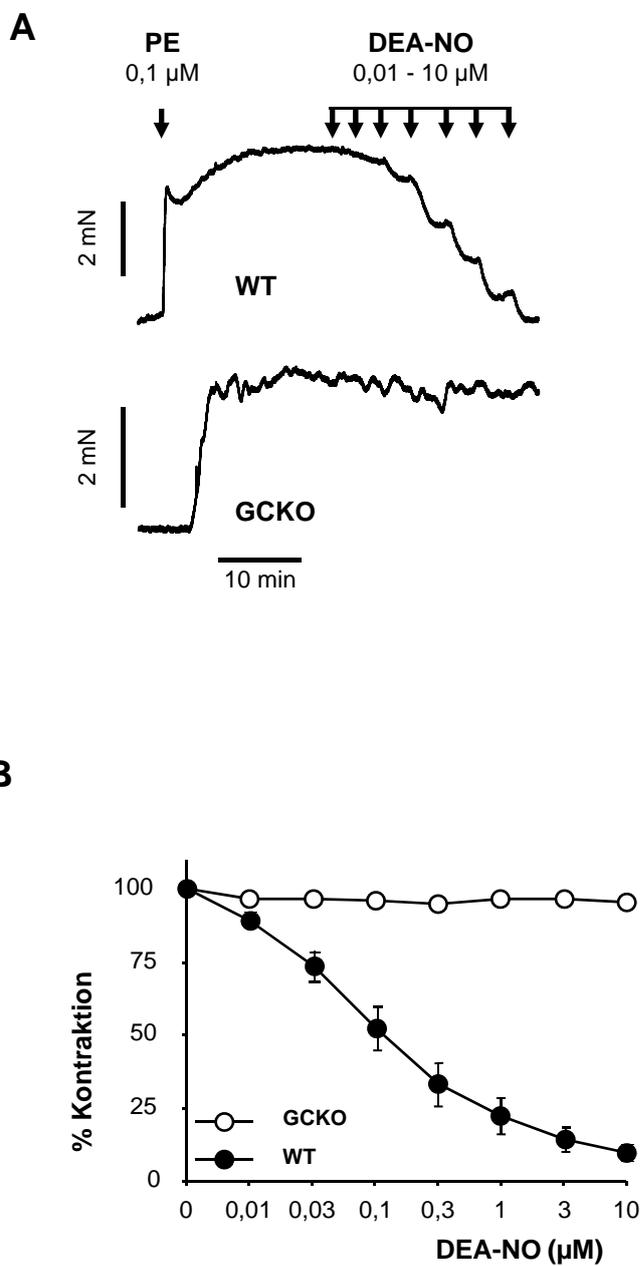
Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die NO-GC in FLC wie auch in ICC an der Steuerung der Motilität beteiligt ist. Die gegenläufigen Ergebnisse von schnellerer Darmassage in FLC-, FLC/SM- sowie Tripel-GCKO-Tieren und verlangsamter Darmassage in FLC/ICC-GCKO-Tieren lassen vermuten, dass die NO-GC in FLC und ICC unterschiedliche Funktionen ausfüllt und erst im Zusammenwirken der beiden Zellen zu einer ausbalancierten Motilität führt.

## **4.2 Verteilung und Funktion der NO-GC im unteren Harntrakt**

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Tonus in glattemuskulären Geweben wie beispielsweise dem Gefäßsystem und dem Gastrointestinaltrakt. Über die Verteilung und Funktion der NO-GC im unteren Harntrakt („lower urinary tract“, LUT), der ebenfalls vorwiegend aus glatter Muskulatur aufgebaut ist, ist bislang wenig bekannt. Innerhalb dieser Arbeit sollten daher anhand von immunhistochemischen Analysen und funktionellen Experimenten im Organbad grundlegende Erkenntnisse über die Rolle der NO-GC im LUT von verschiedenen zellspezifischen Knockout-Mäusen erarbeitet werden.

### **4.2.1 NO-induzierte Relaxation der Urethra**

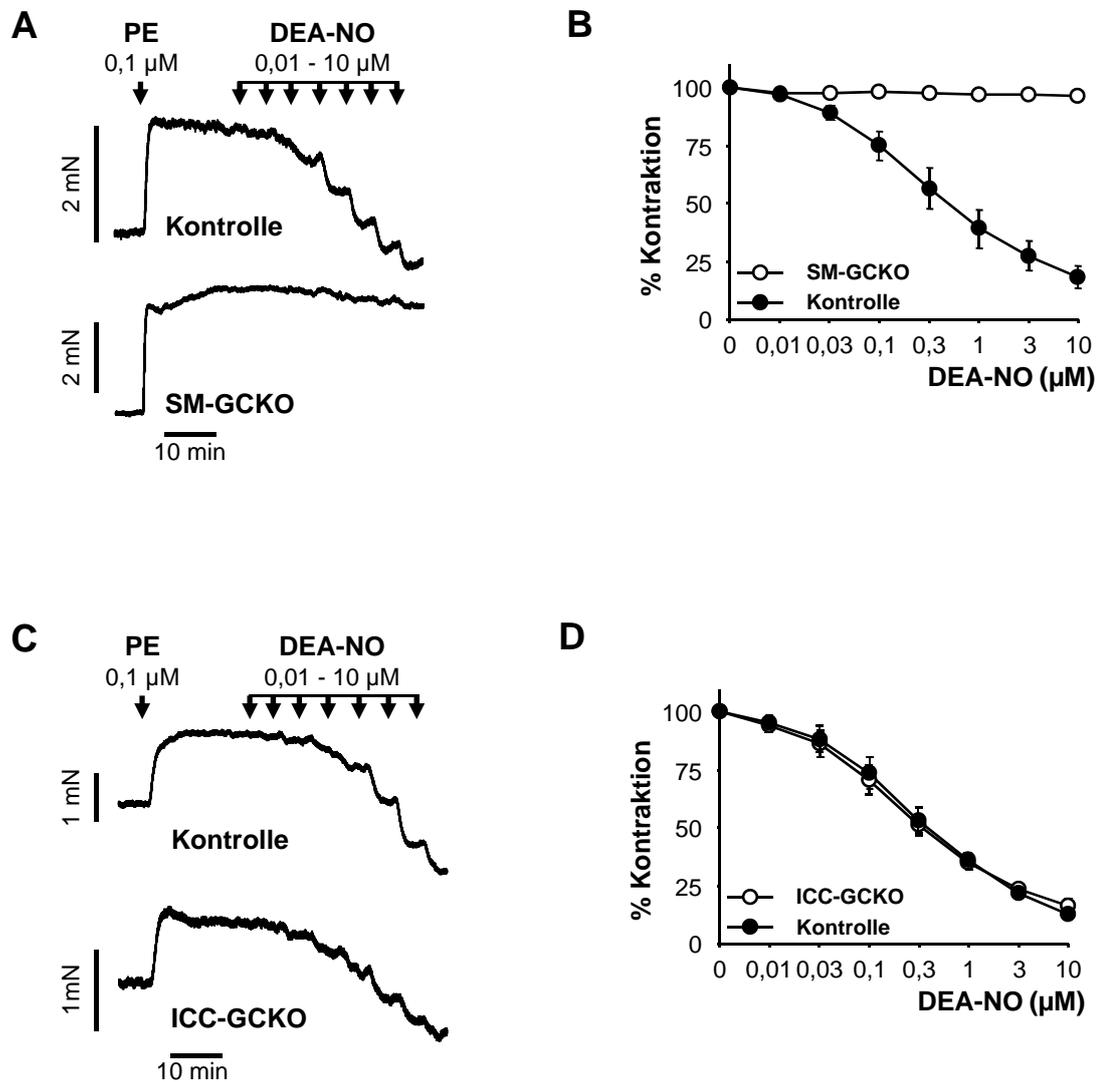
In Organbadversuchen mit vorkontrahierten Urethra-Ringen (0,1  $\mu$ M PE) wurde zunächst die NO-induzierte Relaxation untersucht. Abbildung 20 A zeigt zwei Originalkurven von Urethren eines WT- und eines GCKO-Tieres und Abbildung 20 B die dazugehörige statistische Auswertung. Der NO-Donor DEA-NO führte zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation der WT-Urethra, die bei der GCKO-Urethra nicht auftrat. Das zeigt eindeutig, dass die NO-induzierte Relaxation ausschließlich über die NO-GC verläuft und damit cGMP-unabhängige Relaxation durch NO ausgeschlossen werden können. Um einzugrenzen, welche Zellen NO-GC exprimieren und an der Relaxation beteiligt sind, wurde der Versuch auch mit Urethra von SM-GCKO-Tieren (Abbildungen 21 A+B) und ICC-GCKO-Tieren (Abbildungen 21 C+D) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die NO-induzierte Relaxation der Urethren aus SM-GCKO-Tieren analog zu GCKO-Urethren vollständig ausblieb. Urethren von ICC-GCKO-Tieren hingegen zeigten eine mit den WT-Urethren vergleichbare Relaxation. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass NO in der Urethra ausschließlich über die NO-GC in glatten Muskelzellen wirkt.



**Abb. 20: NO-induzierte Relaxation von Urethra-Ringen I**

Originalkurven (A) und dazugehörige statistische Auswertung (B) der DEA-NO-induzierten Relaxation von Urethra-Ringen aus WT- und GCKO-Tieren. Urethra-Ringe wurden mit 0,1 μM PE vorkontrahiert und anschließend mit ansteigenden Konzentrationen von DEA-NO relaxiert. Daten zeigen Mittelwert ± SEM von je n=5 (GCKO- und WT-Tiere).

## NO-induzierte Relaxation von Urethra-Ringen



### Abb. 21: NO-induzierte Relaxation von Urethra-Ringen II

Urethra-Ringe aus SM-GCKO- und Kontroll-Tieren (A – B Originalkurven und statistische Auswertung) sowie ICC-GCKO- und Kontroll-Tieren (C – D Originalkurven und statistische Auswertung) wurden mit 0,1  $\mu$ M PE vorkontrahiert und mit ansteigenden Konzentrationen von DEA-NO relaxiert.

Daten zeigen Mittelwert  $\pm$  SEM von je n=5 (SM-GCKO- und Kontroll-Tiere) und n=6 (ICC-GCKO- und Kontroll-Tiere).

#### **4.2.2 8-pCPT-cGMP- und Forskolin-induzierte Relaxation der Urethra**

Um festzustellen, ob die NO-cGMP-Signalkaskade unterhalb der NO-GC noch intakt ist, wurden 10  $\mu$ M 8-pCPT-cGMP zu WT-, GCKO- sowie SM-GCKO-Urethra-Ringen gegeben (Abbildung 22 A). Bei der daraus resultierenden Relaxation waren keine Unterschiede detektierbar, was auf eine trotz der jeweiligen Deletion unveränderte cGMP-Signaltransduktion hindeutet. Zusätzlich wurde eine Konzentrationsreihe mit Forskolin als Aktivator der Adenylyl-Cyclase in den Geweben durchgeführt, um mögliche Veränderungen innerhalb der cAMP-Signalkaskade auszuschließen. Die Abbildungen 22 B+C zeigen, dass keine Unterschiede in der Forskolin-induzierten Relaxation der Urethren aus WT-, GCKO- und SM-GCKO-Tieren auftraten. Eine durch die Deletion hervorgerufene Beeinflussung des Crosstalks zwischen cGMP und cAMP ist daher unwahrscheinlich.

#### **4.2.3 Immunhistochemische Analyse der Urethra**

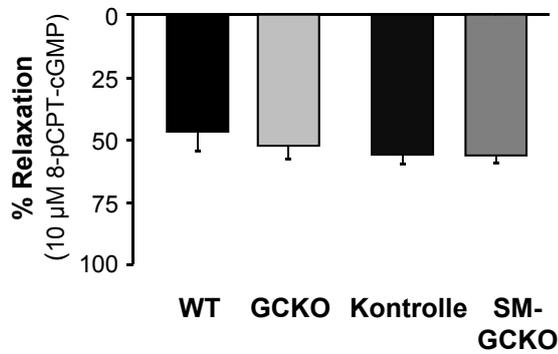
Um die NO-GC-exprimierenden Zellen in der murinen Urethra zu identifizieren, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die Abbildungen 23 A-C zeigen Fluoreszenzsignale in WT-Urethra für die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (grün), einem spezifischen Marker für glatte Muskelzellen. Das Überlagerungsbild zeigt eine Gelbfärbung, was auf eine Expression von NO-GC in glatten Muskelzellen schließen lässt. Wie erwartet wurden in GCKO-Urethra keine Fluoreszenzsignale für NO-GC detektiert (Abbildungen 23 D-F), was den vollständigen Knockout des Enzyms in diesem Gewebe bestätigt. In Gewebeschnitten von SM-GCKO-Urethra fehlte die NO-GC-Expression ebenfalls (Abbildungen 23 G-I). Diese Ergebnisse belegen, dass die NO-GC in der Urethra ausschließlich in glatten Muskelzellen exprimiert wird.

Um nachzuweisen, ob interstitielle Zellen von Cajal (ICC) in der Urethra vorliegen, wurde eine Anfärbung mit Antikörpern gegen den Tyrosinkinase-Rezeptor ckit durchgeführt. Dieser wird im Gastrointestinaltrakt als Goldstandard zum Anfärben von ICC verwendet. Durch Inkubationen mit diesem Antikörper ließen sich allerdings keine Fluoreszenzsignale in muriner Urethra detektieren.

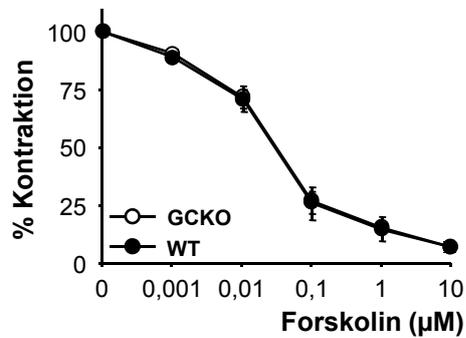
#### **4.2.4 Untersuchungen zur Harnblase**

Im nächsten Schritt wurden Untersuchungen mit muriner Harnblasenmuskulatur durchgeführt. Zunächst wurden die Harnblasengewichte von WT- und GCKO-Tieren bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis aus Harnblasengewicht zu Körpergewicht berechnet. Abbildung 24 zeigt, dass die Deletion der NO-GC nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen den Mauslinien führte und somit keine Hypertrophie vorliegt.

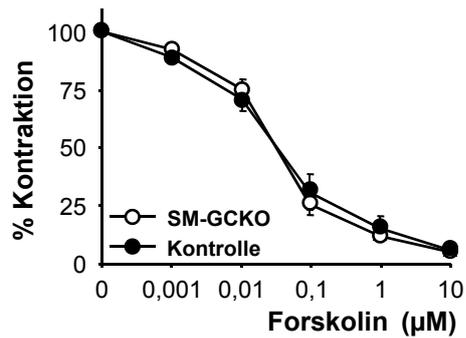
**A**



**B**



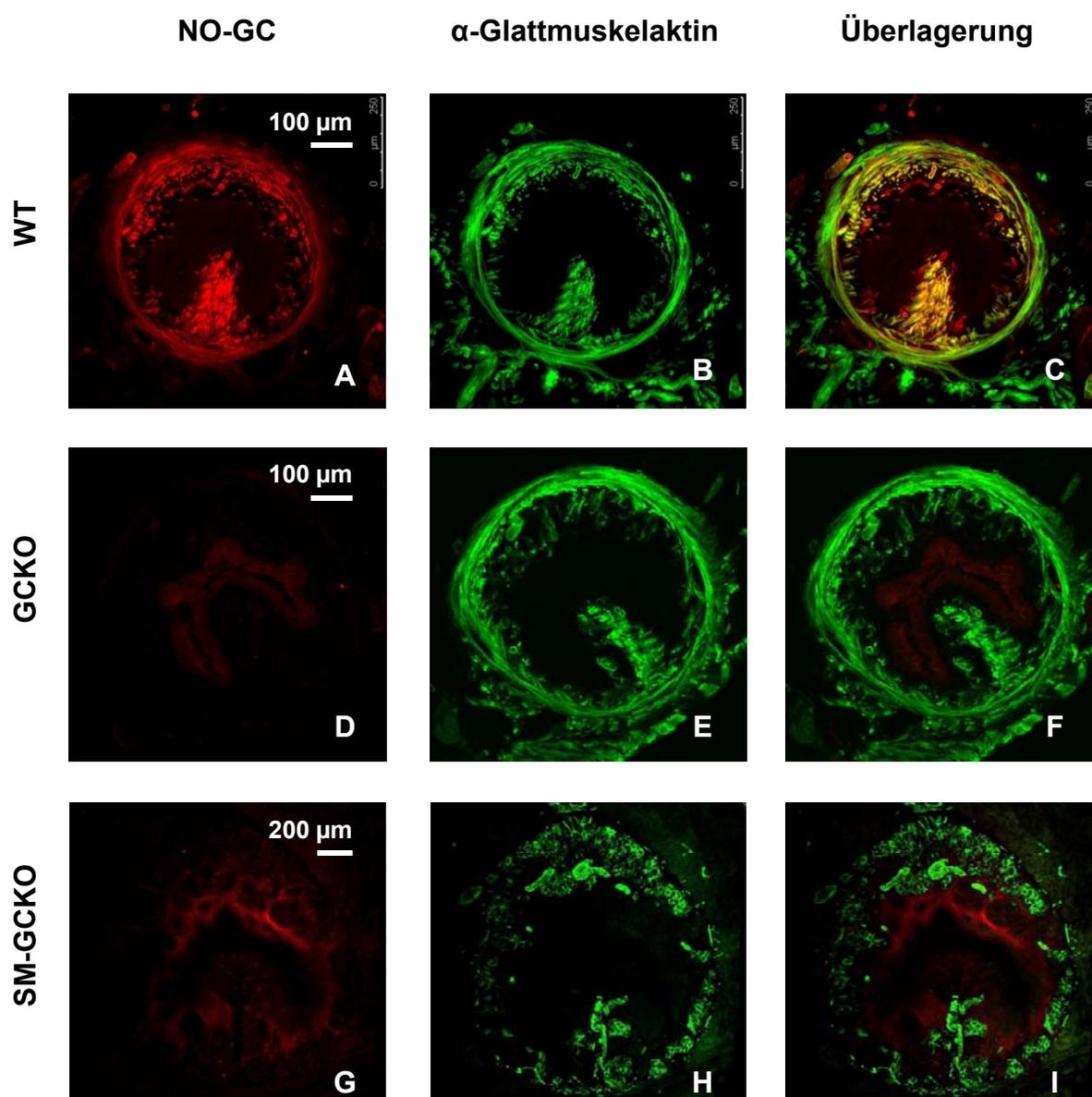
**C**



**Abb. 22: Relaxation der Urethra durch 8-pCPT-cGMP und Forskolin**

Urethra-Ringe aus GCKO- und WT-Tieren sowie SM-GCKO und dazugehörigen Kontroll-Tieren wurden mit 0,1 µM PE kontrahiert und anschließend mit 10 µM 8-pCPT-cGMP (**A**) relaxiert. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=5 pro Genotyp.

Urethra-Ringe aus GCKO- und WT-Tieren (**B**) sowie aus SM-GCKO- und Kontroll-Tieren (**C**) wurden mit 0,1 µM PE kontrahiert und anschließend mit ansteigenden Konzentrationen von Forskolin relaxiert. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=5 (GCKO- und WT-Tiere) bzw. n=4 (SM-GCKO- und Kontroll-Tiere).



**Abb. 23: Immunhistochemische Analyse von Urethra**

Urethra-Schnitte eines WT-Tieres (**A – C**), eines GCKO-Tieres (**D – F**) und eines SM-GCKO-Tieren (**G – H**) wurden mit spezifischen Antikörper gegen  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (grün) gefärbt. Das Überlagerungsbild zeigt beide zuvor abgedruckten Bilder. In WT-Urethra sind gelbe Färbungen bei Kolokalisation der beiden Antikörper zu erkennen. Sowohl in GCKO- als auch SM-GCKO-Urethra ist keine Überlagerung der Signale und somit keine Gelbfärbung feststellbar.

Zusätzlich konnte kein Unterschied im Verhältnis von Blasengewicht zu Körpergewicht zwischen männlichen und weiblichen Mäusen festgestellt werden.

#### **4.2.5 Relaxation von Harnblasenmuskulatur**

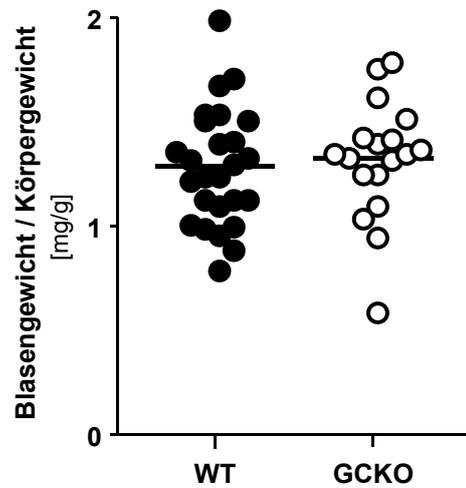
Analog zu den Organbad-Experimenten mit Urethra-Ringen wurde die Relaxation der Harnblasenmuskulatur infolge DEA-NO-Applikation untersucht. Die Blasen-Streifen wurden dabei mit 0,1  $\mu\text{M}$  Carbachol vorkontrahiert. Im Gegensatz zu urethralem Gewebe führten auch hohe Konzentrationen von DEA-NO nur zu einer sehr geringen Relaxation in WT- oder GCKO-Harnblasenmuskulatur. Abbildung 25 A zeigt die Relaxation dieser beiden Harnblasenmuskulaturen nach Gabe von 10  $\mu\text{M}$  DEA-NO.

Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  8-pCPT-cGMP bewirkte in der Harnblasenmuskulatur von WT- und GCKO-Tieren ähnlich wie DEA-NO lediglich eine marginale Relaxation (Abbildung 25 A). Die Applikation von Forskolin hingegen führte zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation, die bei 1  $\mu\text{M}$  Forskolin fast vollständig ausgeprägt war (Abbildung 25 B). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Relaxation der Harnblase vorwiegend durch cAMP vermittelt wird.

#### **4.2.6 Immunhistochemische Analyse von Harnblasenmuskulatur**

Immunhistochemische Analysen von Harnblasenmuskulatur wurden zunächst mit Antikörpern gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (grün) durchgeführt (Abbildungen 26 A+B). Blasenmuskulatur von WT-Mäusen zeigte eine punktförmige, intensive Fluoreszenzfärbung für NO-GC (Abbildung 26 A). Die Kolokalisation mit  $\alpha$ -Glattmuskelaktin aber zeigte, dass keine Überlagerung vorliegt und somit die NO-GC in diesem Gewebe nicht in glatten Muskelzellen, sondern ausschließlich interstitiell exprimiert wird (Abbildungen 26 A-C). GCKO-Harnblasenmuskulatur wies keine NO-GC-Fluoreszenz auf, was auch für Harnblasengewebe die Vollständigkeit des Knockouts belegt (Abbildungen 26 D-F). In Übereinstimmung mit den Befunden aus WT-Harnblasenmuskulatur trat die charakteristisch punktförmige NO-GC-Fluoreszenz auch in Harnblasenmuskulatur von SM-GCKO-Mäusen auf (Abbildungen 26 G-I). Dieses Ergebnis deutete auf eine NO-GC-Expression in bestimmten interstitiellen Zellen oder Neuronen der Harnblasenmuskulatur hin. Wie in Urethra führte auch in Harnblasenmuskulatur die Inkubation mit Antikörpern gegen ckit zu keiner spezifischen Anfärbung. Es ist daher nicht von der Existenz ckit-positiver interstitieller Zellen von Cajal in Harnblasenmuskulatur auszugehen. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um die Identität und die Funktion der NO-GC-haltigen interstitiellen Zellen in der Harnblase aufzuklären.

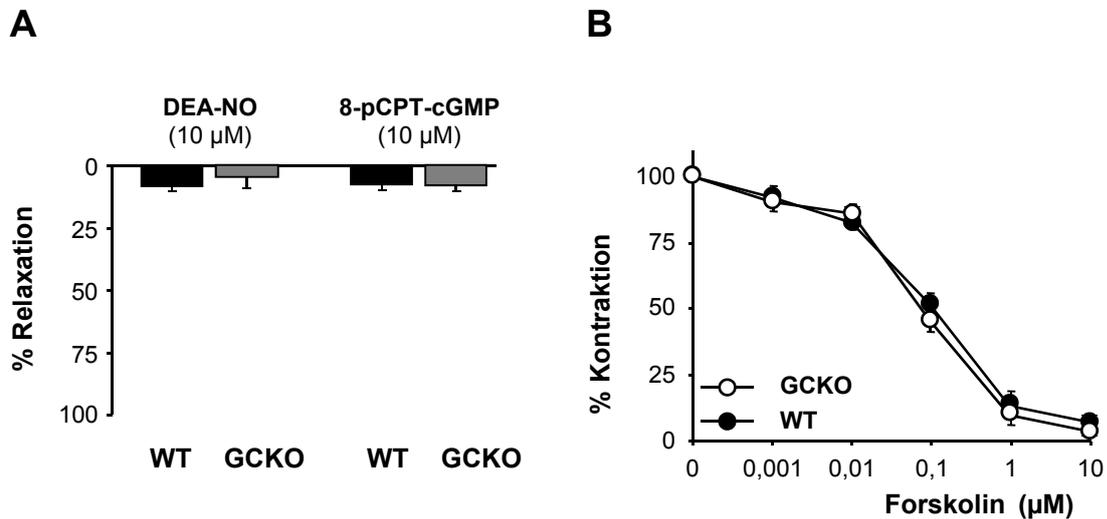
## Harnblasengewicht



**Abb. 24: Harnblasengewicht**

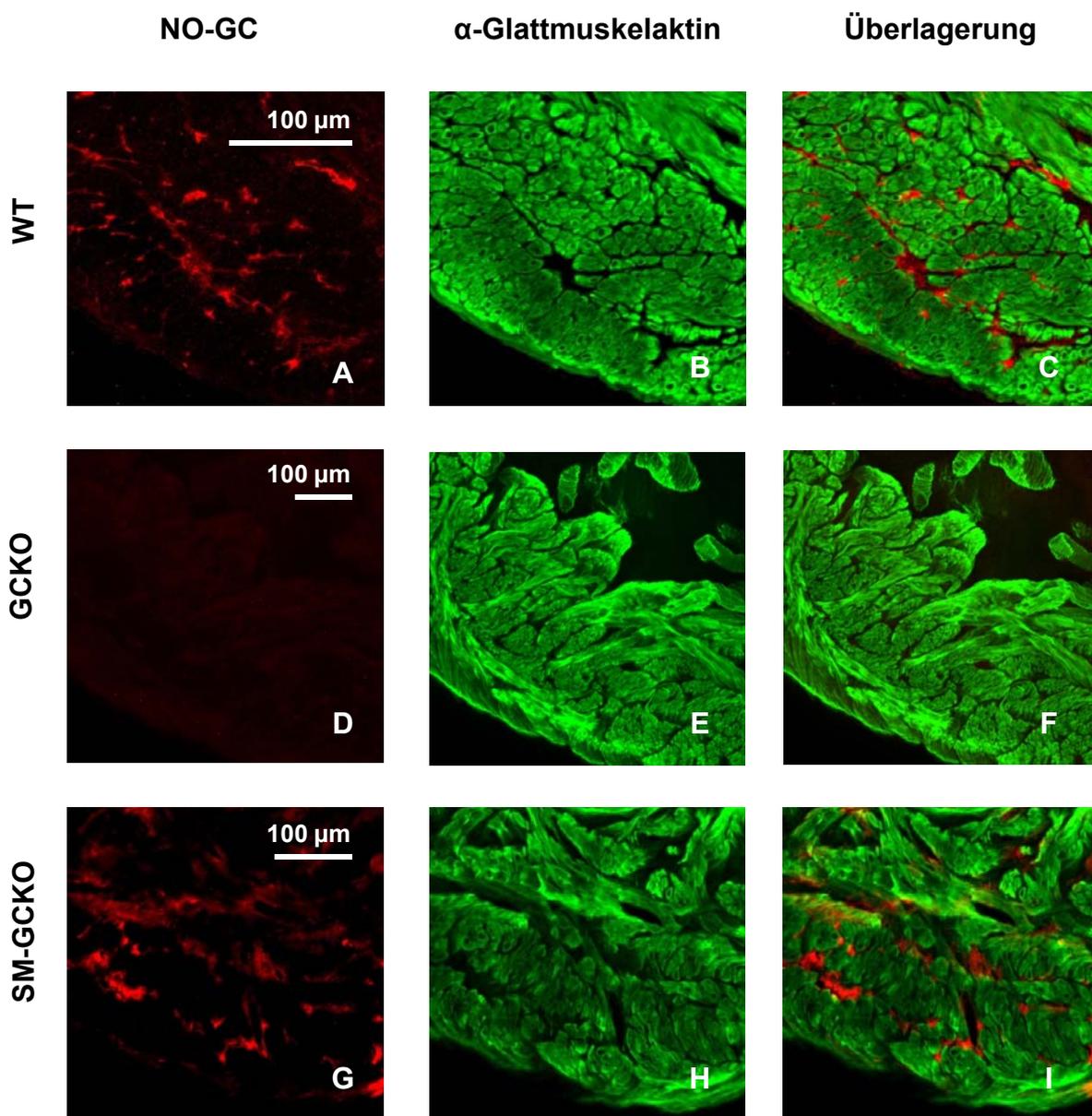
Harnblasen von WT- und GCKO-Tieren wurden gewogen und auf das Körpergewicht der Mäuse normalisiert. Dargestellt ist ein Scatter Plot von n=18 GCKO- und n=26 WT-Tieren, bei dem der Stich jeweils den Median der Einzelwerte einer Gruppe anzeigt.

## Relaxation der Harnblasenmuskulatur



**Abb. 25: Harnblasengewicht**

Harnblasen von WT- und GCKO-Tieren wurden gewogen und auf das Körpergewicht der Mäuse normalisiert. Dargestellt ist ein Scatter Plot von n=18 GCKO- und n=26 WT-Tieren, bei dem der Stich jeweils den Median der Einzelwerte einer Gruppe anzeigt.



**Abb. 26: Immunhistochemische Analyse von Harnblasenmuskulatur**

Blasen-Schnitte eines WT-Tieres (A – C), eines GCKO-Tieres (D – F) und eines SM-GCKO-Tieres (G – H) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (grün) gefärbt. Es liegt keine Kolokalisation der Signale vor, da im WT-Tier keine Überlagerung der roten und grünen Signale sichtbar wird und im SM-GCKO-Tier die roten NO-GC-Signale wie im WT vorhanden sind.

### **4.3 Untersuchung von Inhibitoren der NO-GC**

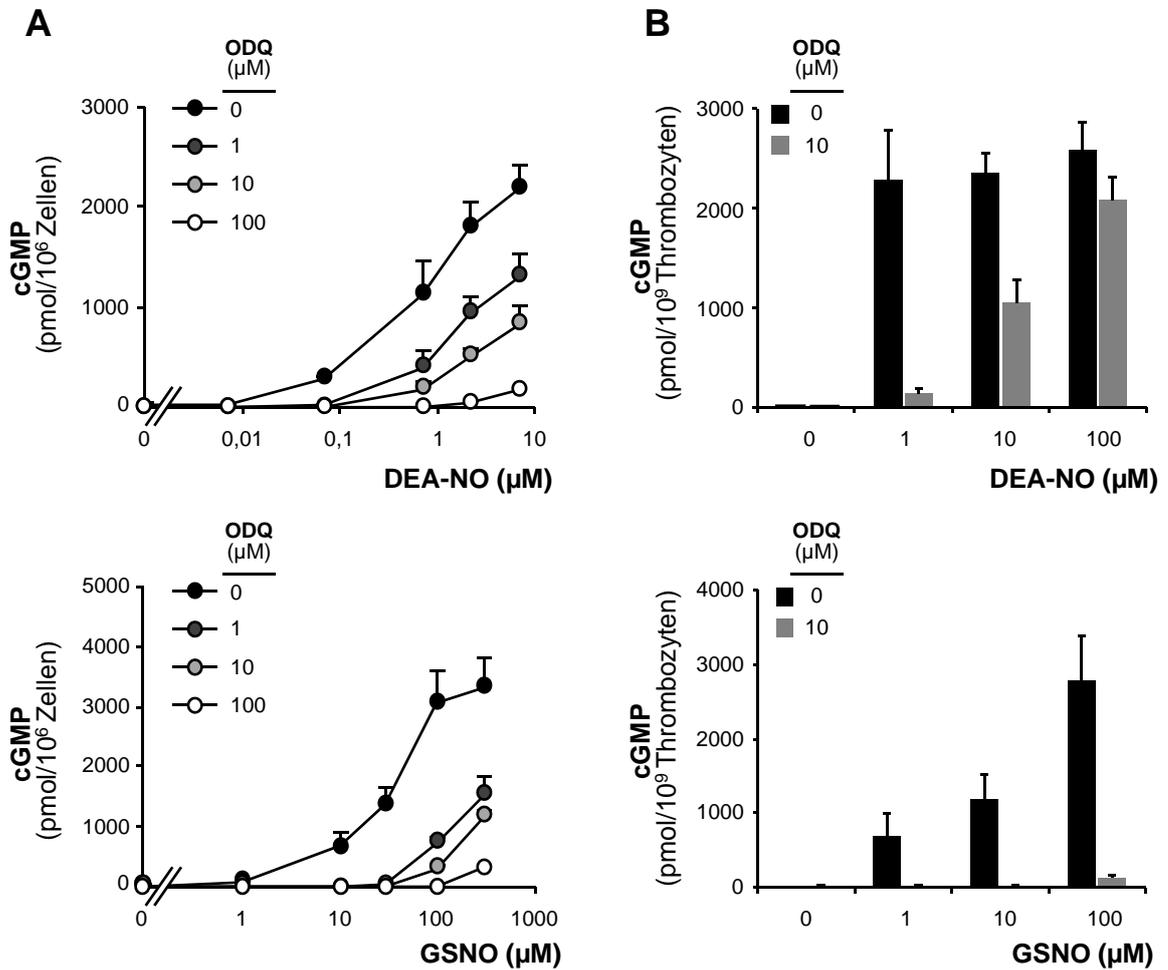
Zur Untersuchung der NO/cGMP-Signalkaskade können spezifische NO-GC-Inhibitoren wie ODQ und NS2028 verwendet werden, um cGMP-abhängige NO-Effekte zu überprüfen. Gleichmaßen gelten NO-induzierte Effekte in der Gegenwart dieser Inhibitoren oftmals als Bestätigung cGMP-unabhängiger Mechanismen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Einsatz der NO-GC-Inhibitoren ODQ und NS2028 zum Nachweis cGMP-unabhängiger Effekte unter Zuhilfenahme von Knockout-Tieren der NO-GC evaluiert werden.

#### **4.3.1 Inhibition der NO-GC durch ODQ in HEK-Zellen und Thrombozyten**

Im ersten Ansatz sollte mit HEK („human embryonic kidney“)-Zellen ein rekombinantes Zellmodell verwendet werden. HEK-Zellen mit stabiler NO-GC-Expression waren im Vorfeld dieser Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe generiert worden. In diesen HEK-Zellen wurde keine PDE-Aktivität detektiert. Um die inhibitorische Wirkung von ODQ zu messen, wurden die HEK-Zellen mit dem radikalischen NO-Donor DEA-NO in An- und Abwesenheit von ODQ inkubiert. Mittels RIA wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg von intrazellulärem cGMP gemessen (Abbildung 27 A). Die Vorinkubation mit ODQ verringerte den NO-induzierten cGMP-Anstieg, doch selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ODQ konnte die NO-induzierte cGMP-Produktion nicht vollständig unterbunden werden. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Art des NO-Donors, da ähnliche Ergebnisse mit dem nicht-radikalischen NO-Donor GSNO erzielt wurden.

Um diese Effekte in einem weiteren zellulären System zu untersuchen, wurden murine Thrombozyten verwendet (Abbildung 27 B). Die Thrombozyten wurden mit ansteigenden Konzentrationen (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) der NO-Donatoren DEA-NO und GSNO inkubiert. Koinkubation mit ODQ (10  $\mu\text{M}$ , Präinkubation 10 min) konnte eine NO-GC-Stimulation und somit die Produktion von cGMP nicht vollständig verhindern. Mit zunehmender Konzentration des NO-Donors kam es trotz NO-GC-Blockade durch ODQ zu einem Anstieg der cGMP-Spiegel. Unter Einsatz von GSNO war der cGMP-Anstieg sehr gering, aber dennoch bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  messbar. ODQ konnte hier die cGMP-Produktion zwar verringern, aber nicht vollständig unterbinden. Die cGMP-Produktion nach Inkubation mit DEA-NO war erheblich stärker. Beim Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  DEA-NO war die inhibitorische Wirkung von ODQ fast vollständig aufgehoben.

## Inhibition der NO-GC durch ODQ in HEK-Zellen und Thrombozyten



Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

### Abb. 27: Inhibition der NO-GC durch ODQ in HEK-Zellen und Thrombozyten

**A)** DEA-NO- und GSNO-induzierte cGMP-Produktion in HEK-Zell-Homogenat in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des NO-GC-Inhibitors ODQ (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ).

**B)** DEA-NO- und GSNO-induzierte cGMP-Produktion in murinen Thrombozyten in An- und Abwesenheit von ODQ (10  $\mu\text{M}$ ). Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n=10$  (DEA-NO) und  $n=8$  (GSNO) WT-Tieren.

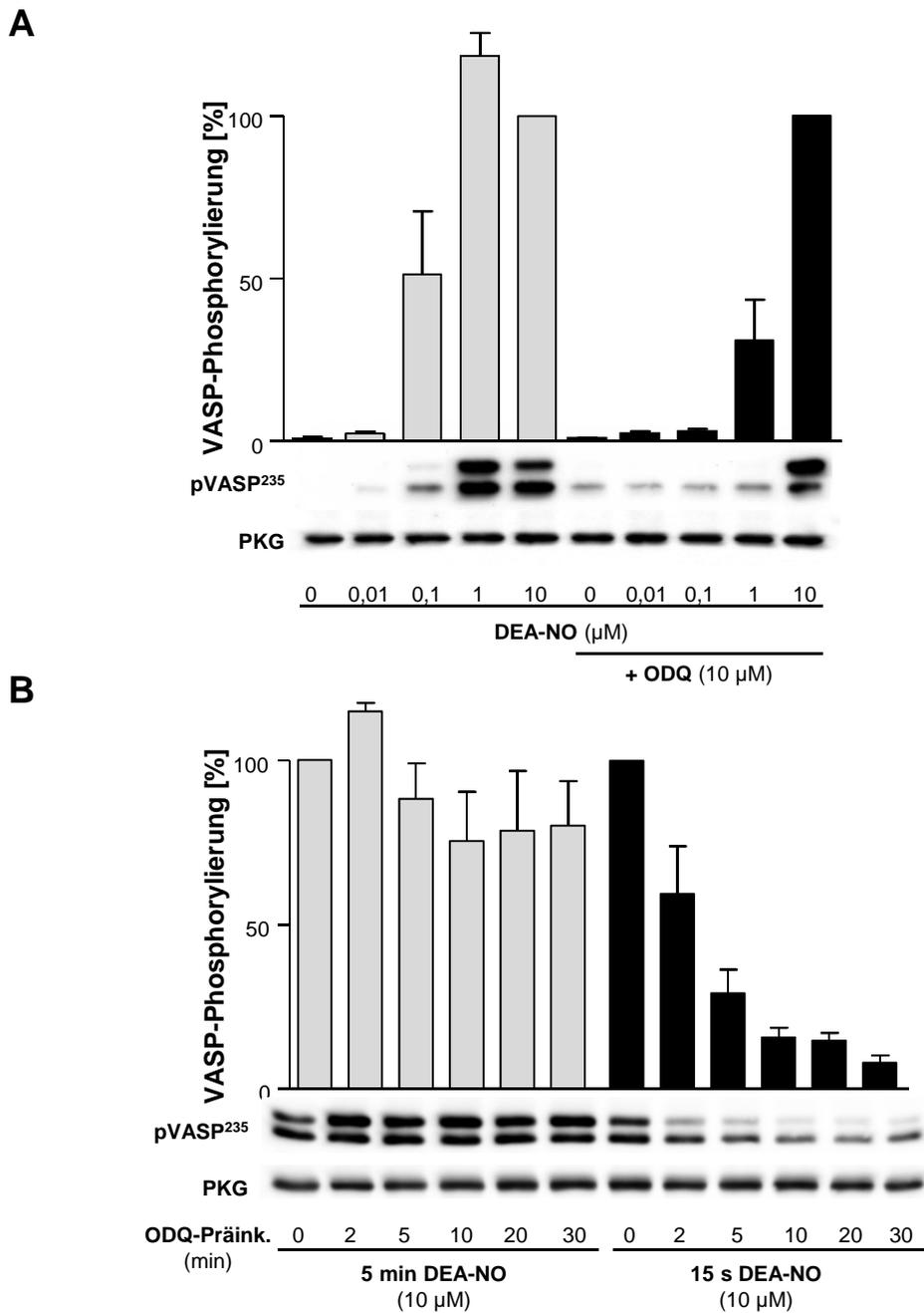
Bei allen Versuchen mit ODQ erfolgte eine Vorinkubation von 10 min.

#### 4.3.2 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der NO-GC-Inhibition durch ODQ

Um die Funktionalität des cGMP-Signals in Thrombozyten zu überprüfen, wurde mittels Western-Blot die Phosphorylierung des cGMP-Effektormoleküls Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP) gemessen. Die Phosphorylierung von VASP wird üblicherweise als Indikator für die intakte NO/cGMP-Signalwirkung verwendet. VASP kann dabei an zwei Stellen phosphoryliert werden: Ser-239 und Ser-157. Zur Detektion der Phosphorylierung wurde ein Antikörper eingesetzt, der die an Ser-239 phosphorylierte Form detektiert. Dieser Antikörper erkennt zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 46 und 50 kDa. Dabei entspricht die 46 kDa-Bande dem nur an Ser-239 phosphorylierten VASP, während die Detektion des 50 kDa schweren Proteins durch eine zusätzliche Phosphorylierung von VASP an Ser-157 bedingt ist (Halbrugge & Walter, 1989). In murinen Thrombozyten führte DEA-NO zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung, die in der Anwesenheit von ODQ (10  $\mu$ M; 10 min) reduziert war. Mit 10  $\mu$ M DEA-NO konnte jedoch eine starke VASP-Phosphorylierung trotz ODQ-Koinkubation hervorgerufen werden (Abbildung 28 A).

Anschließend wurde die NO-induzierte VASP-Phosphorylierung in murinen Thrombozyten nach unterschiedlich langen ODQ-Präinkubationszeiten untersucht. Abbildung 28 B zeigt, dass eine VASP-Phosphorylierung infolge einer 15-sekündigen Stimulation mit DEA-NO (10  $\mu$ M) ab einer 10-minütigen ODQ-Präinkubation stark verringert werden konnte. Bei fünfminütiger Stimulation mit DEA-NO (10  $\mu$ M) war der inhibierende Effekt von ODQ allerdings stark reduziert. Selbst 30 min ODQ-Präinkubation reichten unter diesen Bedingungen nicht aus, um eine VASP-Phosphorylierung zu verhindern. Diese Daten zeigen, dass der inhibitorische Effekt von ODQ auf die NO-GC durch eine hohe Konzentration von NO überwunden werden kann.

Um zu untersuchen, ob eine Zeitabhängigkeit bei der DEA-NO-Inkubation vorliegt, wurde die VASP-Phosphorylierung in humanen Thrombozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit DEA-NO (je 10  $\mu$ M) bestimmt (Abbildung 29). Bereits nach 30 s Inkubation mit DEA-NO wurden die charakteristischen Phosphorylierungsbanden bei 46 und 50 kDa beobachtet. Präinkubation mit ODQ unterdrückte die VASP-Phosphorylierung bis zu 2 min. Ab einer DEA-NO-Inkubationsdauer von 3 min trat eine VASP-Phosphorylierung auch in Anwesenheit von 10  $\mu$ M ODQ auf, was auf eine nur unvollständig gehemmte NO/cGMP-Signaltransduktion hindeutet.

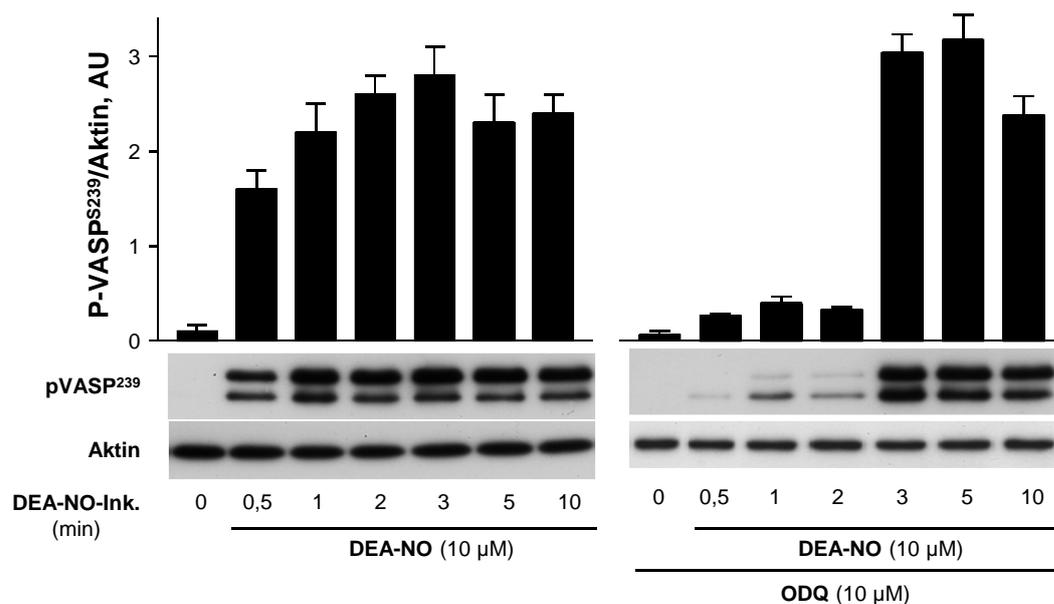


Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

**Abb. 28: Rolle der DEA-NO-Konzentration und ODQ-Präinkubation**

**A)** Murine Thrombozyten wurden für 10 min mit ODQ bzw. Vehikel vorinkubiert. Im Anschluss wurde mit ansteigenden DEA-NO-Konzentrationen (0,01 - 10 µM) inkubiert und die VASP-Phosphorylierung im Western-Blot mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers detektiert. Dargestellt ist ein Beispiel-Western-Blot mit dazugehöriger Statistik: Daten entsprechen dem Mittelwert von n=6.

**B)** Murine Thrombozyten wurden unterschiedlich lange mit ODQ (10 µM; 0 - 30 min) vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte eine DEA-NO (10 µM)-Inkubation für 5 min bzw. 15 s. Die VASP-Phosphorylierung wurde im Western-Blot mittels eines Phospho-spezifischen Antikörpers detektiert. Dargestellt ist ein Beispiel-Western-Blot mit dazugehöriger Statistik: Daten entsprechen dem Mittelwert von n=6.



Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

### Abb. 29: Rolle der DEA-NO-Inkubationszeit

Humane Thrombozyten wurden für 10 min mit ODQ (10 μM) bzw. Vehikel vorinkubiert. Anschließend wurde mit DEA-NO (10 μM) unterschiedlich lange inkubiert (0 - 10 min). Die VASP-Phosphorylierung wurde im Western-Blot mittels eines Phospho-spezifischen Antikörpers detektiert. Dargestellt ist ein Beispiel-Western-Blot mit dazugehöriger Statistik: Daten entsprechen dem Mittelwert von n=3.

#### **4.3.3 Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ**

Um die Effekte von ODQ in intaktem Gewebe zu überprüfen, wurden Versuche mit Aorten-Ringen von WT- und GCKO-Tieren durchgeführt. Abbildung 30 A zeigt eine Originalkurve des Organbadversuchs und Abbildung 30 B die dazugehörige statistische Auswertung. DEA-NO führte in WT-Aorta zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation, die in Aorta von GCKO-Mäusen unterblieb. Wie die Originalkurven zeigen, führte die gleichzeitige Inkubation mit ODQ (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) zu einer verringerten NO-induzierten Relaxation der WT-Aorten. Eine vollständige Inhibition konnte jedoch selbst mit einer supramaximalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ODQ nicht erreicht werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem nicht-radikalischen NO-Donor GSNO erhalten. Während GSNO eine konzentrationsabhängige Relaxation in WT-Aorta zeigte, blieb diese in Aorten von GCKO-Tieren aus (Abbildungen 30 C+D). Ebenso wie bei den vorangegangenen Versuchen mit DEA-NO führte ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) nicht zu einem vollständigen Ausbleiben der GSNO-induzierten Relaxation von WT-Aorten.

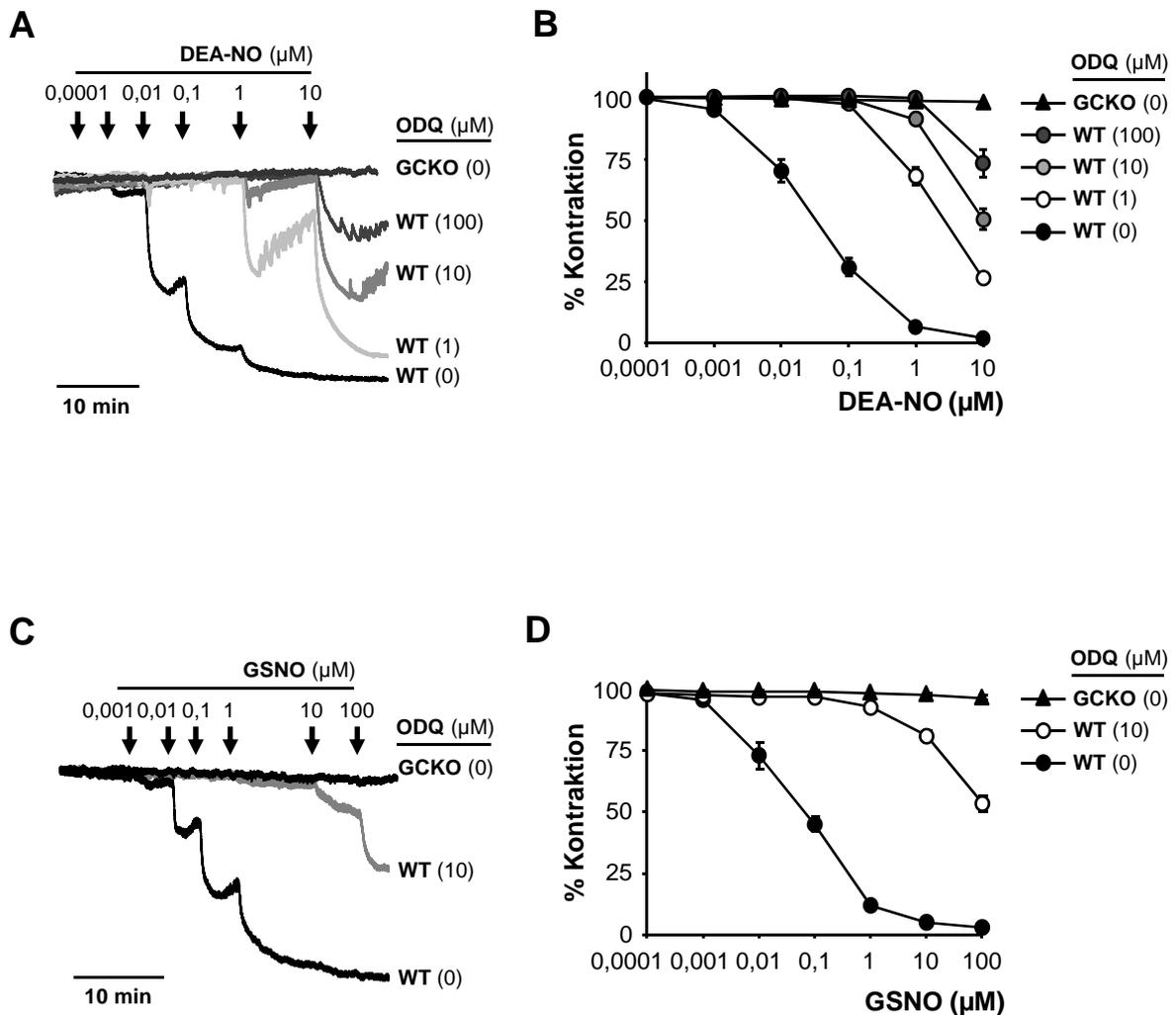
Um nachzuweisen, ob die Relaxation in Gegenwart von ODQ abhängig von der NO-GC-Aktivität und somit von cGMP war, wurde der vorangegangene Versuch mit DEA-NO nochmals in Anwesenheit des PDE5-Hemmstoffs Sildenafil wiederholt. Die Abbildungen 31 A+B zeigen, dass Sildenafil in der WT-Aorta zu einer Linksverschiebung der Relaxationskurve führt. Dies bedeutet, dass die DEA-NO-induzierte Relaxation aufgrund des verringerten cGMP-Abbaus verstärkt ist. Aorten-Ringe, die sowohl mit ODQ als auch mit Sildenafil inkubiert wurden, zeigten ebenfalls diese Linksverschiebung, was ein Beweis für die Beteiligung von cGMP an der Rest-Relaxation unter ODQ-Inkubation ist.

Um die Zeitabhängigkeit der ODQ-Inhibition in der Aorta zu überprüfen, wurden vorkontrahierte Aorten-Ringe (1  $\mu\text{M}$  PE) für entweder 10 oder 30 min mit ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10  $\mu\text{M}$  DEA-NO appliziert (Abbildung 31 C). Die Gegenwart von ODQ konnte auch hier die Relaxation nicht vollständig verhindern und eine verlängerte ODQ-Präinkubation hatte keinen zusätzlich inhibierenden Effekt.

#### **4.3.4 Inhibition der NO-induzierten Relaxation des Magen-Fundus durch ODQ**

Um zu verifizieren, dass die beobachteten Effekte in der Aorta auch für andere Gewebe zutreffen, wurde der Einfluss von ODQ auf Fundus-Gewebe untersucht. Die Fundus-Streifen wurden in einem ersten Versuchsansatz mit 10  $\mu\text{M}$  CCh kontrahiert, eine Konzentration, die üblicherweise zur Kontraktion eingesetzt wird.

## Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ I



Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

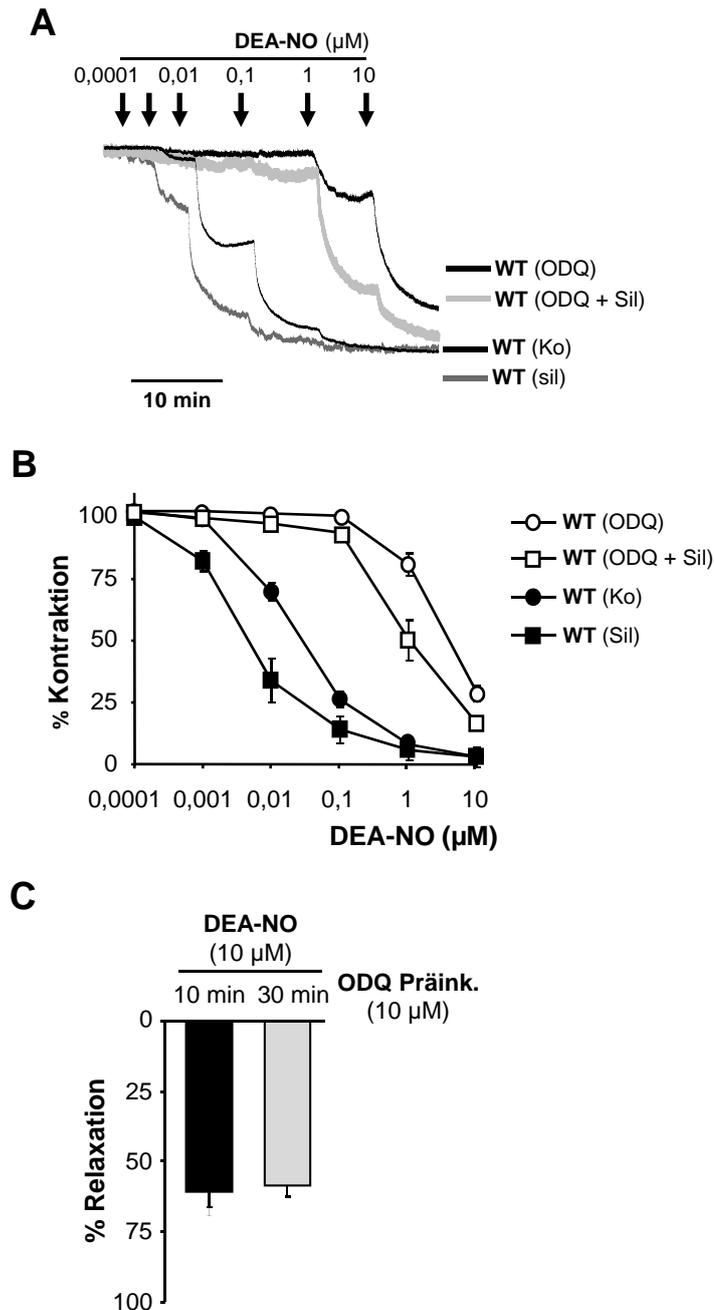
### Abb. 30: Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ I

Aorten-Ringe aus WT- und GCKO-Tieren wurden mit 1  $\mu\text{M}$  PE vorkontrahiert.

**A)** WT-Aorta wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von ODQ (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Anschließend wurden WT- und GCKO-Aorten mit ansteigenden Konzentrationen von DEA-NO relaxiert. **B)** Statistische Analyse der DEA-NO-induzierten Relaxation. **C)** WT-Aorta wurde in An- und Abwesenheit von ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Anschließend wurden WT- und GCKO-Aorten mit ansteigenden Konzentrationen von GSNO relaxiert. **D)** Statistische Analyse der GSNO-induzierten Relaxation.

Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils n=5 WT und n=3 GCKO.

## Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ II



Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

### Abb. 31: Inhibition der NO-induzierten Aorten-Relaxation durch ODQ II

**A)** Aorten-Ringe aus WT-Tieren wurden mit 1  $\mu\text{M}$  PE vorkontrahiert und anschließend mit Vehikel (Ko), ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) und/oder Sildenafil (Sil; 0,1  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Danach wurde mit ansteigenden Konzentrationen von DEA-NO relaxiert.

**B)** Statistische Analyse der DEA-NO-induzierten Relaxation. Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n=5.

**C)** Aorten-Ringe aus WT-Tieren wurden mit 1  $\mu\text{M}$  PE vorkontrahiert und anschließend für 10 bzw. 30 min mit ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Danach wurde die durch DEA-NO (10  $\mu\text{M}$ )-induzierte Relaxation ermittelt. Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n=4.

Die DEA-NO-induzierte Relaxation in WT-Fundus konnte durch Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  ODQ komplett inhibiert werden. Die Kurve lag dabei weitestgehend auf der Kurve des GCKO-Fundus (Abbildung 32 A).

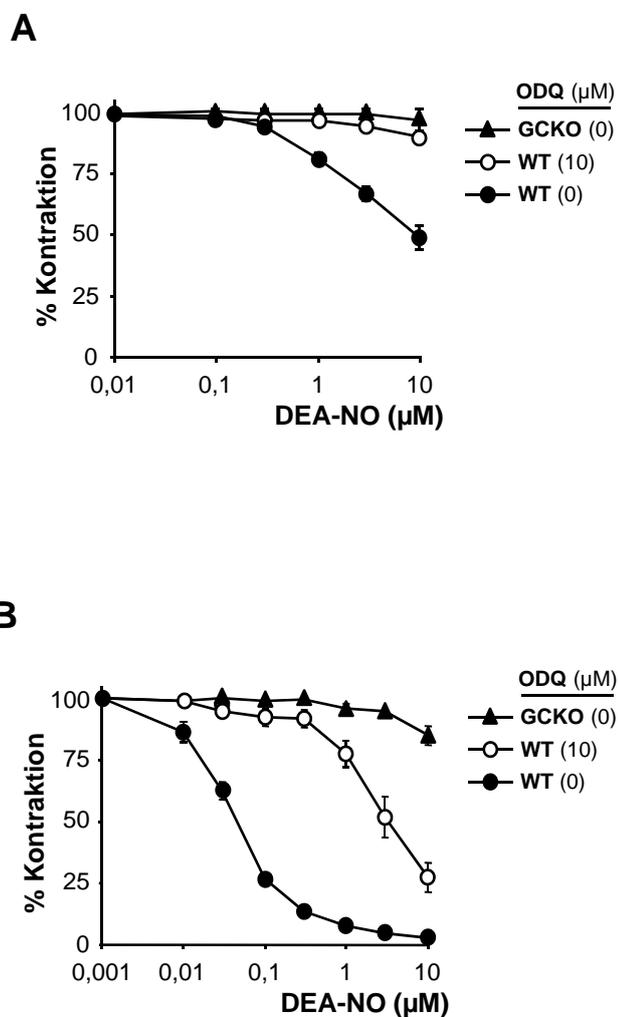
In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Fundus-Streifen mit nur 0,1  $\mu\text{M}$  CCh kontrahiert (Abbildung 32 B). In diesem Fall konnte mit 10  $\mu\text{M}$  ODQ lediglich eine partielle Inhibition der DEA-NO-induzierten Relaxation des WT-Fundus erreicht werden, was als cGMP-unabhängiger Effekt interpretiert werden könnte. Bei Fundus-Streifen aus GCKO-Tieren blieb allerdings die NO-induzierte Relaxation aus, was einen cGMP-unabhängigen Effekt von NO ausschließt.

#### **4.3.5 Inhibition der Relaxation mittels endogen freigesetzten NOs durch ODQ**

Die Verwendung von pharmakologischen NO-Donatoren kann artefaktische Ergebnisse hervorrufen, da das freigesetzte NO möglicherweise nicht in physiologischen Konzentrationen vorliegt oder im Gewebe an Stellen freigesetzt wird, an denen endogen gewöhnlich kein NO vorliegt. Aus diesem Grund wurden die inhibitorischen Effekte von ODQ auch auf endogen freigesetztes NO untersucht. Dafür wurden zunächst Fundus-Streifen mit U46619 (100 nM) vorkontrahiert und elektrische Feldstimulationen (EFS) unter NANC-Bedingungen durchgeführt (Abbildungen 33 A+B). Der Mechanismus der NO-Freisetzung beruht bei dieser Methode vermutlich darauf, dass es durch Anlegen eines elektrischen Feldes zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Neurone kommt, was zu einer Aktivierung der nNOS führt. Das so produzierte NO hatte in den durchgeführten Versuchen eine Relaxation zur Folge, die durch ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) vollständig inhibiert werden konnte. Stimulationen bei höheren Frequenzen (>8 Hz) wurden für diesen Versuch nicht durchgeführt, da neben der vermehrten NO-Freisetzung zusätzlich andere relaxierende Stoffe wie ATP und VIP freigesetzt würden. Daher wäre bei Inkubation mit ODQ nach diesen stärkeren Stimulationen eine Differenzierung zwischen nicht-inhibierter NO-Relaxation und cGMP-unabhängiger ATP-/VIP-Relaxation schwer möglich.

Um die inhibitorischen Effekte von ODQ auf endogen produziertes NO in einem weiteren Organsystem zu überprüfen, wurden Aorten-Ringe in Abwesenheit von L-NAME und Diclofenac ebenfalls mit U46619 (10 nM) vorkontrahiert und mit Carbachol (CCh) versetzt. CCh ist ein Acetylcholin-Analogon, das durch Aktivierung muskarinerger Rezeptoren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Endothelzellen erhöht. Dies führt zu einer Aktivierung der eNOS und letztendlich zu einer vermehrten endogenen NO-Produktion. In Abbildung 34 A sind Originalkurven von WT- und GCKO-Aorten-Ringen dargestellt. Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus wurden 30  $\mu\text{M}$  CCh (bei WT in An- und Abwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  ODQ) appliziert. Die Originalkurven zeigen,

## Inhibition der NO-induzierten Relaxation des Magen-Fundus durch ODQ

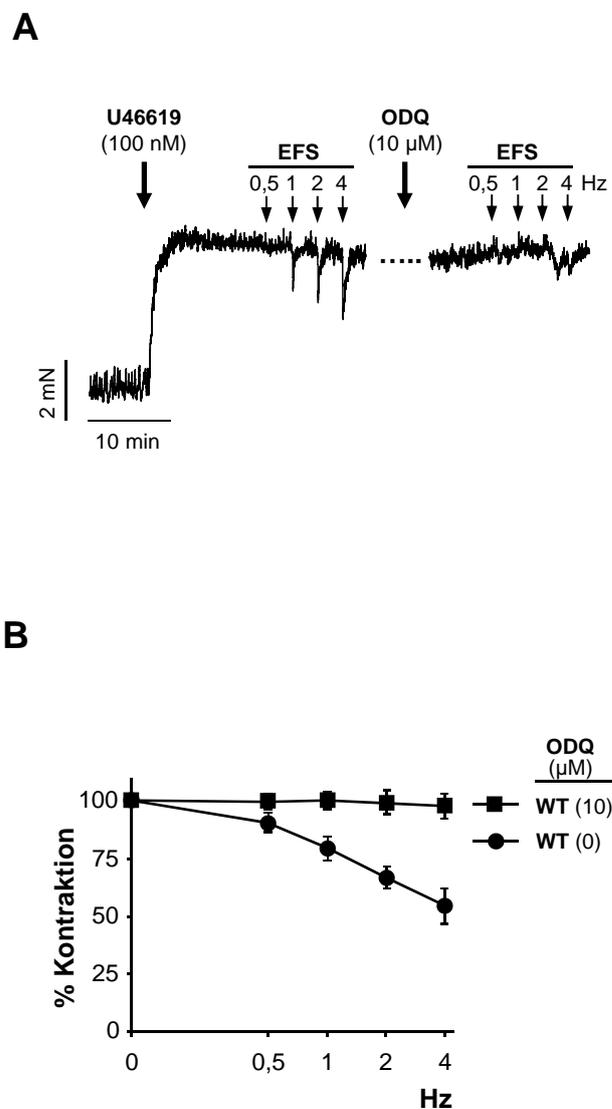


Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

### Abb. 32: Inhibition der NO-induzierten Relaxation des Fundus durch ODQ

Fundus-Steifen von GCKO- und WT-Tieren wurden mit 10  $\mu\text{M}$  CCh (A) bzw. 0,1  $\mu\text{M}$  CCh (B) vorkontrahiert. Im Anschluss erfolgte eine DEA-NO-induzierte Relaxation in An- und Abwesenheit von ODQ (10  $\mu\text{M}$ ).

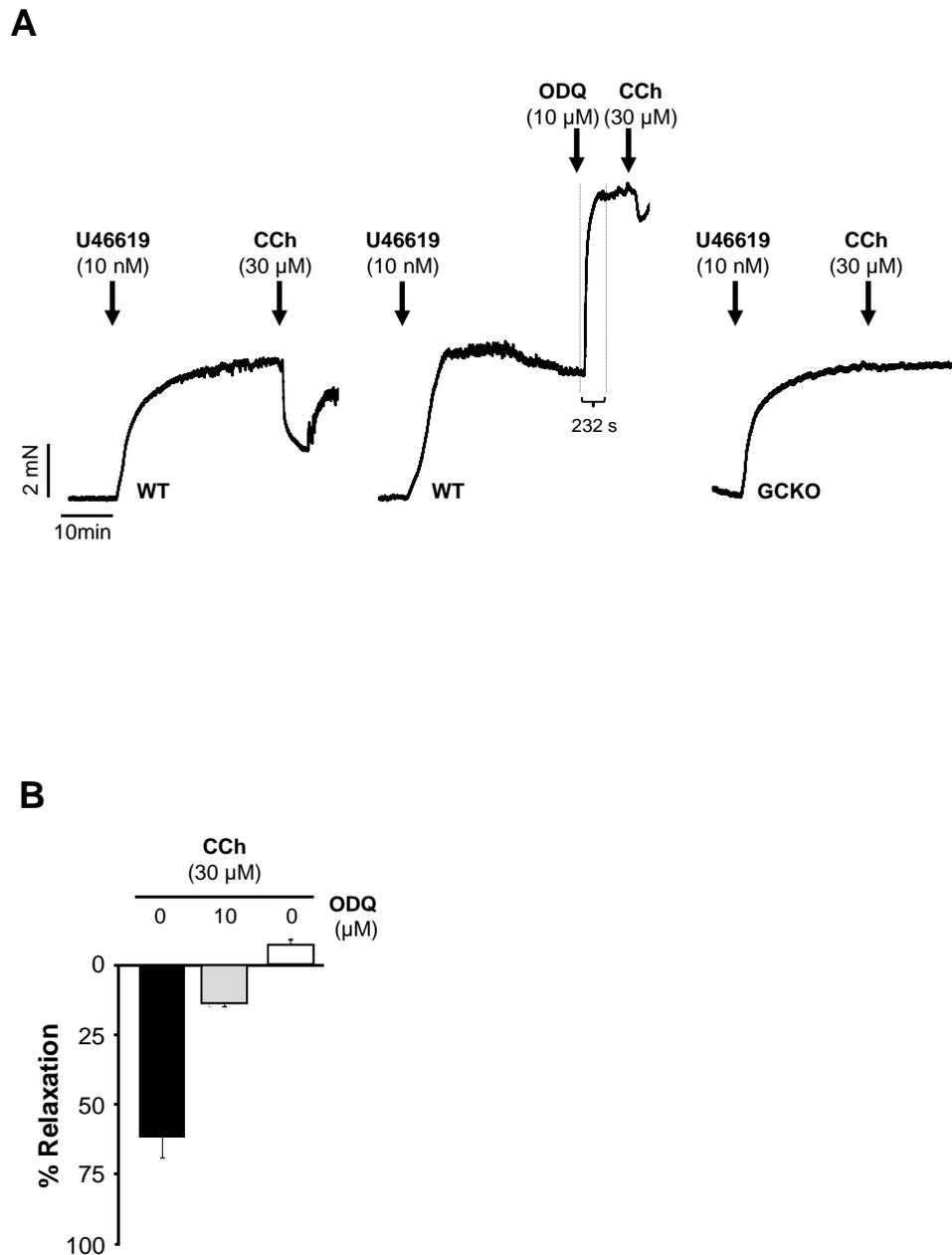
Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n=5 pro Genotyp.



Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

### Abb. 33: ODQ-Inhibition von nitrogenen Effekten in Fundus-Gewebe

Fundus-Streifen von WT-Tieren wurden mit 100 nM U46619 unter NANC-Bedingungen vorkontrahiert. Die EFS-induzierte Relaxation wurde vor und nach ODQ (10 μM)-Inkubation gemessen (10 V; 0,5 ms; 0,5 – 4 Hz). **(A)** Originalkurve von einem Organbadversuch. **(B)** Statistische Auswertung der Versuche. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=6.



Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

**Abb. 34: ODQ-Inhibition der Effekte endogen freigesetzten NOs in Aorta**

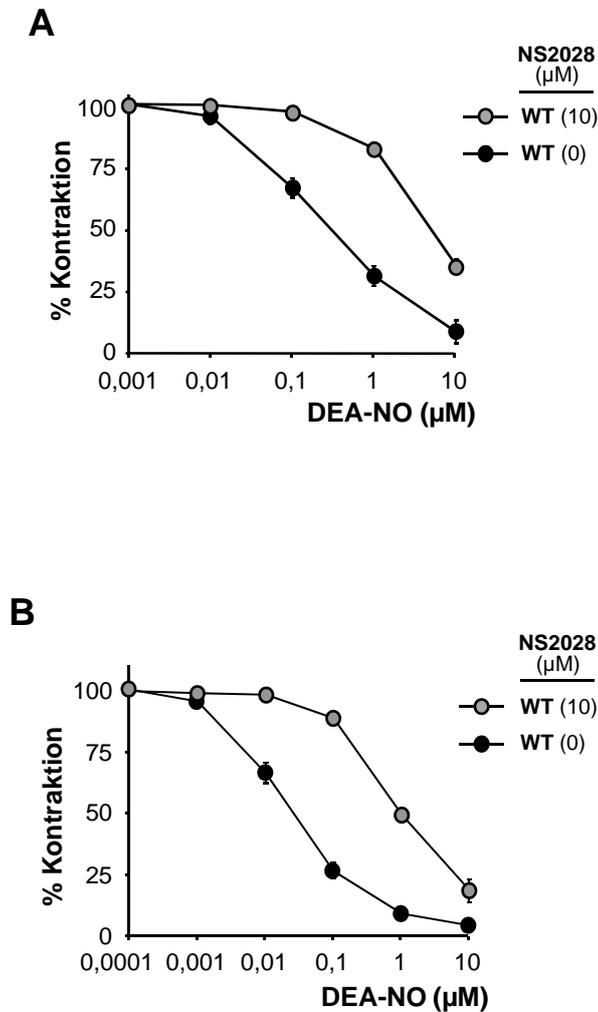
**A)** Aorten-Ringe von WT- und GCKO-Tieren wurden mit 10 nM U46619 vorkontrahiert. Anschließend wurde mit 30 μM CCh (beim WT in An- und Abwesenheit von 10 μM ODQ) relaxiert. Die NO-GC-Inhibition durch ODQ wurde nach ca. 3 min durch Einstellung eines stabilen Kontraktionsniveaus erreicht.

**B)** Statistische Auswertung der CCh-induzierten Relaxation in WT-Aorta (schwarz), WT-Aorta mit 10 μM ODQ (grau) und GCKO-Aorta (weiß). Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=4 (WT) und n=3 (GCKO).

dass der inhibierende Effekt von ODQ bereits nach ca. 3 min vollständig war ( $203 \pm 8$  s; n=4). In der statistischen Auswertung ist zu erkennen, dass die durch CCh ausgelöste Relaxation durch ODQ vermindert, jedoch nicht vollständig unterdrückt wurde. Im Gegensatz dazu wurde keine CCh-induzierte Relaxation der Aorta aus GCKO-Tieren festgestellt (Abbildung 34 B). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Inhibition der NO-GC durch ODQ auch die Wirkung endogen freigesetzten NOs nicht vollständig unterbinden kann und demnach die Verwendung von ODQ als Beweis für cGMP-unabhängige Effekte nicht ausreichend ist.

#### **4.3.6 Inhibition der NO-induzierten Relaxation durch NS2028**

Die Ergebnisse mit ODQ konnten mit einem weiteren spezifischen NO-GC-Hemmstoff, NS2028, wiederholt und bestätigt werden. Wie mit ODQ wurden auch die Experimente mit NS2028 an Fundus-Gewebe (Abbildung 35 A) und Aorten-Ringen (Abbildung 35 B) getestet. Zur Kontraktion von Fundus-Gewebe wurde  $0,1 \mu\text{M}$  CCh, für Aorten-Ringe  $1 \mu\text{M}$  PE verwendet. In beiden Geweben zeigte NS2028 einen inhibitorischen Effekt auf die NO-GC, der jedoch durch erhöhte Konzentrationen von DEA-NO überwunden werden konnte. Demzufolge scheint die NO-vermittelte Umkehrung der NO-GC-Inhibition eine gemeinsame Eigenschaft von Häm-oxidierenden Inhibitoren wie ODQ und NS2028 zu sein.



Wiedergabe aus „Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase“; Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A.; Br J Pharmacol. (2013) mit Genehmigung von WILEY.

### Abb. 35: Inhibition der NO-induzierten Relaxation durch NS2028

**A)** Fundus-Streifen von WT-Tieren wurden mit 0,1  $\mu\text{M}$  CCh vorkontrahiert. Im Anschluss erfolgte eine DEA-NO-induzierte Relaxation in An- und Abwesenheit von NS2028 (10  $\mu\text{M}$ ).

**B)** Aorten-Ringe von WT-Tieren wurden mit 1  $\mu\text{M}$  PE vorkontrahiert. Im Anschluss erfolgte eine DEA-NO-induzierte Relaxation in An- und Abwesenheit von NS2028 (10  $\mu\text{M}$ ).

Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n=5.

## 5. Diskussion

---

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) wird durch NO aktiviert und katalysiert die Bildung des intrazellulären second messengers cGMP. Sie besitzt eine Schlüsselfunktion in der NO/cGMP-Signalkaskade und übernimmt unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Relaxation glatter Muskulatur.

Für die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts wurde bisher gezeigt, dass die Relaxation über NO-GC in zwei Zelltypen (glatte Muskelzellen und interstitielle Zellen von Cajal) gesteuert wird. Eine NO-GC-Expression wurde allerdings auch für einen dritten Zelltyp (Fibroblasten-ähnliche Zellen) nachgewiesen, dessen funktionelle Bedeutung noch ungeklärt ist. Die Bedeutung der NO-GC in der glatten Muskulatur des unteren Harntrakts ist bisher generell nur spärlich beleuchtet worden. In der Literatur sind Untersuchungen mit muriner Urethra und Harnblase zu finden, die divergente Ergebnisse zur Bedeutung von NO zeigen.

Zur Aufklärung der NO-GC-Funktionen wurden in unserem Labor Knockout-Mäuse für das Enzym erzeugt (GCKO). Zusätzlich wurden zellspezifische Knockout-Linien mit Hilfe des Cre-Lox-Systems hergestellt. Injektion von Tamoxifen führt in diesen induzierbaren Knockout-Linien zur NO-GC-Deletion in den jeweiligen Zelltypen. Mittels dieser Knockout-Mäuse sollten innerhalb der vorliegenden Arbeit folgende Punkte untersucht werden.

- (1) Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der NO-GC im Gastrointestinaltrakt
- (2) Bedeutung der NO-GC im unteren Harntrakt
- (3) Analyse von NO-GC-Inhibitoren im Hinblick auf ihre Wirksamkeit

### 5.1 Bedeutung der NO-GC in glatter Muskulatur des Gastrointestinaltrakts

Dysfunktionen gastrointestinaler Muskulatur können zu verschiedenen Krankheiten wie beispielsweise Gastroparese, Achalasie und chronischer Obstipation führen. Die Ursache dieser Krankheitsbilder liegt oftmals in Regulationsstörungen von Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur. NO beeinflusst die Steuerung gastrointestinaler Motilität und ist an der Tonusregulation beteiligt. Durch die ubiquitäre bzw. zellspezifische Deletion der NO-GC in einer Maus kann die Lokalisation und Funktionalität der NO-GC im Detail untersucht werden. Unter anderem zum Verständnis der gastrointestinalen Motilität können diese NO-GC-Knockout-Modelle einen maßgeblichen Teil beitragen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die vollständige Deletion der NO-GC zu einer verlangsamten Darmpassagezeit und dadurch bedingt zu einer Wachstumsretardierung und frühzeitigem Sterben führt (Friebe et al., 2007). Ebenso

konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die NO-GC in gastrointestinalem Gewebe in mindestens drei verschiedenen Zelltypen vorliegt: in glatten Muskelzellen (SMC), in interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) sowie in Fibroblasten-ähnlichen Zellen (FLC; Groneberg et al., 2011). Der Einfluss der NO-GC in SMC und ICC auf die nitrege Relaxation im Gastrointestinaltrakt wurde ebenfalls bearbeitet und kürzlich publiziert (Groneberg et al., 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der NO-GC in diesen drei Zelltypen weitergehend analysiert werden. Einen Schwerpunkt dabei stellte die Untersuchung der NO-GC in FLC mittels Organbad- und Darmpassagezeitmessungen dar, sowie die Etablierung und Durchführung von Membranpotenzialmessungen in Glattmuskelzellen zur Untersuchung der Kommunikation zwischen den drei gastrointestinalen Zelltypen.

Aus den vorangegangenen Untersuchungen mit SMC-spezifischen (SM-GCKO) und ICC-spezifischen (ICC-GCKO) Knockout-Mäusen wurde deutlich, dass die nitrege Relaxation im Gastrointestinaltrakt sowohl über die NO-GC in SMC als auch in ICC gesteuert wird. Organbadversuche mit FLC-spezifischen Knockout-Mäusen (FLC-GCKO), die in Analogie zu den vorherigen Versuchen mit SM- und ICC-GCKO durchgeführt wurden, ergaben Folgendes: (1) Fundus-Steifen von FLC-GCKO-Tieren relaxierten in gleichem Ausmaß wie WT-Fundus. (2) Fundus-Gewebe eines Doppel-Knockouts von NO-GC in FLC und SMC (FLC/SM-GCKO) zeigte analog zu den Ergebnissen aus SM-GCKO-Tieren nur noch eine Relaxation von 50%. (3) Fundus-Gewebe eines Doppel-Knockouts von NO-GC in FLC und ICC (FLC/ICC-GCKO) hingegen konnte vollständig relaxiert werden, wies allerdings eine Rechtsverschiebung der Kurve auf, die auch in Fundus-Gewebe von ICC-GCKO-Tieren zu beobachten ist (siehe Abbildungen 10 A-D, 11 A-C). Diese Ergebnisse lassen zunächst darauf schließen, dass NO-GC in FLC keine Bedeutung für die NO-induzierte Relaxation in murinem Fundus-Gewebe einnimmt. Betrachtet man allerdings die Ergebnisse aus Fundus-Gewebe des Tripel-GCKO-Tieres wird deutlich, dass hier die Relaxation auf NO-Gabe hin fast vollständig fehlt (siehe Abbildungen 12 A+B). Der Vergleich mit der NO-induzierten Relaxation von Fundus-Steifen aus SM/ICC-GCKO-Tieren zeigt, dass Fundus aus Tripel-GCKO-Tieren weniger relaxiert; die Kurve des Tripel-GCKO-Fundus gleicht eher der des GCKO-Fundus. Dieses Ergebnis aus Tripel-GCKO-Fundus zeigt im Gegensatz zu den Ergebnissen aus FLC-, FLC/SM- und FLC/ICC-GCKO-Fundus doch eine Beteiligung der NO-GC in FLC an der NO-induzierten Relaxation.

Um physiologischere Bedingungen zur Analyse der NO-GC-Funktion in FLC zu schaffen, wurden im Anschluss elektrische Feldstimulationen (EFS) mit Fundus-Gewebe der verschiedenen Knockout-Tiere durchgeführt. Dabei werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes endogene Neurotransmitter im Gewebe ausgeschüttet. Die

Versuche wurden unter Bedingungen ausgeführt, die die exzitatorischen Neurotransmitter blockierten (NANC; nicht-adrenerg, nicht-cholinerg). Um die NO-Wirkung dabei möglichst präzise auswerten zu können, wurden die Stimulationen in An- und Abwesenheit des NO-Sensitizers Bay 41-2272 durchgeführt. Dieser verstärkte die cGMP-abhängige Relaxation des Gewebes und ermöglichte damit die Unterscheidung von einer eventuell cGMP-unabhängig eintretenden Relaxation durch Neurotransmitter wie ATP oder VIP. Die Versuche zeigten, dass lediglich Fundus-Streifen aus FLC/ICC-GCKO-Tieren eine verringerte Relaxation nach EFS aufwiesen, die auch mit Bay 41-2272 nur unwesentlich verstärkt werden konnte (siehe Abbildungen 13 A-D). Schlussfolgernd bedeutet das, dass die endogen durch NO vermittelte Relaxation ebenso wie die pharmakologisch mit NO-Donatoren induzierte Relaxation wesentlich von der NO-GC in ICC und SMC gesteuert wird. Die Deletion der NO-GC in FLC alleine scheint keinen bedeutenden Einfluss auf die endogene NO-Relaxation zu haben. Interessant ist allerdings, dass auch die Kombination aus NO-GC-Knockout in FLC und SMC keine auffälligen Veränderungen birgt, während FLC/ICC-GCKO-Gewebe in der endogen-vermittelten Relaxation beeinträchtigt erscheint. Das lässt den Rückschluss zu, dass die NO-GC in FLC und ICC auf eine bisher noch ungeklärte Weise zusammenwirken.

Da bereits in mehreren Publikationen gezeigt wurde, dass die Kommunikation zwischen den gastrointestinalen Zellen über Membranpotenzialänderungen gesteuert wird, sollten im Folgenden Membranpotenzialmessungen in SMC des Gastrointestinaltrakts der NO-GC-Knockout-Mäuse durchgeführt werden. Diese Messungen wurden zunächst in SMC aus proximalem Colon-Gewebe von WT- und GCKO-Tieren sowie von Einzelzell-Knockout-Tieren durchgeführt. Bisher konnte die regulierende Funktion der NO-GC auf das Ruhemembranpotenzial (RMP) keiner NO-GC-exprimierenden Zelle zugeordnet werden. Das RMP der Colon-SMC des GCKO lag deutlich erhöht bei einem Wert von  $-38,5 \text{ mV} \pm 1,1 \text{ mV}$ , während SMC aus WT-Colon ein RMP von  $-45,0 \pm 1,3 \text{ mV}$  aufwiesen. Auch SMC aus SM- und ICC-GCKO-Colon ließen ein depolarisiertes RMP erkennen. Lediglich das RMP der SMC aus FLC-GCKO-Colon zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Werten der SMC aus WT-Colon. Diese Befunde machen deutlich, dass die NO-GC maßgeblich an der Aufrechterhaltung des RMP beteiligt ist. Die Tatsache, dass das RMP auch in SMC aus SM- und ICC-GCKO-Colon depolarisiert ist, legt nahe, dass die NO-GC sowohl in SMC als auch in ICC unmittelbar an der Einstellung des Membranpotenzials beteiligt ist.

Mit zellspezifischen NO-GC-Knockout-Modellen ist nun ein tiefergehender Einblick in die nitric oxide Neurotransmission des Gastrointestinaltrakts möglich; besonders die

Messung der ‚Inhibitory junction potentials‘ (IJP) spielt im Rahmen dessen eine zentrale Rolle bei der Aufklärung der Zellinteraktionen. Die IJP-Messungen in SMC aus WT-Colon zeigten eindeutig zwei Phasen, von denen die erste als purinerg und die zweite als nitroerg identifiziert werden konnte. SMC aus GCKO-Colon wiesen nur noch das purinerge IJP auf. Dies beweist auch auf Membranpotenzialebene, dass die NO-GC im GCKO vollständig deletiert ist. Erstaunlich waren die Ergebnisse der Einzelzell-Knockout-Tiere: In SMC aus allen drei Knockout-Tieren (SM-, ICC- und FLC-GCKO-Tiere) war noch ein nitroerges IJP vorhanden. Dieses unterschied sich allerdings besonders bei SM- und ICC-GCKO-Colon in der Stärke bzw. der Dauer. SMC aus SM-GCKO-Colon zeigten eine in der Stärke vollständig erhaltene Hyperpolarisation, die allerdings im Vergleich zum WT-Colon verkürzt war. SMC aus ICC-GCKO-Colon hingegen hielten vergleichbar lang zum IJP in WT-Colon an, waren aber in ihrer Stärke deutlich reduziert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die NO-GC ebenfalls in beiden Zellen (SMC und ICC) an der Entstehung der IJPs beteiligt ist und somit vermutlich zwei Phasen des nitroergen IJPs unterschieden werden können. Die NO-GC in ICC scheint dabei initial eine größere Rolle zu spielen, was die Stärke der Hyperpolarisation steuert, wohingegen die NO-GC in SMC entscheidend an der Aufrechterhaltung der Hyperpolarisation und damit der Dauer beteiligt scheint. Weitere Versuche mit Colon-Gewebe aus den Doppel- und Tripel-Knockout-Tieren müssen erfolgen, um diese Hypothese zu überprüfen.

Als weiterer Beitrag zum Verständnis der NO-GC-Funktion im Gastrointestinaltrakt wurden auch *in vivo*-Versuche zur Ermittlung der Darmpassagezeit durchgeführt. Es war bekannt, dass SM- und ICC-GCKO-Tiere keine veränderte Darmpassagezeit aufweisen; SM/ICC-GCKO-Tiere hingegen zeigen eine erhöhte Darmpassagezeit (Groneberg et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Darmpassagezeit von FLC-, FLC/SM-, FLC/ICC- sowie Tripel-Knockout-Tieren gemessen und mit WT-Tieren verglichen. Überraschenderweise zeigten FLC-, FLC/SM- sowie Tripel-GCKO-Tiere eine verkürzte Darmpassagezeit, was gleichbedeutend mit einer erhöhten Motilität ist. Nur bei FLC/ICC-GCKO-Tieren wurde eine verlangsamte Darmpassagezeit ermittelt, die ähnlich zu der der SM/ICC-GCKO-Tiere war. Die Faktoren, die für die Entstehung dieser Ergebnisse eine Rolle spielen, sind äußerst komplex. Es ist zu berücksichtigen, dass neben den zellulären Effekten auf die Motilität auch neurologische und sekretorische Effekte einen Einfluss haben können. Eine Hypothese für die zellulären Effekte soll im Folgenden aufgestellt werden: Eine Beteiligung der NO-GC in allen drei Zelltypen des Gastrointestinaltrakts an der Regulierung der Motilität ist sehr wahrscheinlich, jedoch auf unterschiedliche Weise abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Dabei könnte die NO-GC in ICC (neben der notwendigen Kontraktion)

ausschlaggebend für die Relaxation des Darmes und damit für die generelle Koordination der Peristaltik sein, während die NO-GC in FLC entscheidend für den passiven Widerstand (Compliance) des Gewebes wäre. Die NO-GC in SMC wäre in diesem Schema als Regulator der gesamten Bewegung bzw. des Zusammenspiels von Kontraktion und Relaxation zu sehen. Im Folgenden soll die Anwendbarkeit der Hypothese anhand der Ergebnisse der einzelnen Knock-out-Mäuse überprüft werden: Fehlt die NO-GC in FLC, gäbe es keine Regulation des passiven Widerstands mehr im Gewebe; das Gewebe würde potenziell dehnbarer bei ansonsten intakter Koordination der Peristaltik. Dies könnte die generell beschleunigte Darmpassagezeit der Knockout-Linien mit fehlender NO-GC in FLC erklären, da bei dehnbarerem Gewebe weniger Druck benötigt wird, um den Nahrungsbrei voran zu treiben. Die einzige Ausnahme bei den FLC-GCKO-Knockout-Linien bilden die FLC/ICC-GCKO-Tiere, bei denen die Darmpassagezeit erhöht ist. Entsprechend der aufgestellten Hypothese gäbe es hierfür zwei Begründungen: (1) Die Dehnbarkeit des Gewebes durch Fehlen der NO-GC in FLC wäre erhöht, allerdings ist gleichzeitig der geordnete Ablauf der Peristaltik durch Fehlen der NO-GC in ICC gestört. (2) Die noch vorhandene NO-GC in SMC könnte unter diesen Bedingungen durch große Mengen NO aktiviert werden, die nicht mehr von NO-GC in ICC oder FLC (die dort stärker exprimiert ist als in SMC) abgefangen werden; aus diesem Grund wird den durch Acetylcholin ausgelösten Kontraktionen innerhalb der SMC direkt entgegengewirkt und die Balance von Kontraktion und Relaxation geht verloren. In Kombination bilden diese beiden Aspekte die Voraussetzung für eine Tonusverminderung des Darmes; der Nahrungsbrei wird demnach langsamer transportiert. Die aufgestellte Hypothese würde folglich auch erklären, warum dieses Phänomen nur bei Fehlen der NO-GC in ICC und FLC sowie Noch-Vorhandensein der NO-GC in SMC auftritt, nicht aber in Tripel-GCKO-Tieren: Bei diesen Tieren fehlt zusätzlich die NO-GC in SMC, wodurch Kontraktionen im erweiterten/dehnbareren Darmgewebe uneingeschränkt möglich wären. Diese Tatsache könnte bedingen, dass in Kombination mit der größeren Dehnbarkeit (durch Fehlen der NO-GC in FLC) die Darmpassagezeit nicht verlangsamt, sondern wiederum beschleunigt ist. Auch die verlangsamte Darmpassagezeit bei SM/ICC-GCKO-Tieren, die bereits im Vorfeld dieser Arbeit festgestellt wurde, könnte mit dieser Hypothese erklärt werden: Bei SM/ICC-GCKO-Tieren kann NO nur noch auf die NO-GC in FLC wirken, was gemäß der vorausgesetzten Annahme zu einer geringeren Dehnbarkeit des Darmgewebes führen würde. Zusätzlich fehlt auch hier die generelle Koordination der Peristaltik durch die NO-GC in ICC. Die Verlängerung der Darmpassagezeiten der SM/ICC- und FLC/ICC-GCKO-Tiere beruht also folglich der aufgestellten Hypothese auf zwei verschiedenen Mechanismen der Verlangsamung: Im FLC/ICC-GCKO-Tier ist

der Gastrointestinaltrakt vermutlich Tonus-vermindert und mit verringerter Koordination der Motilität (eingeschränkte Kontraktion in SMC, Erschlaffung des Darmes); im SM/ICC-GCKO-Tier liegt demgegenüber höchstwahrscheinlich eine Tonussteigerung des Darmgewebes bei gleichzeitig fehlender Motilitätsregulation vor (fehlende Relaxation). Diese Hypothese kann allerdings nicht abschließend bewiesen werden, da letztendlich der Zusammenhang mit den komplexen sekretorischen und neurologischen Prozessen in Bezug auf die Peristaltik unklar ist.

Grundsätzlich kann man zusammenfassen, dass die NO-GC in allen drei Zelltypen des Gastrointestinaltrakts die Steuerung der nitrogenen Signaltransduktion vermittelt. So legen die Ergebnisse dieser Arbeit folgende Vermutung nahe: Die NO-GC in ICC könnte ausschlaggebend für den generellen Ablauf der Peristaltik, die NO-GC in FLC entscheidend für den passiven Widerstand (Compliance) des Gewebes und die NO-GC in SMC bedeutsam für die Regulation des Zusammenspiels von Kontraktion und Relaxation sein. Da ICC und FLC zwischen Neuronen und SMC liegen, ist es naheliegend, dass die NO-GC in ICC und FLC Vermittler-Funktionen besitzen, um neuronale Signale auf die glatte Muskelzelle zu übertragen. Die NO-GC ist weniger stark in SMC exprimiert als in ICC bzw. FLC und könnte daher eher eine Backup-Funktion übernehmen. Eine eindeutige Zuordnung der NO-GC-Funktionen kann allerdings mit den bisher durchgeführten Versuchen nicht getroffen werden. Um einen weiterführenden Einblick in die Kommunikation zwischen den Zellen zu bekommen, müssen im Folgenden Membranpotenzialmessungen mit den verschiedenen Doppel-Knockout-Tieren sowie der Tripel-GCKO-Linie durchgeführt werden.

## **5.2 Bedeutung der NO-GC in glatter Muskulatur des unteren Harntrakts**

Erkrankungen des unteren Harntrakts (lower urinary tract symptoms; LUTS) treten vermehrt bei älteren Menschen auf. Im Zuge der demographischen Entwicklung leiden daher zunehmend mehr Menschen an den damit assoziierten Symptomen, wie beispielsweise vermehrtem Harndrang, Inkontinenz, Nykturie, Miktionsstörungen und unvollständiger Blasenentleerung (Andersson & Arner, 2004).

Bisher gibt es wenige Informationen zur Funktion der NO-GC im Zusammenhang mit der Regulation von Kontraktion und Relaxation des unteren Harntrakts (LUT). Untersuchungen mit nNOS- und PKGI-Knockout-Mäusen (Burnett et al., 1997; Persson et al., 2000) weisen teilweise unterschiedliche Ergebnisse auf (siehe unten). Andere Studien befassen sich mit der immunhistochemischen Analyse und der Charakterisierung der vorhandenen (speziell interstitiellen) Zelltypen im LUT (Pezzone et al., 2003; McCloskey et al., 2009; Koh et al., 2012). Dennoch gibt es bis jetzt weder

eine eindeutige Aufklärung der Funktion der NO/cGMP-Signalwirkung im LUT noch zur Existenz der verschiedenen interstitiellen Zelltypen.

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Verteilung und die Funktion der NO-GC in Urethra und Harnblase von globalen und zellspezifischen GCKO-Mäusen untersucht. Für Urethra aus WT-Mäusen zeigte sich eine vollständige Relaxation nach Gabe des NO-Donors DEA-NO, die in GCKO-Mäusen nicht vorhanden war. Dies bestätigt die Ergebnisse aus nNOS- und PKG-Knockout-Tieren: Beide Knockout-Linien zeigen eine reduzierte Urethra-Relaxation nach NO-Donor-Applikation (Burnett et al., 1997; Persson et al., 2000). Eine Beteiligung des NO/cGMP-Signalwegs an der Relaxation muriner Urethra ist daher sehr wahrscheinlich. Um weitergehend herauszufinden, ob diese Relaxation ausschließlich von NO-GC in glatten Muskelzellen abhängig ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche mit Urethra von SM-GCKO-Tieren durchgeführt. Wie in GCKO-Urethra gezeigt, unterblieb die NO-induzierte Relaxation von Urethra aus SM-GCKO-Tieren. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die NO-GC in glatten Muskelzellen die urethrale Relaxation vermittelt. Die immunhistochemischen Analysen bekräftigten dies, da in der Urethra die NO-GC ausschließlich in glatten Muskelzellen exprimiert wird. Ckit-positive interstitielle Zellen von Cajal (ICC) konnten in muriner Urethra nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund wird in einem nachfolgenden Abschnitt detailliert diskutiert. Das Fehlen ckit-positiver ICC bestätigt die Ergebnisse aus den Organbad-Experimenten, bei denen Urethra von ICC-GCKO-Tieren eine WT-ähnliche Relaxation aufwies. Diese Befunde stehen im Gegensatz zur NO-vermittelten Relaxation im Gastrointestinaltrakt, bei der NO-GC in mindestens drei Zelltypen (glatten Muskelzellen, interstitiellen Zellen von Cajal und Fibroblasten-ähnlichen Zellen) exprimiert wird; die Regulation der gastrointestinalen Relaxation wird in diesem Fall über komplexe Interaktionen zwischen diesen drei NO-GC-exprimierenden Zellen gesteuert.

Untersuchungen der Blase zeigten zunächst, dass keine Unterschiede im Verhältnis von Blasen- zu Körpergewicht zwischen WT- und GCKO-Tieren auftraten; eine Hypertrophie lässt sich daher ausschließen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für PKGI-Knockout-Tiere festgestellt (Persson et al., 2000), wohingegen nNOS-Knockout-Tiere ein größeres Blasengewicht aufwiesen (Burnett et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus keine Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Mäusen festgestellt, was ebenfalls mit den Ergebnissen von PKGI-Knockout-Mäusen übereinstimmt, aber den Resultaten von nNOS-Knockout-Mäusen widerspricht. Eine Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse aus nNOS-Knockout-Mäusen und PKGI- bzw. NO-GC-Knockout-Mäusen könnte sein, dass die Harnblasengewichte der nNOS-Knockout-Tiere nicht ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt wurden (Burnett

et al., 1997). Für PKGI- bzw. NO-GC-Knockout-Mäuse ist dies unerlässlich, da sie oftmals kleiner als ihre WT-Geschwistertiere sind. Für nNOS-Knockout-Mäuse fehlt eine Angabe in diesem Zusammenhang.

Da die NO-GC generell mit der Relaxation von glatter Muskulatur assoziiert wird, würde man eine solche Funktion auch für das glattmuskuläre Harnblasengewebe erwarten. Überraschenderweise trat allerdings nach DEA-NO-Gabe weder im WT- noch im GCKO-Gewebe eine deutliche Relaxation auf. Auch die Gabe des cGMP-Analogons 8-pCPT-cGMP führte zu keinem wesentlichen relaxierenden Effekt. Durch Gabe des Adenylyl-Cyclase-Aktivators Forskolin hingegen konnte eine vollständige Relaxation erreicht werden, was darauf schließen lässt, dass die cAMP-Signalkaskade die Hauptrolle bei der Relaxation der Harnblasenmuskulatur einnimmt. Erstaunlich ist jedoch, dass die immunhistochemischen Analysen dennoch eine NO-GC-Expression in Harnblasengewebe zeigten. Diese trat allerdings nicht in glatten Muskelzellen, sondern ausschließlich in interstitiellen Zellen auf. Die Identität dieser Zellen und die Funktion der dort exprimierten NO-GC konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Weitere Untersuchungen, wie beispielsweise Färbungen mit Antikörpern gegen PDGFR $\alpha$ -positive Zellen und Neurone sowie Messungen des Harnblasendrucks, könnten neue Erklärungen zu den noch offenen Fragen geben.

In der Literatur wird die Existenz von ckit-positiven ICC in der murinen Harnblase kontrovers diskutiert. Um die Existenz und die Verteilung der ICC zu untersuchen, werden im Gastrointestinaltrakt standardmäßig die zwei Marker Vimentin und ckit in immunhistochemischen Analysen angewendet. Auch im unteren Harntrakt wurden Zellen mit diesen zwei Markern nachgewiesen. McCloskey et al. (2009) konnten ckit- positive Zellen in murinem Harnblasengewebe von WT und W/W<sup>v</sup>-Mäusen anfärben. Bei Untersuchungen von Blasengewebe aus Meerschweinchen, konnten Smet et al. (1996) eine Kolokalisation von cGMP mit Vimentin zeigen. Demzufolge kamen sie zu der Schlussfolgerung, dass die cGMP-produzierenden Zellen in der Harnblase ICC sein könnten. Im Gegensatz dazu konnte in andere Studien die Existenz von ckit- positiven ICC in der murinen Blase nicht bestätigt werden (Pezzone et al., 2003). Kürzlich gelang allerdings eine Anfärbung von interstitiellen Zellen, die Vimentin- und PDGFR $\alpha$ -positiv sind (Koh et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse von Pezzone et al. bestätigt, da eine spezifische Färbung von ckit- positiven ICC nicht gezeigt werden konnte.

Insgesamt kann man zusammenfassen, dass die NO-GC in der murinen Urethra ausschließlich in SMC exprimiert wird und auch exklusiv über diese Zellen die NO-vermittelte Relaxation steuert. In der Harnblase hingegen wird die NO-GC nicht in SMC, sondern ausschließlich in interstitiellen Zellen exprimiert, die scheinbar keine

NO-abhängige Relaxation vermitteln. Zur Aufklärung der Identität dieser NO-GC-exprimierenden Zellen wären im Folgenden Färbungen mit weiteren Antikörpern sinnvoll. Da die funktionelle Bedeutung dieser Zellen bislang nicht in Organbadexperimenten erkennbar wurde, wären *in vivo*-Kathetermessungen zur weiterführenden Analyse angebracht.

### **5.3 Untersuchung von NO-GC-Inhibitoren**

Spezifische NO-GC-Inhibitoren wie ODQ und NS2028 werden üblicherweise verwendet, um cGMP-abhängige NO-Effekte zu überprüfen. Ebenso werden NO-induzierte Effekte in der Gegenwart dieser Inhibitoren oftmals als Bestätigung cGMP-unabhängiger Mechanismen gewertet. Besonders ODQ findet vielfach Verwendung. Der molekulare Mechanismus der NO-GC-Inhibition beruht auf der Bindung von ODQ an die prosthetische Häm-Gruppe der NO-GC, was zu einer Oxidation des Häm-Eisens führt. Die zur Beschreibung dieses Mechanismus zugrunde liegenden Versuche wurden an gereinigter NO-GC durchgeführt und wiesen auf eine NO-kompetitive Hemmung hin, die zu einer scheinbar irreversiblen Inaktivierung des Enzyms führt (Schrammel et al., 1996; Zhao et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einsatz der NO-GC-Inhibitoren ODQ und NS2028 zum Nachweis cGMP-unabhängiger Effekte unter Zuhilfenahme von NO-GC Knockout-Tieren untersucht. Dazu wurde die ODQ-vermittelte NO-GC-Inhibition in HEK-Zellen und Thrombozyten sowie in murinem Aorta- und Fundus-Gewebe bestimmt. Zur Stimulation der NO-GC wurden der radikalische NO-Donor DEA-NO sowie der nicht-radikalische NO-Donor GSNO eingesetzt. Die Ergebnisse aus den Versuchen bestätigen, dass ODQ ein potenter Inhibitor der NO-GC ist. Dennoch zeigte sich, dass in allen untersuchten Systemen durch steigende NO-Konzentrationen die ODQ-vermittelte NO-GC-Inhibition rückgängig gemacht werden konnte. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die ODQ-induzierte NO-GC-Inhibition im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schrammel et al. (1996) an gereinigter NO-GC in zellulärem Kontext nicht irreversibel ist. Ähnliche Resultate wurden auch mit NS2028 erhalten. Sowohl in Aorta- wie auch in Fundus-Gewebe konnte die NS2028-induzierte NO-GC-Inhibition durch steigende DEA-NO-Konzentrationen überwunden werden. Demnach scheint die Umkehrbarkeit der NO-GC-Inhibition durch steigende NO-Konzentrationen eine Eigenschaft zu sein, die von Häm-oxidierenden Inhibitoren wie ODQ und NS2028 geteilt wird.

Ähnliche Effekte wurden auch von Moro et al. (1996) in Thrombozyten und glatten Muskelzellen beobachtet. Der Einsatz des NO-Donors S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) im Verhältnis von 100:1 mit ODQ führte in deren Studie zur

partiellen Umkehr der NO-GC-Inhibition. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber, dass die Umkehrung der NO-GC-Inhibition bereits bei einem äquimolaren Einsatz von NO-Donor und ODQ auftreten kann. Auch der Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  ODQ, einer sehr hohen Konzentration, die ein bis zwei Zehnerpotenzen über der gewöhnlich eingesetzten Menge liegt, konnte die cGMP-Produktion weder in HEK-Zellen noch in Thrombozyten vollständig unterbinden. Ebenso wenig konnten 100  $\mu\text{M}$  ODQ in intaktem Aorta-Gewebe die Relaxation nach DEA-NO-Gabe verhindern, wohingegen eine Relaxation im GCKO bei gleicher DEA-NO-Konzentration ausblieb. Dieses Fehlen der NO-induzierten Relaxation im GCKO-Tier ließ schlussfolgern, dass der Effekt, der in Gegenwart von ODQ auftritt, eindeutig cGMP-abhängig und auf die unvollständige NO-GC-Hemmung zurück zu führen ist.

Um auszuschließen, dass die Umkehrung der NO-GC-Inhibition lediglich durch eine eventuell zu kurze Präinkubationszeit (routinemäßig 10 min) auftrat, wurden Experimente mit langer ODQ-Präinkubation (bis zu 30 min) durchgeführt. Weder in Thrombozyten noch in Aorta-Gewebe war ein Unterschied durch die verschiedentlich lange Präinkubationszeit feststellbar. Das ließ darauf schließen, dass die Reversion der ODQ-vermittelten NO-GC-Inhibition nicht durch eine unzureichend lange Präinkubationszeit bedingt ist.

Eine pharmakologische Stimulation der NO-GC durch NO-Donatoren führt unabhängig von dem physiologischen Ursprung des NOs zu einer generellen Erhöhung der NO-Konzentration im Gewebe. Das hat zur Folge, dass NO dabei in zellulären Bereichen ankommen kann, an denen unter physiologischen Bedingungen kein NO vorkommen würde. Aus diesem Grund wurde die ODQ-vermittelte NO-GC-Hemmung auch für endogen freigesetztes NO in Aorta- und Fundus-Gewebe untersucht. In Fundus-Gewebe wurde dazu durch elektrische Feldstimulation (EFS) endogenes NO aus nitrengen Nerven ausgeschüttet. ODQ konnte dabei unter den gewählten Bedingungen die Relaxation des Gewebes vollständig inhibieren. Im Gegensatz dazu wurde bei Zugabe von Carbachol zu WT-Aorta-Gewebe lediglich eine partielle Inhibition durch ODQ erreicht. Für sich allein betrachtet könnte dieser Befund in WT-Aorta-Gewebe als Beweis eines cGMP-unabhängigen Effektes dienen. Jedoch zeigte sich unter gleichen Bedingungen im GCKO-Aorta-Gewebe keine Relaxation infolge Carbachol-Applikation, was eindeutig einen cGMP-unabhängigen Mechanismus ausschließt.

Es stellt sich die Frage, warum die Wirksamkeit von ODQ so unterschiedlich ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die ODQ-vermittelte NO-GC-Inhibition von drei verschiedenen experimentellen Bedingungen abhängt:

Erstens spielt der NO-Donor mit der individuell unterschiedlichen Freisetzung des NOs eine wesentliche Rolle. Dies wurde deutlich in der vergleichenden Anwendung des

radikalischen NO-Donors DEA-NO und des nicht-radikalischen NO-Donors GSNO. Die NO-Spezies, die freigesetzt wird ( $\text{NO}\cdot$  vs.  $\text{NO}^+$ ), beeinflusste entscheidend die NO-Konzentration, die zur Umkehrung der ODQ-vermittelten NO-GC-Inhibition benötigt wurde.

Zweitens sind sowohl die Inkubationszeit von ODQ als auch die Halbwertszeit der NO-Donatoren bedeutende Parameter. Mittels Nachweis der VASP-Phosphorylierung durch Western-Blots wurden Experimente zur Zeitabhängigkeit der ODQ-vermittelten NO-GC-Inhibition durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei ansteigender Inkubationszeit von DEA-NO die initial vollständige Inhibition durch ODQ rückgängig gemacht werden kann. Die ODQ-vermittelte NO-GC-Inhibition konnte also durch ansteigende Inkubationszeiten des NO-Donors überwunden werden. Diese Tatsache ist von großer Bedeutung, da bereits ein kleiner cGMP-Anstieg zu funktionellen Effekten führen kann (Müllershausen et al., 2006).

Der dritte zu berücksichtigende Aspekt wird wichtig bei der Verwendung von Glattmuskel-Geweben im Organbad. Hier ist die Stärke der vorangehenden Kontraktion des Gewebes entscheidend. Die Experimente zeigten, dass nach Kontraktion von Fundus-Gewebe mit  $10\ \mu\text{M}$  Carbachol die sich anschließende DEA-NO-Relaxation durch ODQ vollständig inhibiert werden konnte. Nach einer schwächeren Kontraktion mit lediglich  $0,1\ \mu\text{M}$  Carbachol hingegen, konnte ODQ die folgende DEA-NO-Relaxation nicht vollständig inhibieren. Die Relaxation des Fundus-Gewebes in Gegenwart von ODQ könnte hier leicht als cGMP-unabhängiger Effekt missinterpretiert werden. Das Ausbleiben der Relaxation von GCKO-Fundus-Gewebe im direkten Vergleich jedoch bewies eindeutig, dass kein cGMP-unabhängiger Effekt vorliegt. Diese Ergebnisse belegen, dass ausschließlich der Vergleich mit GCKO-Gewebe eine absolut unmissverständliche Interpretation erlaubt.

Um auch ohne direkten Vergleich mit GCKO-Tieren sicher zu gehen, einen cGMP-unabhängigen Effekt zu haben, sollten mehrere Kriterien beachtet werden. In einer Studie von Wanstall et al. (2005) wurden einige solcher Kriterien aufgestellt, die allerdings auch den Einsatz von selektiven NO-GC-Inhibitoren in einer vollständig inhibierenden Konzentration beinhaltet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch eindeutig, dass NO-Effekte in der Gegenwart von ODQ bei Konzentrationen, die vermeintlich die NO-GC vollständig inhibieren ( $10$  und  $100\ \mu\text{M}$ ), nicht zwangsläufig cGMP-unabhängig sind. Basierend auf den starken Einflüssen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen gibt es keine ODQ-Konzentration, die als vollständig inhibierend angesehen werden kann. Folglich können NO-Effekte in der Anwesenheit von ODQ nicht als Beweis für eine cGMP-unabhängige Reaktion gelten. Es ist unerlässlich zusätzliche Kontrollen durchzuführen. Beispielsweise kann die cGMP-Abhängigkeit

einer Reaktion durch die Gabe von Sildenafil (Potenzierung) oder die Detektion der PKG-Aktivierung durch VASP-Phosphorylierung überprüft werden. Die quantitative Bestimmung von cGMP ist nicht beweisführend, da die Relaxation der glatten Muskulatur bereits bei NO-Konzentrationen auftritt, die noch nicht zu einem wesentlichen Anstieg des cGMP-Spiegels in der Zelle führen (Gordge et al., 1998; Müllershausen et al., 2006).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Effektivität der NO-GC-Inhibition durch ODQ von mindestens drei Faktoren abhängig ist: (1) die Klasse des NO-Donors, (2) die Inkubationszeit mit ODQ und dem NO-Donor sowie (3) die Stärke der Vorkontraktion bei Versuchen mit Glattmuskelgewebe. Die Wahl dieser Parameter ist von entscheidender Bedeutung und bestimmt, in welchem Ausmaß ODQ die NO-stimulierte NO-GC inhibieren kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen keinen Zweifel daran, dass ODQ verwendet werden kann, um cGMP-abhängige Effekte zu untersuchen. Der ODQ-Einsatz zum Beweis von cGMP-unabhängigen Effekten jedoch ist nicht zielführend.

## 6. Zusammenfassung

---

Die Stickstoffmonoxid (NO)/cGMP-Signaltransduktion besitzt eine entscheidende Rolle bei der Tonusregulation der glatten Muskulatur. Dabei ist NO neben seiner herausragenden Bedeutung für das vaskuläre System einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Gastrointestinaltrakt. Die Wirkung von NO beruht hauptsächlich auf der Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC), die aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Die Deletion der  $\beta_1$ -Untereinheit in Mäusen resultiert in einem vollständigen NO-GC-Knockout (GCKO).

Im Gastrointestinaltrakt ist die Expression von NO-GC in glatten Muskelzellen (SMC), interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) und Fibroblasten-ähnlichen Zellen (FLC) nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des NO/cGMP-Signalweges für die Regulation von Kontraktion und Relaxation innerhalb dieser drei Zelltypen anhand von zellspezifischen GCKO-Tieren untersucht. SMC- und ICC-spezifische GCKO-Tiere waren bereits vorhanden. FLC-spezifische GCKO-Tiere wurden generiert und mit den vorhandenen ICC- und SMC-GCKO-Linien gekreuzt, um Doppel- und Tripel-Knockout-Tiere zu erhalten. FLC-GCKO-Tiere zeigen eine NO-induzierte Relaxation glattmuskulären Gewebes, die der von WT-Tieren gleicht. Auch Gewebe von FLC/ICC- und FLC/SM-GCKO-Tieren kann durch NO relaxiert werden. Erst die Deletion der NO-GC in allen drei Zelltypen (Tripel-GCKO) führt zu einer Unterbrechung der NO-Relaxation, wie sie aus GCKO-Tieren bekannt ist. Überraschenderweise zeigt sich bei FLC-GCKO-Tieren eine beschleunigte Darmpassagezeit. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass die NO-GC in allen drei Zelltypen des Gastrointestinaltrakts an der nitrogenen Signaltransduktion beteiligt ist, wenn auch auf unterschiedliche Weise. Es besteht demnach eine Interaktion zwischen den verschiedenen Zelltypen, die durch weiterführende Versuche mit den vorhandenen Doppel-Knockout-Tieren sowie der Tripel-GCKO-Linie nähergehend untersucht werden muss.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle der NO-GC im unteren Harntrakt. Dort liegt die NO-GC in verschiedenen Zelltypen vor. In Urethra-Gewebe wird die NO-GC ausschließlich in SMC exprimiert, während sie in der Harnblase einzig in interstitiellen Zellen, nicht aber in SMC, befindet. Funktionell hat dies zur Folge, dass die NO-induzierte Urethra-Relaxation ausschließlich von glatten Muskelzellen vermittelt wird. Die Harnblasenmuskulatur hingegen zeigt keine Relaxation auf NO-Gabe hin. Die Identifizierung der NO-GC-exprimierenden interstitiellen Zellen sowie ihre Funktion sind bislang ungeklärt.

In einem dritten Projekt wurden Untersuchungen zur Effektivität der NO-GC-Inhibitoren ODQ und NS2028 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei einem Einsatz der Inhibitoren nicht von einer vollständigen Hemmung der NO-GC ausgegangen werden sollte. Drei Faktoren beeinflussen nachhaltig die Inhibitor-Effektivität: (1) die Klasse des NO-Donors, (2) die Inkubationszeit mit dem Inhibitor und dem NO-Donor sowie (3) die Stärke der Vorkontraktion bei Versuchen mit Glattmuskelgewebe. Die Wahl dieser Parameter bestimmt, in welchem Ausmaß ODQ und NS2028 die NO-stimulierte NO-GC inhibieren können. Aus diesem Projektteil resultiert, dass man den Einsatz dieser Inhibitoren nicht, wie vielfach in der Literatur vorzufinden, als Beweis für cGMP-unabhängige Effekte nutzen sollte.

## **7. Summary**

---

The nitric oxide (NO)/cGMP signal transduction has a prominent role in the control of smooth muscle tone. Besides its outstanding function in vascular relaxation NO is a major inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal (GI) tract. It acts predominantly via NO-sensitive guanylyl cyclase (NO-GC) which consists of two subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ). Deletion of the  $\beta_1$  subunit in the mouse leads to a global NO-GC knockout (GCKO).

In the GI tract, expression of NO-GC is detected in smooth muscle cells (SMC), interstitial cells of Cajal (ICC) and fibroblast-like cells (FLC). Using cell-specific knock-out mice the impact of NO/cGMP-signaling on regulation of contraction and relaxation in the respective GI cell types was investigated. SMC- and ICC-specific GCKO mice already existed in our lab whereas FLC-specific GCKO mice were generated and then crossed to obtain double and triple mutants. GI smooth muscle from FLC-GCKO mice shows a WT-like relaxation towards NO. Also tissue from FLC/ICC- and FLC/SM-GCKO mice can be relaxed by addition of NO. Only deletion of NO-GC in all three cell types leads to an abolished relaxation as seen in GCKO tissue. Surprisingly, FLC-GCKO mice show an accelerated gut transit time in comparison to WT animals. These results lead to the conclusion that NO-GC in all three GI cell types mediates nitrergic signaling in smooth muscle, even though in different ways. There seems to be an interaction of the three cell types which needs to be further attended to by investigation of the double- and triple-GCKO mutants.

The second part of this project engaged in the investigation of NO-GC in the lower urinary (LU) tract. Here, expression of NO-GC is detected in urethra and urinary bladder. Urethral NO-GC is expressed in SMC whereas in the urinary bladder NO-GC expression can only be detected in interstitial cells. As a consequence, NO-induced urethral relaxation is exclusively dependent on SMC. Bladder smooth muscle does not

reveal NO-mediated relaxation. The identification and function of the NO-GC expressing interstitial cells remains to be further investigated.

Investigation of the NO-GC inhibitors ODQ and NS2028 shows that their efficiency is dependent on three different factors: (1) class of NO donor, (2) incubation time of the inhibitor and the NO donor and (3) the strength of pre-contraction when using smooth muscle tissue. The choice of these parameters determines to which extent ODQ and NS2028 are able to inhibit NO-GC. For that reason use of these inhibitors should not be taken as proof of cGMP-independent effects.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Aaij C & Borst P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**, 192-200.
- Ahlner J, Andersson RG, Torfgard K & Axelsson KL. (1991). Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol Rev* **43**, 351-423.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P & 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.
- Andersson KE & Arner A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **84**, 935-986.
- Ashman DF, Lipton R, Melicow MM & Price TD. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* **11**, 330-334.
- Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, van Bodegom JW & Bruining HA. (1998). Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Crit Care Med* **26**, 660-667.
- Axelsson KL, Wikberg JE & Andersson RG. (1979). Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci* **24**, 1779-1786.
- Bender AT & Beavo JA. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**, 488-520.
- Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V & Hofmann F. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3505-3509.
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A & Hofmann F. (1999). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 151-171.
- Böhme E, Graf H & Schultz G. (1978). Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**, 131-143.
- Böhme E, Jung R & Mechler I. (1974). Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol* **38**, 199-202.
- Bootman MD, Berridge MJ & Roderick HL. (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.
- Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM & Herman AG. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**, 346-347.
- Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH & Valtchanoff JG. (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* **22**, 8961-8970.

- Burnett AL, Calvin DC, Chamness SL, Liu JX, Nelson RJ, Klein SL, Dawson VL, Dawson TM & Snyder SH. (1997). Urinary bladder-urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption of neuronal nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans. *Nat Med* **3**, 571-574.
- Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM & Ward SM. (1996). Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12008-12013.
- Cajal MR. (1893). Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C R Soc Biol (Paris)* **5**, 217,223.
- Capecchi MR. (1989a). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-1292.
- Capecchi MR. (1989b). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* **5**, 70-76.
- Capecchi MR. (1994). Targeted gene replacement. *Sci Am* **270**, 52-59.
- Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P & Bernstein A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* **335**, 88-89.
- Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Hess DT & Stamler JS. (2005). An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12159-12164.
- Chen Z, Zhang J & Stamler JS. (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8306-8311.
- Cobine CA, Hennig GW, Kurahashi M, Sanders KM, Ward SM & Keef KD. (2011). Relationship between interstitial cells of Cajal, fibroblast-like cells and inhibitory motor nerves in the internal anal sphincter. *Cell Tissue Res* **344**, 17-30.
- Dai X & Faber JE. (2010). Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. *Circ Res* **106**, 1870-1881.
- Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D & Friebe A. (2010). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost* **8**, 1343-1352.
- Daniel EE, Wang YF & Cayabyab FS. (1998). Role of gap junctions in structural arrangements of interstitial cells of Cajal and canine ileal smooth muscle. *Am J Physiol* **274**, G1125-1141.
- Deloose E, Janssen P, Depoortere I & Tack J. (2012). The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 271-285.
- Dhaese I, Vanneste G, Sips P, Buys E, Brouckaert P & Lefebvre RA. (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**, 251-259.

- Dhaese I, Vanneste G, Sips P, Buys ES, Brouckaert P & Lefebvre RA. (2009). Small intestinal motility in soluble guanylate cyclase alpha1 knockout mice: (Jejunal phenotyping of sGCalpha1 knockout mice). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**, 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 & Hofmann F. (1994). Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology* **33**, 1275-1282.
- Doggrell SA. (2005). Comparison of clinical trials with sildenafil, vardenafil and tadalafil in erectile dysfunction. *Expert Opin Pharmacother* **6**, 75-84.
- Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ & Snyder SH. (1997). Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3396-3401.
- Farrugia G. (2008). Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* **20 Suppl 1**, 54-63.
- Fernandez E, Guo X, Vergara P & Jimenez M. (1998). Evidence supporting a role for ATP as non-adrenergic non-cholinergic inhibitory transmitter in the porcine ileum. *Life Sci* **62**, 1303-1315.
- Fesenko EE, Kolesnikov SS & Lyubarsky AL. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-313.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I & Kleinert H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* **23**, 1121-1131.
- Francis SH & Corbin JD. (1999). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci* **36**, 275-328.
- Francis SH, Turko IV & Corbin JD. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **65**, 1-52.
- Friebe A & Koesling D. (1998). Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **53**, 123-127.
- Friebe A & Koesling D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* **93**, 96-105.
- Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A & Koesling D. (2007). Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7699-7704.
- Friebe A, Schultz G & Koesling D. (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *Embo J* **15**, 6863-6868.
- Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B & Keef KD. (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.

- Furchgott RF & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Gallego D, Gil V, Aleu J, Auli M, Clave P & Jimenez M. (2008). Purinergic and nitrenergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G522-533.
- Gallego D, Hernandez P, Clave P & Jimenez M. (2006). P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G584-594.
- Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, Herterich S, Geiger J, Smolenski A, Lohmann SM & Walter U. (2010). Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. *J Biol Chem* **285**, 18352-18363.
- Garcia-Lopez P, Garcia-Marin V, Martinez-Murillo R & Freire M. (2009). Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Res Rev* **61**, 154-169.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K & Mayer B. (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* **48**, 184-188.
- Geiselhoring A, Gaisa M, Hofmann F & Schlossmann J. (2004). Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett* **575**, 19-22.
- Geissler EN, Ryan MA & Housman DE. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* **55**, 185-192.
- Gerzer R, Bohme E, Hofmann F & Schultz G. (1981a). Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* **132**, 71-74.
- Gerzer R, Hofmann F & Schultz G. (1981b). Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem* **116**, 479-486.
- Goldberg ND, Dietz SB & O'Toole AG. (1969). Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem* **244**, 4458-4466.
- Gordge MP, Hothersall JS & Noronha-Dutra AA. (1998). Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br J Pharmacol* **124**, 141-148.
- Goyal RK & Chaudhury A. (2010). Mounting evidence against the role of ICC in neurotransmission to smooth muscle in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G10-13.
- Grasa L, Gil V, Gallego D, Martin MT & Jimenez M. (2009). P2Y(1) receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission in the rat colon. *Br J Pharmacol* **158**, 1641-1652.
- Groneberg D, Konig P, Koesling D & Friebe A. (2011). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is dispensable for nitrenergic signaling and gut motility in mouse intestinal smooth muscle. *Gastroenterology* **140**, 1608-1617.

- Groneberg D, König P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D & Friebe A. (2010). Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation* **121**, 401-409.
- Groneberg D, Lies B, König P, Jäger R & Friebe A. (2012). Preserved fertility despite erectile dysfunction in mice lacking the NO receptor. *J Physiol*.
- Groneberg D, Lies B, König P, Jäger R, Seidler B, Klein S, Saur D & Friebe A. (2013). Cell-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Reveals a Dual Pathway for Nitrergic Neuromuscular Transmission in the Murine Fundus Nitrergic Relaxation in Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Knockout Mice. *Gastroenterology*.
- Gyurko R, Kuhlencordt P, Fishman MC & Huang PL. (2000). Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H971-981.
- Gyurko R, Leupen S & Huang PL. (2002). Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility. *Endocrinology* **143**, 2767-2774.
- Halbrugge M & Walter U. (1989). Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem* **185**, 41-50.
- Harper JF & 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.
- Haslam RJ, Davidson MM, Davies T, Lynham JA & McClenaghan MD. (1978). Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**, 533-552.
- Hedlund P, Aszodi A, Pfeifer A, Alm P, Hofmann F, Ahmad M, Fassler R & Andersson KE. (2000). Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2349-2354.
- Hess DT & Stamler JS. (2012). Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem* **287**, 4411-4418.
- Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T & Mikoshiba K. (2005). Amplification of Ca<sup>2+</sup> signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem* **280**, 11723-11730.
- Horiguchi K & Komuro T. (2000). Ultrastructural observations of fibroblast-like cells forming gap junctions in the W/W(nu) mouse small intestine. *J Auton Nerv Syst* **80**, 142-147.
- Horiguchi K, Sanders KM & Ward SM. (2003). Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum. *Cell Tissue Res* **311**, 299-313.
- Houdebine LM. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol* **360**, 163-202.
- Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH & Fishman MC. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* **75**, 1273-1286.

- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA & Fishman MC. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239-242.
- Huizinga JD, Liu LW, Fitzpatrick A, White E, Gill S, Wang XY, Zarate N, Krebs L, Choi C, Starret T, Dixit D & Ye J. (2008). Deficiency of intramuscular ICC increases fundic muscle excitability but does not impede nitrergic innervation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G589-594.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB & Bernstein A. (1995). W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* **373**, 347-349.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9265-9269.
- Iino S, Horiguchi K, Horiguchi S & Nojyo Y. (2009a). c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature. *Histochem Cell Biol* **131**, 691-702.
- Iino S, Horiguchi K & 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* **152**, 437-448.
- Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y, Ward SM & Sanders KM. (2009b). Interstitial cells of Cajal contain signalling molecules for transduction of nitrergic stimulation in guinea pig caecum. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 542-550, e512-543.
- Iino S, Horiguchi S & Horiguchi K. (2011). Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W(jic) c-kit mutant mice. *J Smooth Muscle Res* **47**, 111-121.
- Jarchau T, Hausler C, Markert T, Pohler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, Lohmann SM & Walter U. (1994). Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9426-9430.
- Kantor DB, Lanzrein M, Stary SJ, Sandoval GM, Smith WB, Sullivan BM, Davidson N & Schuman EM. (1996). A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science* **274**, 1744-1748.
- Keef KD, Du C, Ward SM, McGregor B & Sanders KM. (1993). Enteric inhibitory neural regulation of human colonic circular muscle: role of nitric oxide. *Gastroenterology* **105**, 1009-1016.
- Keilbach A, Ruth P & Hofmann F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem* **208**, 467-473.
- Kitamura Y, Yokoyama M, Matsuda H & Shimada M. (1980). Coincidental development of forestomach papilloma and prepyloric ulcer in nontreated mutant mice of W/W<sup>v</sup> and Sl/Sl<sup>d</sup> genotypes. *Cancer Res* **40**, 3392-3397.
- Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G & Offermanns S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* **144**, 745-754.

- Klemm MF & Lang RJ. (2002). Distribution of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (SK2 and SK3) immunoreactivity in intestinal smooth muscles of the guinea-pig. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 18-25.
- Knowles RG & Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298** ( Pt 2), 249-258.
- Koesling D & Friebe A. (1999). Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 41-65.
- Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch KD, Mülsch A, Bohme E, Schultz G & Frank R. (1988). The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett* **239**, 29-34.
- Koh BH, Roy R, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG, Sergeant GP, Hatton WJ, Ward SM, Sanders KM & Koh SD. (2012). Platelet-derived growth factor receptor-alpha cells in mouse urinary bladder: a new class of interstitial cells. *J Cell Mol Med* **16**, 691-700.
- Komuro T. (1999). Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech* **47**, 267-285.
- Kurahashi M, Zheng H, Dwyer L, Ward SM, Don Koh S & Sanders KM. (2011). A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *J Physiol* **589**, 697-710.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landgraf W, Hofmann F, Pelton JT & Huggins JP. (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* **29**, 9921-9928.
- Laubach VE, Shesely EG, Smithies O & Sherman PA. (1995). Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10688-10692.
- Leinders-Zufall T & Zufall F. (1995). Block of cyclic nucleotide-gated channels in salamander olfactory receptor neurons by the guanylyl cyclase inhibitor LY83583. *J Neurophysiol* **74**, 2759-2762.
- Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D & Shivakrupa R. (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* **23**, 16-43.
- Lies B, Groneberg D, Gambaryan S & Friebe A. (2013). Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase *Brit J Pharmacol*. [Epub ahead of print]
- Lima B, Forrester MT, Hess DT & Stamler JS. (2010). S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res* **106**, 633-646.
- Lincoln TM & Cornwell TL. (1993). Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb J* **7**, 328-338.
- Lindstrom CG, Rosengren JE & Fork FT. (1979). Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* **20**, 523-536.

- Loesch A & Burnstock G. (1995). Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in coronary and pulmonary arteries of newborn rats. *Cell Tissue Res* **279**, 475-483.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U & De Jonge HR. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* **22**, 307-312.
- Lorente JA, Landin L, De Pablo R, Renes E & Liste D. (1993). L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* **21**, 1287-1295.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP & Waldman SA. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**, 375-414.
- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S & Nishi K. (1992). Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* **116**, 369-375.
- Marcondes S, Cardoso MH, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G & Antunes E. (2006). Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3434-3439.
- Marletta MA. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927-930.
- Martinez-Ruiz A, Cadenas S & Lamas S. (2011). Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* **51**, 17-29.
- Mashimo H, He XD, Huang PL, Fishman MC & Goyal RK. (1996). Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *J Clin Invest* **98**, 8-13.
- Mayer B, Brunner F & Schmidt K. (1993). Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J* **14 Suppl I**, 22-26.
- McCloskey KD, Anderson UA, Davidson RA, Bayguinov YR, Sanders KM & Ward SM. (2009). Comparison of mechanical and electrical activity and interstitial cells of Cajal in urinary bladders from wild-type and W/W<sup>v</sup> mice. *Br J Pharmacol* **156**, 273-283.
- Megson IL & Miller MR. (2009). NO and sGC-stimulating NO donors. *Handb Exp Pharmacol*, 247-276.
- Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL & Kadowitz PJ. (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.
- Meng E, Young JS, Cha TL, Sun GH, Yu DS & Brading AF. (2012). Neuronal-derived nitric oxide modulates the activity of mouse detrusor smooth muscle. *NeuroUrol Urodyn* **31**, 572-578.
- Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M & Koesling D. (2006). Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest* **116**, 1731-1737.

- Mergia E, Russwurm M, Zoidl G & Koesling D. (2003). Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* **15**, 189-195.
- Moncada S & Higgs EA. (1995). Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J* **9**, 1319-1330.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.
- Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW & Moncada S. (1996). cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1480-1485.
- Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC & Huang PL. (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.
- Müllershausen F, Lange A, Mergia E, Friebe A & Koesling D. (2006). Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Mol Pharmacol* **69**, 1969-1974.
- Mullis KB & Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Mülsch A, Busse R, Liebau S & Förstermann U. (1988). LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* **247**, 283-288.
- Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM & Harrison DG. (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **95**, 187-194.
- Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S & 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.
- Murthy KS. (2006). Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* **68**, 345-374.
- Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K & Murad F. (1988). Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 1139-1147.
- Nathan C & Xie QW. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-918.
- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM & Snyder SH. (1995). Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* **378**, 383-386.
- Ny L, Pfeifer A, Aszodi A, Ahmad M, Alm P, Hedlund P, Fassler R & Andersson KE. (2000). Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Br J Pharmacol* **129**, 395-401.

- Olesen SP, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Busse R & Mülsch A. (1998). Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* **123**, 299-309.
- Ordog T, Hayashi Y & Gibbons SJ. (2009). Cellular pathogenesis of diabetic gastroenteropathy. *Minerva Gastroenterol Dietol* **55**, 315-343.
- Palmer RM, Ferrige AG & Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Parker JD & Gori T. (2001). Tolerance to the organic nitrates: new ideas, new mechanisms, continued mystery. *Circulation* **104**, 2263-2265.
- Persson K, Pandita RK, Aszodi A, Ahmad M, Pfeifer A, Fassler R & Andersson KE. (2000). Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1112-1120.
- Pezzone MA, Watkins SC, Alber SM, King WE, de Groat WC, Chancellor MB & Fraser MO. (2003). Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F925-929.
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R & Hofmann F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* **17**, 3045-3051.
- Pluja L, Fernandez E & Jimenez M. (1999). Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* **126**, 883-892.
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS & Sessa WC. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* **101**, 731-736.
- Russwurm M, Wittau N & 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.
- Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH, Jr. & Erlich HA. (1988a). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* **319**, 537-541.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA. (1988b). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salmhofer H, Neuhuber WL, Ruth P, Huber A, Russwurm M & Allescher HD. (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**, 331-340.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press **2nd edition**.

- Sanders KM. (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **111**, 492-515.
- Sanders KM, Hwang SJ & Ward SM. (2010). Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol* **588**, 4621-4639.
- Sanders KM, Ward SM, Thornbury KD, Dalziel HH, Westfall DP & Carl A. (1992). Nitric oxide as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Jpn J Pharmacol* **58 Suppl 2**, 220P-225P.
- Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P & Hofmann F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* **87**, 825-830.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F & Ruth P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* **404**, 197-201.
- Schmidt HH & Walter U. (1994). NO at work. *Cell* **78**, 919-925.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D & Mayer B. (1996). Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **50**, 1-5.
- Schultz G, Schultz, K.-D., Böhme, E. und Kreye, V. A. (1978). The possible role of cyclic GMP in the action of hormones and drugs on smooth muscle tonus: Effects of exogenous cyclic GMP derivatives. *Adv Ther (ed J C Stoclet) Pergamon Press, Oxford, New York* **Vol. 3**, 113-122.
- Schultz K & Schultz G. (1977). Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* **265**, 750-751.
- Shibuki K & Okada D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* **349**, 326-328.
- Sivarao DV, Mashimo H & Goyal RK. (2008). Pyloric sphincter dysfunction in nNOS $^{-/-}$  and W/W $^v$  mutant mice: animal models of gastroparesis and duodenogastric reflux. *Gastroenterology* **135**, 1258-1266.
- Sivarao DV, Mashimo HL, Thatte HS & Goyal RK. (2001). Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS $^{-/-}$  and hypotensive in W/W $^v$  mutant mice. *Gastroenterology* **121**, 34-42.
- Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR & de Vente J. (1996). Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience* **71**, 337-348.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (2003). Ca $^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358.

- Stasch JP, 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 & Wunder F. (2002). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* **136**, 773-783.
- Steiner AL, Wehmann RE, Parker CW & Kipnis DM. (1972). Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **2**, 51-61.
- Stone JR & Marletta MA. (1995). Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* **34**, 14668-14674.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF & Nathan CF. (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**, 7773-7777.
- Suzuki H, Ward SM, Bayguinov YR, Edwards FR & Hirst GD. (2003). Involvement of intramuscular interstitial cells in nitrenergic inhibition in the mouse gastric antrum. *J Physiol* **546**, 751-763.
- Takaki M. (2003). Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* **39**, 137-161.
- Taxi J. (1969). Morphological and cytochemical studies on the synapses in the autonomic nervous system. *Prog Brain Res* **31**, 5-20.
- Taylor AB, Kreulen D & Prosser CL. (1977). Electron microscopy of the connective tissues between longitudinal and circular muscle of small intestine of cat. *Am J Anat* **150**, 427-441.
- Thuneberg L. (1982). Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* **71**, 1-130.
- Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, Nishi K, Kobayashi S & Sanders KM. (1995). c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* **280**, 97-111.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA & Warman ML. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* **29**, 52, 54.
- Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y & Yanagihara N. (2009). Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J* **73**, 986-993.
- Ushio-Fukai M, Griending KK, Akers M, Lyons PR & Alexander RW. (1998). Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* **273**, 19772-19777.

- Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EM, Bot AG, Edixhoven M, Boomaars WE, Lohmann SM & de Jonge HR. (1998). Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1466-1471.
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, de Kerchove d'Exaerde A, Jr., Gillard K, Panthier JJ, de Laet MH & Schiffmann SN. (2002). Kit-negative fibroblast-like cells expressing SK3, a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, in the gut musculature in health and disease. *Cell Tissue Res* **310**, 349-358.
- Vanneste G, Dhaese I, Sips P, Buys E, Brouckaert P & Lefebvre RA. (2007). Gastric motility in soluble guanylate cyclase alpha 1 knock-out mice. *J Physiol* **584**, 907-920.
- Waldman SA, Rapoport RM & 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 & Gambaryan S. (2004). Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood* **104**, 2609.
- Wang GD, Wang XY, Hu HZ, Liu S, Gao N, Fang X, Xia Y & Wood JD. (2007). Inhibitory neuromuscular transmission mediated by the P2Y1 purinergic receptor in guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1483-1489.
- Wang X, Huang G, Luo X, Penninger JM & Muallem S. (2004). Role of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) in Ca<sup>(2+)</sup> oscillations and adaptation of Ca<sup>(2+)</sup> signaling to reduce excitability of RGS2<sup>-/-</sup> cells. *J Biol Chem* **279**, 41642-41649.
- Wanstall JC, Homer KL & Doggrel SA. (2005). Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets. *Curr Vasc Pharmacol* **3**, 41-53.
- Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M & Sanders KM. (2000). Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* **20**, 1393-1403.
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S & Sanders KM. (1994). Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* **480 ( Pt 1)**, 91-97.
- Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY & Sanders KM. (1998). Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* **115**, 314-329.
- Ward SM & Sanders KM. (2001). Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* **262**, 125-135.
- Webb RC. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* **27**, 201-206.
- Wernet W, Flockerzi V & Hofmann F. (1989). The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* **251**, 191-196.

- Winqvist RJ, Faison EP, Waldman SA, Schwartz K, Murad F & Rapoport RM. (1984). Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7661-7664.
- Zhang RX, Wang XY, Chen D & Huizinga JD. (2011). Role of interstitial cells of Cajal in the generation and modulation of motor activity induced by cholinergic neurotransmission in the stomach. *Neurogastroenterol Motil* **23**, e356-371.
- Zhang Y, Carmichael SA, Wang XY, Huizinga JD & Paterson WG. (2010). Neurotransmission in lower esophageal sphincter of W/W<sup>v</sup> mutant mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G14-24.
- Zhao Y, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JP, Babcock GT & Marletta MA. (2000). Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* **39**, 10848-10854.
- Zhu MH, Sung IK, Zheng H, Sung TS, Britton FC, O'Driscoll K, Koh SD & Sanders KM. (2011). Muscarinic activation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current in interstitial cells of Cajal. *J Physiol* **589**, 4565-4582.

## 9. Eigene Publikationen

---

- Lies B**, Martens S, Schmidt S, Boll M & Wenzel U. (2012). Flavone potently stimulates an apical transporter for flavonoids in human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res.* 56, 1627-1635.
- Groneberg D, **Lies B**, König P, Jäger R & Friebe A. (2012). Preserved fertility despite erectile dysfunction in mice lacking the NO receptor. *J Physiol.* 591, 491-502.
- Groneberg D, **Lies B**, König P, Jäger R, Seidler B, Klein S, Saur D & Friebe A. (2013). Cell-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Reveals a Dual Pathway for Nitrgenic Neuromuscular Transmission in the Murine Fundus Nitrgenic Relaxation in Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Knockout Mice. *Gastroenterology.* 145,188-96
- Jäger R, Groneberg D, **Lies B**, Bettaga N, Kümmel M & Friebe A. (2013). Radioimmunoassay for the Quantification of cGMP Levels in Cells and Tissues. *Methods Mol Biol.* 1020, 63-72.
- Lies B**, Groneberg D, Gambaryan S & Friebe A. (2013). Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase *Brit J Pharmacol.* [Epub ahead of print]
- Lies B**, Groneberg D, Friebe A.  
Correlation of cellular expression with function of NO-sensitive guanylyl cyclase in the murine lower urinary tract. *Eingereicht*

## Abstracts

- Groneberg D., König P., **Lies B.**, Friebe A.  
Two independent cGMP-mediated pathways mediate nitrgenic 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 nitrgenic relaxation in ICC and SMC: Studies in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase.  
90th Annual Meeting: German Physiological Society, 26. - 29.03.2011, Regensburg
- Lies B.**, Groneberg D., Saur D., König P., Friebe A.  
Nitrgenic relaxation of gastrointestinal smooth muscle: Role of interstitial cells of Cajal and smooth muscle cells  
5th International Conference on cGMP, 24. - 26.06.2011, Halle an der Saale
- Lies B.**, Groneberg D., Saur D., König P., Friebe A.  
How does NO relax gastrointestinal smooth muscle?  
Workshop on Smooth Muscle Function, 05.12.2011, Lübeck
- Lies B.**, Groneberg D., König P., Friebe A.  
Gastrointestinal nitrgenic relaxation by smooth muscle and non-smooth muscle cells  
91st Annual Meeting: German Physiological Society, 22. - 25.03.2012, Dresden

- Friebe A., König P., **Lies B.**, Groneberg D  
Nitrgic relaxation via ICC, FLC and SMC: Studies in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase  
Joint International Meeting in Neurogastroenterology and Motility. 06. - 08.09.2012, Bologna, Italien
- Lies B.**, Groneberg D., König P., Saur D., Friebe A.  
NO in the gastrointestinal tract: What it takes to relax  
Joint International Meeting in Neurogastroenterology and Motility. 06. - 08.09.2012, Bologna, Italien
- Groneberg D., Zizer E., Wagner M., **Lies B.**, Friebe A.  
Achalasia in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase  
Joint International Meeting in Neurogastroenterology and Motility. 06. - 08.09.2012, Bologna, Italien
- Lies B.**, Groneberg D., König P., Friebe A.  
Nitrgic relaxation of gastrointestinal smooth muscle: pharmacological and electrophysiological approaches  
Workshop on Smooth Muscle Function, 10.12.2012, Lübeck
- Groneberg D., **Lies B.**, Jäger R., König P., Friebe A.  
Fertility in male mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase  
Workshop on Smooth Muscle Function, 10.12.2012, Lübeck
- Lies B.**, Groneberg D., König P., Saur D., Friebe A.  
Mechanisms of gastrointestinal nitrgic relaxation  
92nd Annual Meeting: German Physiological Society, 02. - 04.03.2013, Heidelberg
- Groneberg D., Zizer E., **Lies B.**, Wagner M., Friebe A.  
Achalasia in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase  
92nd Annual Meeting: German Physiological Society, 02. - 04.03.2013, Heidelberg
- Lies B.**, Groneberg D., Saur D., Friebe A.  
Nitrgic relaxation in the gut: Role of smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and fibroblast-like cells  
Annual meeting: German Society for Neurogastroenterology and Motility, 22. - 24.03.2013, Freising
- Lies B.**, Groneberg D., Saur D., Friebe A.  
Localization and function of NO-GC in the murine gastrointestinal and lower urinary tract  
6th International Conference on cGMP, 28. - 30.06.2013, Erfurt
- Bettaga N, Groneberg D, Jäger R, **Lies B.**, Friebe A.  
Cell type-specific knock out models to unravel NO/cGMP signaling in smooth muscle  
6th International Conference on cGMP, 28. - 30.06.2013, Erfurt
- Lies B.**, Friebe A.  
Mechanisms of gastrointestinal nitrgic relaxation  
UEG Basic Science Course, 10. - 12.07.2013, London, United Kingdom

## Preise

2011 Poster-Award, 5<sup>th</sup> International Conference on cGMP

2013 Poster-Award, 92nd Annual Meeting of the German Physiological Society

## 10. Danksagung

---

Bei der Durchführung dieses Forschungsprojektes durfte ich wertvolle Unterstützung erfahren. An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren:

Zu allererst gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die kompetente und fördernde Begleitung dieser Arbeit. Besonders dankbar bin ich ihm für seine stets offene Tür sowie für seine vielen hilfreichen Ideen und konstruktiven Ratschläge. Die positive Atmosphäre und das beständige Gespräch waren für die Entwicklung und das Fortkommen meiner Arbeit von unschätzbarem Wert und haben mir ermöglicht, die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens zu erlernen und darauf aufzubauen.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die nützlichen Empfehlungen bei der Erstellung dieser Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für die Übernahme der Tätigkeit des dritten Prüfers sowie für seine hilfreiche Unterstützung bei neurophysiologischen Fragestellungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dieter Groneberg. Von Beginn meiner Arbeit an habe ich die Aufgeschlossenheit und das gute Miteinander sehr zu schätzen gewusst. Ich danke ihm für die ausgezeichnete fachliche Betreuung, die vielen lehrreichen und produktiven Gespräche, seine umfangreiche Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt seine unerschöpfliche Zuversicht.

Bei meinen Kollegen Noomen Bettaga, Michaela Kümmel und Dr. Ronald Jäger möchte ich mich herzlich bedanken für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor, das freundschaftliche und angenehme Arbeitsklima und die wunderbare gemeinsame Zeit. Darüber hinaus danke ich ebenfalls allen Mitarbeitern der anderen Arbeitsgruppen des Instituts für Physiologie für das kollegiale Miteinander.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Versuchen mit humanen Thrombozyten gilt mein herzlicher Dank Dr. Stepan Gambaryan und Linda Kehrer.

Christian Geiger, Armin Liebenstein, Franz-Josef Sauer und Max Wiesen sind mir durch ihre geduldige und tatkräftige technische Unterstützung bei Aufbau und Etablierung des Mikroelektroden-Messstandes im Laufe meines Projektes zu bedeutenden Helfern geworden. Für ihre professionelle und zugleich herzliche Hilfsbereitschaft bin ich ihnen überaus dankbar.

Zuletzt möchte ich meinen größten Dank den Menschen widmen, die mir stetigen Rückhalt in meinem Leben gegeben haben: meiner Familie. Die grenzenlose Unterstützung und die immerwährende Ermutigung, insbesondere meiner Eltern, haben mich auf meinem Weg fortwährend begleitet und ihn für mich begehbar gemacht. Ich danke euch von ganzem Herzen.