

Die nitric oxide Neurotransmission im Gastrointestinaltrakt der Maus

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



vorgelegt von

Katharina Beck

aus Erbach/Odw

Würzburg 2018

Eingereicht bei der Fakultät für Biologie am

.....

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender

1. Gutachter

2. Gutachter

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Eidesstattliche Erklärung

nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Die nitric oxide Neurotransmission im Gastrointestinaltrakt der Maus**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den

.....

Katharina Beck

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die NO-cGMP-Signalkaskade.....	1
1.1.1. Bildung von NO und dessen physiologische Aufgaben.....	1
1.1.2. NO-sensitive Guanylyl-Cyclase.....	4
1.1.3. cGMP und dessen Effektoren.....	5
1.1.3.1. cGMP-abhängige Proteinkinase.....	6
1.1.3.2. cGMP-aktivierte Ionenkanäle.....	6
1.1.3.3. cGMP-regulierte Phosphodiesterasen.....	7
1.2. Gastrointestinaltrakt.....	8
1.2.1. Glatte Muskulatur und Motilität.....	8
1.2.1.1. Glatte Muskelzellen.....	10
1.2.1.2. Interstitielle Zellen von Cajal.....	11
1.2.1.3. Fibroblasten-ähnlichen Zellen.....	13
1.2.1.4. Zelluläre Regulation der Kontraktilität im Colon.....	14
1.2.1.4.1. Myogene spontane Kontraktionen.....	14
1.2.1.4.2. Neurogene propulsive Kontraktionen.....	15
1.2.2. Mukosa und Zellerneuerung.....	16
1.2.2.1. Stammzellen und Stammzellnische.....	17
1.2.2.2. Wnt.....	19
1.2.2.3. BMP.....	19
1.2.2.4. Der BMP-Antagonist Gremlin.....	20
1.2.2.5. Die Rolle der NO-GC bei der Entwicklung von Adenomen.....	20
1.3. Transgene Mausmodelle.....	21
1.3.1. Mausmodelle für die NOS.....	22
1.3.2. Mausmodelle für die NO-GC.....	22
1.3.3. Mausmodelle für die PKG.....	24
1.3.4. Mausmodelle für ICC.....	24
2. Zielsetzung	26
3. Material und Methoden	28
3.1. Material.....	28
3.1.1. Chemikalien.....	28
3.1.2. Puffer.....	28
3.1.3. Antikörper für Immunhistochemie.....	29
3.1.4. Sonden für In-situ-Hybridisierung.....	29

3.1.5. Kits, Geräte und Software.....	30
3.2.1. Tiere.....	31
3.2.1.1. Haltung und Zucht.....	31
3.2.1.2. Induktion der zellspezifischen Knockout-Tiere und Reportermäuse.....	33
3.2.1.3. Genotypisierung.....	33
3.2.2. Motilitätsmessungen.....	33
3.2.2.1. Myographiestudien.....	33
3.2.2.2. Kontraktionsmusterkarten.....	34
3.2.3. Histologie.....	36
3.2.3.1. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	36
3.2.3.2. Immunhistochemie.....	37
3.2.3.3. In-situ-Hybridisierung.....	38
3.2.4. Analyse der mukosalen Veränderungen im SMC-GCKO-Colon.....	38
3.2.5. RNA Extraktion und mRNA Sequenzierung.....	39
3.2.6. Statistik.....	40
4. Ergebnisse.....	41
4.1. Expression der NO-GC-Untereinheiten im Colon.....	41
4.2. Motilitätsmessungen.....	41
4.2.1. Myographiestudien an proximalem Colon.....	41
4.2.1.1. Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht in WT- und GCKO-Colon.....	41
4.2.1.2. Kontraktionsmuster der zirkulären Muskelschicht von zellspezifischen Knockout-Mäusen.....	50
4.2.1.3. Detaillierte Analyse der mittleren Kontraktionen.....	53
4.2.1.4. Detaillierte Analyse der großen Kontraktionen.....	55
4.2.1.5. Pharmakologische Aktivierung der NO-GC und deren Effekte auf den Muskeltonus.....	55
4.2.2. Analyse der Colonmotilität mithilfe von Kontraktionsmusterkarten.....	58
4.2.2.1. Charakteristika der Kontraktionsmusterkarten unter Kontrollbedingungen.....	58
4.2.2.2. Einfluss von L-NAME auf 'long distance contractions'.....	61
4.2.2.3. Durchmesseranalyse.....	65
4.2.2.4. Effekt von TTX und Hexamethonium auf LDC.....	69
4.3. Mukosale Veränderungen im Colon von SMC-GCKO.....	72
4.3.1. Makroskopische Analyse der Mukosa.....	72
4.3.2. Histologische Analyse der Mukosa.....	75

4.3.3. Genanalyse der Mukosafalten von WT und SMC-GCKO.....	78
4.3.4. Expression von Gremlin.....	81
5. Diskussion.....	85
5.1. Verteilung der NO-GC Expression im Colon.....	85
5.2. Beteiligung der NO-GC an der Regulation der gastrointestinalen Motilität.....	86
5.2.1. Kontraktionsanalyse anhand der Myographiestudien.....	88
5.2.2. Kontraktionsanalyse anhand der Kontraktionsmusterkarten.....	92
5.2.3. Schlussfolgerung – NO-GC-vermittelte Modulation der Colonmotilität.....	95
5.3. Potentielle Beteiligung der NO-GC an der Adenomentwicklung.....	96
6. Zusammenfassung.....	99
7. Summary.....	100
8. Literaturverzeichnis.....	102
9. Eigene Publikationen.....	117
10. Danksagung.....	119

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die NO/cGMP-Signalkaskade.....	2
Abbildung 2	Histologischer Aufbau des Darms.....	9
Abbildung 3	Kontraktionsmechanismen der glatten Muskulatur.....	12
Abbildung 4	Colonkrypte - Regulationsmechanismen der Zellerneuerung.....	18
Abbildung 5	Generierung der Knockout-Mausmodelle.....	32
Abbildung 6	Versuchsaufbau zur Messungen der ‚whole colon‘-Motilität.....	35
Abbildung 7	Expression der NO-GC β_1 -Untereinheiten in proximalen Colon.....	42
Abbildung 8	Verteilung der NO-GC α -Untereinheiten in proximalem Colon.....	43
Abbildung 9	Kontraktionsmuster von WT- und GCKO-Colonringen.....	44
Abbildung 10	Detaillierte Analyse der Ripples.....	47
Abbildung 11	Effekt von L-NAME auf spontane Kontraktionen	49
Abbildung 12	Evaluation von SMC-GCKO-Colon.....	51
Abbildung 13	Evaluation von ICC-GCKO-Colon.....	52
Abbildung 14	Kontraktionsmuster von SMC/ICC-GCKO- und GCKO-Colon.....	54
Abbildung 15	Effekt des NO-Donors DEA-NO auf die zirkuläre Muskelschicht.....	56
Abbildung 16	Effekt von ODQ auf den Muskeltonus.....	57
Abbildung 17	Kontraktionsmusterkarten von WT- und GCKO-Colon.....	59
Abbildung 18	Frequenz- und Effektivitätsanalyse der LDC	60
Abbildung 19	Kontraktionsmusterkarten von SMC-GCKO und ICC-GCKO Colon.....	62
Abbildung 20	Effekt von L-NAME auf LDC in WT- und GCKO-Colon.....	63
Abbildung 21	Effekt von L-NAME auf LDC in SMC-GCKO- und ICC-GCKO-Colon.....	64
Abbildung 22	Durchmesseranalyse der Kontraktionsmusterkarten von WT und GCKO.....	66
Abbildung 23	Durchmesseranalyse der Kontraktionsmusterkarten von SMC-GCKO und ICC-GCKO-Colon.....	67
Abbildung 24	Statistische Analyse des Durchmessers.....	70
Abbildung 25	Effekt von TTX und Hexamethonium auf LDC.....	71
Abbildung 26	Mukosale Entartungen in Colon von SMC-GCKO-Mäusen.....	73
Abbildung 27	Statistische Analyse der mukosalen Entartungen.....	74
Abbildung 28	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Colon-Querschnitten von Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren.....	76
Abbildung 29	Proliferationsanalyse der Mukosa	77
Abbildung 30	Cre-Aktivität unter dem SMMHC-Promotor	79
Abbildung 31	mRNA-Expressionsanalyse	80
Abbildung 32	Gremlin1-Expression in Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren	82
Abbildung 33	In-situ-Hybridisierung gegen Gremlin1 von WT- und SMC-GCKO-Colon	84
Abbildung 34	Spontane Kontraktionen in zirkulärer und longitudinaler Muskelschicht	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Dauer und Frequenz der Ripples.....	46
Tabelle 2	Dauer und Frequenz der mittleren Kontraktionen.....	46
Tabelle 3	Dauer und Frequenz der großen Kontraktionen.....	46
Tabelle 4	Effekt von L-NAME auf mittlere Kontraktionen in WT und GCKO.....	48
Tabelle 5	Effekt von L-NAME auf großen Kontraktionen in WT und GCKO.....	48
Tabelle 6	Vergleich der Kontraktionstypen von longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht	91

Abkürzungsverzeichnis

AMP	=	Adenosinmonophosphat
ANO1	=	Anoctamin 1
APC	=	adenomatous polyposis coli
BK _{Ca} -Kanal	=	Calcium-aktivierter Kaliumkanal
BMP	=	bone morphogenic protein
cAMP	=	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	=	zyklisches Guanosinmonophosphat
cKit	=	Tyrosinkinase-Rezeptor Kit
CMMC	=	colonic migrating motor complex
CNG	=	cGMP-aktivierter Ionenkanal
CreERT2	=	Cre-Recombinase mit einer modifizierten Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne
DAG	=	Diacylglycerol
Dsh	=	Dishevelled
EDRF	=	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	=	endotheliale NO-Synthase
ENS	=	enterisches Nervensystem
FLC	=	Fibroblasten-ähnliche Zellen
GMP	=	Guanosinmonophosphat
GCKO	=	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase Knockout
GSEA	=	gene set enrichment analysis
ICC	=	interstitielle Zellen von Cajal
ICC-DMP	=	ICC des deep muscular plexus
ICC-IM	=	intramuskuläre ICC
ICC-MY	=	ICC des myenterischen Plexus
ICC-SMP	=	ICC des submukosalen Plexus
ICC-SS	=	serosale ICC
IJP	=	inhibitory junction potential
iNOS	=	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	=	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K-H-Lösung	=	Krebs-Henseleit-Lösung
LDC	=	long distance contractions
MLC	=	Myosin-Leichtkette II
MLCK	=	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	=	MLC-Phosphatase
nNOS	=	neuronale NO-Synthase
NO	=	Stickstoffmonoxid
NO-GC	=	NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase
NOS	=	NO-Synthase
ODQ	=	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1one
PDE	=	Phosphodiesterase
PDGFR α	=	platelet-derived growth factor receptor α
PIP ₂	=	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKG	=	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	=	Phospholipase C
ROK	=	Rho-Kinase
sGC	=	löslichen Guanylyl-Cyclase
SK3	=	Ca ²⁺ -aktivierten K ⁺ -Kanälen mit geringer Leitfähigkeit
SMC	=	glatte Muskelzellen
STD	=	spontaneous transient depolarisation
STIC	=	spontaneous transient inward currents
TxA ₂	=	Thromboxan A ₂

1. Einleitung

1.1. Die NO/cGMP-Signalkaskade

Der NO/cGMP-Signalweg ist in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert (Abbildung 1). Hierbei fungiert Stickstoffmonoxid (NO) als zentraler Botenstoff, der eine Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC) bedingt. Bereits 1980 wurde ein vom Endothel sezernierter Faktor beschrieben (endothelium-derived relaxing factor; EDRF), der zur Relaxation der glatten Muskulatur des Gefäßsystems führt (Furchgott & Zawadzki, 1980). In den darauffolgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem relaxierenden Faktor EDRF um das Radikal NO handelt (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Die Aktivierung der NO-GC durch NO resultiert in der Bildung des sekundären Botenstoffs zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieser vermittelt neben den relaxierenden Effekten auf die Gefäße des kardiovaskulären Systems (Diamond, 1978; Schultz, 1978; Groneberg *et al.*, 2010) unter anderem auch die Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion (Böhme *et al.*, 1974; Haslam *et al.*, 1978; Mellion *et al.*, 1981; Walter & Gambaryan, 2004). Auch neuronal übernimmt die Signalkaskade bei der synaptischen Transmission (Shibuki & Okada, 1991; Garthwaite, 2008) sowie bei der synaptischen Plastizität eine wichtige Funktion (Haley *et al.*, 1992). Im Gastrointestinaltrakt zählt die NO/cGMP-Signalkaskade zu den wichtigen Regulatoren der gastrointestinalen Motilität. Ähnlich wie im vaskulären System vermittelt sie hier eine Relaxation der glatten Muskulatur und ist damit essentiell für das Gleichgewicht zwischen Kontraktion und Relaxation (Bult *et al.*, 1990; Moncada *et al.*, 1991; Murthy, 2006). Jedoch ist die Regulation wesentlich komplexer als in Blutgefäßen, da neben den Zellen der glatten Muskulatur auch weitere Zelltypen in die NO-vermittelten Regulationsmechanismen involviert sind. Dieses fein regulierte Zusammenspiel von Kontraktion und Relaxation ermöglicht den gerichteten Transport des Nahrungsbreis entlang des Gastrointestinaltrakts und bildet somit einen Basismechanismus des Lebens. Neben dem regulatorischen Einfluss auf die Motilität vermittelt NO auch physiologische Funktionen in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts. Dazu zählen die Regulation des mukosalen Blutstroms sowie die Erhaltung der mukosalen Integrität und Permeabilität.

1.1.1. Bildung von NO und dessen physiologische Aufgaben

NO ist das bislang kleinste bekannte Signalmolekül. Es wird durch die Familie der NO-Synthasen (NOS) enzymatisch synthetisiert. Von dieser Enzymfamilie sind in

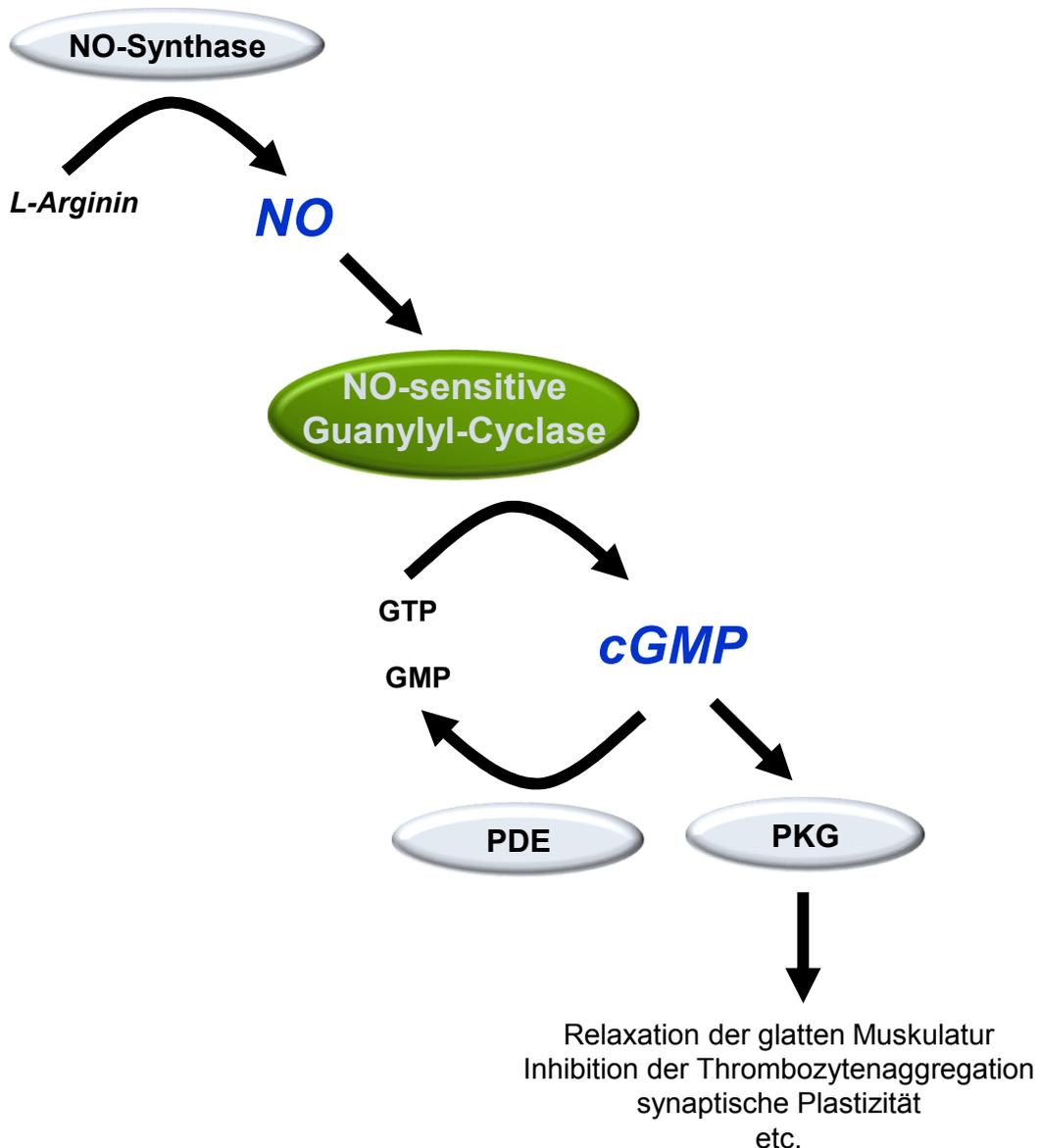


Abbildung 1: Die NO/cGMP-Signalkaskade

NO wird von NO-Synthasen aus L-Arginin synthetisiert. Als gasförmiger Transmitter diffundiert NO in benachbarten Zellen und aktiviert dort die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase. Die Aktivierung führt zur Bildung des second messengers cGMP aus GTP. Dieser wiederum aktiviert einerseits Phosphodiesterasen (PDE), welche zum Abbau von cGMP führen, andererseits die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), welche unter anderem die Relaxation der glatten Muskulatur, die Inhibition der Thrombozytenaggregation sowie die synaptische Plastizität vermittelt.

Säugetieren drei verschiedene Isoformen bekannt (Förstermann *et al.*, 1994): Die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) sowie die induzierbare NOS (iNOS). Die nNOS wird vor allem in Neuronen des Gehirns aber auch der Peripherie exprimiert. Im zentralen Nervensystem ist sie unter anderem in die hippokampale Langzeitpotenzierung involviert (Burette *et al.*, 2002). Neben Neuronen konnte die nNOS auch in Zellen der glatten Muskulatur, in Epithelzellen verschiedener Organe sowie in der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden (Nakane *et al.*, 1993; Förstermann *et al.*, 1994). Die eNOS dagegen wird vor allem in Endothelzellen und Kardiomyozyten (Balligand *et al.*, 1995), aber auch in Neuronen (Kantor *et al.*, 1996) exprimiert. Sie spielt besonders bei der Tonusregulation der glatten Muskulatur eine wichtige Rolle. Des Weiteren ist sie bei der Regulation der Angiogenese (Han & Stewart, 2006), Apoptose (Dimmeler & Zeiher, 1999) sowie der Leukozytenadhäsion beteiligt (Kubes, 1992). Sowohl die nNOS als auch die eNOS werden konstitutiv exprimiert und synthetisieren Ca^{2+} -abhängig geringe Konzentrationen an NO (Marletta, 1994). Im Gegensatz dazu wird die iNOS nur akut exprimiert. Dies erfolgt vor allem in Makrophagen. In diesen Zellen führt eine Exposition mit bakteriellen Liposacchariden und Zytokinen zur Freisetzung von hohen Mengen an NO. Folglich spielt die iNOS vor allem bei der unspezifischen Immunabwehr eine wichtige Rolle (Nathan & Hibbs, 1991; Stuehr *et al.*, 1991).

Alle drei Isoformen sind Homodimere und nutzen L-Arginin als Ausgangsstoff für die Bildung des NO-Radikals. Bei der enzymatischen Reaktion am aktiven Zentrum, welches das Häm-Molekül bildet, entstehen aus L-Arginin und Sauerstoff L-Citrullin und NO. Das auf diese Weise gebildete NO-Radikal diffundiert auf Grund seiner geringen Größe, elektrischen Neutralität und der Lipophilie sehr leicht durch die Zellmembran. Bedingt durch seine kurze Halbwertszeit vermittelt es vor allem akute Effekte und ermöglicht schnelle Modulationen. Eine Vielzahl physiologischer Prozesse werden auf diese Weise reguliert: Im Gefäßsystem ist NO bei der Regulation des Blutdrucks beteiligt, indem es die Relaxation der glatten Muskulatur vermittelt. Analog erfolgt sowohl die Regulation der Durchblutung der Skelettmuskulatur (McAllister *et al.*, 1995; Schuschke *et al.*, 1995; Reid, 1998) als auch die Erektion des Penis (Hedlund *et al.*, 2000; Groneberg *et al.*, 2013). Des Weiteren inhibiert NO nach Diffusion in das Lumen der Blutgefäße die Thrombozytenaggregation und -adhäsion (Moncada & Higgs, 1995). Neben den Effekten in der Peripherie ist NO ein wichtiger synaptischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Dort spielt er vor allem bei der Langzeitpotenzierung eine wichtige Rolle (Haley *et al.*, 1992).

1.1.2. NO-sensitive Guanylyl-Cyclase

Einen großen Teil der oben genannten NO-vermittelten physiologischen Effekte werden über den wichtigsten Rezeptor von NO, der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC), vermittelt. Die NO-GC gehört zur Familie der Guanylyl-Cyclasen (GC), die die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches GMP (cGMP) katalysiert. Die Familie lässt sich in zwei Gruppen unterteilen: Die NO-sensitive Form, welche durch die Bindung von NO aktiviert wird (Schultz & Schultz, 1977; Böhme *et al.*, 1978; Murad *et al.*, 1978), sowie die Peptid-aktivierte Form der GC (pGC), welche durch natriuretische Peptide, Guanylin und Uroguanylin stimuliert wird (Waldman *et al.*, 1984; Winkvist *et al.*, 1984). Die Untergruppe der pGC beinhaltet sieben verschiedene Enzyme (GC-A bis GC-G), die alle membranständig vorliegen. Im Gegensatz dazu wurde die NO-GC jahrelang als lösliche Guanylyl-Cyclase (soluble guanylyl cyclase; sGC) bezeichnet. Russwurm *et al.* (2001) konnten jedoch zeigen, dass diese ebenfalls membrangebunden vorliegen kann, weshalb diese Bezeichnung nicht mehr zur Unterscheidung herangezogen werden sollte.

Die NO-GC ist ein Heterodimer, das sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzt. Während zwei Isoformen der α -Untereinheit (α_1 und α_2) bekannt sind, existiert lediglich eine Isoform der β -Untereinheit (β_1). Demzufolge können die zwei Heterodimere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ gebildet werden (Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1988; Koesling *et al.*, 2016), während die Homodimere nicht enzymatisch aktiv sind. Die beiden Isoformen gleichen sich in der enzymatischen Aktivität. Des Weiteren weisen sie nur eine sehr geringe Sequenzhomologie in der N-terminalen Region auf und kommen in unterschiedlichen Regionen vor: Während das Heterodimer $\alpha_1\beta_1$ ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression des $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer dagegen auf bestimmte Bereiche konzentriert. So konnte das Heterodimer zu einem großen Anteil im Gehirn nachgewiesen werden, wo es in gleichen Anteilen wie das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer vorkommt. Hier sind beide Heterodimere in die synaptische Transmission involviert (Burette *et al.*, 2002; Mergia *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2017).

Auf struktureller Ebene kann das Enzym in drei Bereiche eingeteilt werden: Die C-terminale Domäne, die das katalytische Zentrum bildet, den zentralen Teil, der unter anderem an der Dimerisierung der Untereinheiten beteiligt ist, sowie die regulatorische N-terminale Domäne. Letztere bindet die prosthetische Häm-Gruppe, welche essentiell für die Aktivierung des Enzyms ist (Friebe & Koesling, 2003). Durch die direkte Bindung von NO an das Häm-Molekül in Anwesenheit des Kofaktors Mg^{2+} entsteht ein NO-Fe²⁺-His-Komplex, der durch den Aufbruch der Histidin-Eisen-Bindung zu einer Konformationsänderung und damit zur Aktivierung des Enzyms führt (Ignarro, 1990;

Friebe & Koesling, 2003). Das Häm-Molekül kann neben NO auch von CO aktiviert werden, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß (Gerzer *et al.*, 1981).

Durch die zentrale Rolle der NO-GC im NO-Signalweg bildet das Enzym einen potentiellen Angriffspunkt für Pharmaka, sodass über die Jahre eine Vielzahl von Inhibitoren und Aktivatoren entwickelt wurden. Ein effektiver Inhibitor der NO-GC bildet 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1one (ODQ). Diese Substanz bindet die Häm-Gruppe kompetitiv zu NO und verhindert auf diese Weise die Generierung von cGMP (Schrammel *et al.*, 1996). Zu beachten ist, dass in Zellen die ODQ-vermittelte Inhibition ab einer gewissen NO-Konzentration nicht mehr reversibel ist (Lies *et al.*, 2013). Substanzen, die die NO-Produktion steigern, können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Die Häm-abhängigen Stimulatoren und Häm-unabhängigen Aktivatoren (Evgenov *et al.*, 2006). Zu den Stimulatoren zählen unter anderem die Substanzen YC-1 (Friebe & Koesling, 1998), Riociguat (Mittendorf *et al.*, 2009) oder Bay 41-2272 (Stasch *et al.*, 2001). Diese Substanzen stimulieren die NO-GC direkt und führen zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber NO, wodurch eine Aktivierung der NO-GC durch geringe Mengen an NO ermöglicht wird. Dies geschieht vor allem über die Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes und den damit einhergehenden Übergang des Enzyms in einen hocheffektiven Aktivierungsstatus (Russwurm *et al.*, 2002; Russwurm & Koesling, 2004; Evgenov *et al.*, 2006). Die Gruppe der NO-GC-Aktivatoren beinhalten unter anderem die Substanzen BAY 60-2770, Ataciguat (Schindler *et al.*, 2006) und Cinaciguat/BAY 58-2667 (Stasch *et al.*, 2002). Diese Substanzen konkurrieren mit dem Häm-Gruppe um die Häm-Bindestelle der NO-GC und aktivieren somit die NO-GC Häm-unabhängig (Schmidt *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005). Sowohl die NO-GC-Stimulatoren als auch die -Aktivatoren zeigen eine signifikante Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie eine gesteigerte Vasodilatation (Stasch *et al.*, 2002). In der therapeutischen Anwendung wurde deren positive Wirkung bei zahlreichen Krankheiten wie pulmonaler Hypertension und akuter Herzschwäche berichtet (Stasch *et al.*, 2011). Des Weiteren wird gegenwärtig der potentielle Einsatz der NO-GC-Aktivatoren und -Stimulatoren zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen wie zum Beispiel Lungenfibrose evaluiert (Sandner & Stasch, 2017).

1.1.3. cGMP und dessen Effektoren

Die Aktivierung der NO-GC führt zur Bildung des sekundären Botenstoffs cGMP. Dieser wurde erstmalig 1963 in Rattenurin nachgewiesen (Ashman *et al.*, 1963). Als sekundärer Botenstoff führt er zur Aktivierung weiterer Effektormoleküle, die wiederum viele physiologische Prozesse vermitteln. Die Effektormoleküle umfassen die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), cGMP-aktivierte Ionenkanäle sowie

cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDE; Bender & Beavo, 2006), welche im Folgenden näher betrachtet werden.

1.1.3.1. cGMP-abhängige Proteinkinase

Die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) gehört zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Sie ist ein Homodimer und lässt sich in eine N-terminale, eine regulatorische und eine katalytische Domäne unterteilen. Die regulatorische Domäne enthält zwei cGMP-Bindestellen, die allosterisch miteinander interagieren und cGMP mit unterschiedlicher Affinität binden. Die Bindung von cGMP führt zu einer Konformationsänderung und damit zur Aktivierung des Enzyms (Landgraf *et al.*, 1990). Nach Aktivierung ermöglichen die MgATP- und die Peptid-Bindetasse der katalytischen Domäne die Übertragung eines Phosphatrestes auf eine Vielzahl von Zielproteinen.

In Säugetieren sind zwei Gene bekannt, die für die zytosolisch vorliegende PKGI (Wernet *et al.*, 1989) und die membranständige PKGII (Jarchau *et al.*, 1994) kodieren. Die PKGI wird vor allem in der glatten Muskulatur und in Thrombozyten exprimiert (Keilbach *et al.*, 1992). Im kardiovaskulären System spielt sie durch den relaxierenden Effekt auf die Gefäße eine wichtige Rolle bei der Reduktion des Blutdrucks (Lincoln & Cornwell, 1993; Pfeifer *et al.*, 1998). In Thrombozyten führt ein erhöhtes cGMP-Level zur Inhibition der Aggregation und wirkt so einer Plaque-Entwicklung in den Gefäßen entgegen (Massberg *et al.*, 1999). Es sind zwei Isoformen (PKGI α und PKGI β) bekannt, bei denen es sich um Spleißvarianten handelt (Lincoln *et al.*, 1988), die sich lediglich in den letzten 100 Aminosäuren der N-terminalen Sequenz unterscheiden (Francis *et al.*, 1988).

Die Expression der PKGII wurde bislang in verschiedenen Gehirnstrukturen, der intestinalen Mukosa, Niere, Chondrozyten und der Lunge nachgewiesen (Lohmann *et al.*, 1997). Die PKGII übernimmt wichtige Funktionen bei Sekretionsprozessen, beim Knochenwachstum und im zirkadianen Rhythmus. Ein weiteres Target ist unter anderem der cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), dessen Aktivierung zu einer verstärkten Cl⁻- und Wassersekretion führt. Damit ist PKGII an intestinalen Sekretionsprozessen von Salzen und Flüssigkeit beteiligt (Vaandrager *et al.*, 1998).

1.1.3.2. cGMP-aktivierte Ionenkanäle

Eine weitere Gruppe von Effektorproteinen sind die cGMP-aktivierten Ionenkanäle (cyclic nucleotide-gated channels; CNG-Kanäle). Diese wurden ursprünglich in den Photorezeptoren der Retina, den Stäbchen, entdeckt (Fesenko *et al.*, 1985). Dort sind sie ein wichtiger Bestandteil der Phototransduktion: Durch die Bindung von intrazellulärem cGMP werden diese Kanäle aktiviert und erleichtern damit den Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺ in die Zelle (Yau & Baylor, 1989; Biel *et al.*, 1999). Neben der

elementaren Beteiligung bei der Phototransduktion spielen CNG-Kanäle außerdem eine wichtige Rolle beim Riechprozess in olfaktorischen Neuronen. Des Weiteren konnten sie in Gehirn, Darmepithel, Herz, Niere sowie Hoden nachgewiesen werden (Biel *et al.*, 1994; Distler *et al.*, 1994). In den letzteren drei Organen sind die CNG-Kanäle vermutlich an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt (Biel *et al.*, 1994).

1.1.3.3. cGMP-regulierte Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) katalysieren den Abbau der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP. Der Abbau der Nukleotide erfolgt durch die selektive Hydrolyse der 3'-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe. Dabei entstehen wiederum die Nukleotide AMP und GMP. PDEs sind somit essentiell für die Regulation der cGMP-Konzentration in der Zelle und modulieren folglich die Dauer und Intensität des NO/cGMP-vermittelten Signals. Derzeit sind 11 PDEs bekannt, die sich basierend auf deren Substratspezifität in drei Gruppen unterteilen lassen: cAMP-spezifische PDEs (PDE4, PDE7, PDE8), cGMP-spezifische PDEs (PDE5, PDE6, PDE9) und PDEs mit gemischter Spezifität für cAMP und cGMP (PDE1-PDE3, PDE10, PDE11; Francis *et al.*, 2001; Bender & Beavo, 2006). Am Abbau von cGMP ist vor allem die PDE5 maßgeblich beteiligt. Bislang ist nur ein PDE5-Gen bekannt, das jedoch für drei verschiedene Spleißvarianten codiert (PDE5A1, PDE5A2 und PDE5A3; Lin *et al.*, 2000). Die PDE5 wird in verschiedenen Geweben wie Herz, Gastrointestinaltrakt, Thrombozyten und Lunge exprimiert (Loughney *et al.*, 1998; Stacey *et al.*, 1998; Yanaka *et al.*, 1998; Corbin *et al.*, 2000). Die enzymatische Eigenschaft der PDE5 ist durch eine hoch affine cGMP-Bindestelle mit hoher cGMP-Spezifität charakterisiert. Lange Zeit war wenig über die PDE5-Familie bekannt, bis deren Potential als Zielmolekül zur Regulation des Glattmuskeltonus erkannt wurde. Therapeutischen Erfolg hatten bislang die selektiven Inhibitoren Sildenafil und seine Analoga Vardenafil und Tadalafil. Sildenafil wird unter den Handelsnamen Viagra® und Revatio® vor allem zur Behandlung von erektiler Dysfunktion (Boolell *et al.*, 1996a; Boolell *et al.*, 1996b; Burnett, 2005) bzw. zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie (Ghofrani *et al.*, 2002) eingesetzt. Durch Inhibition der PDE5 wird hier die intrazelluläre cGMP-Konzentration erhöht und somit die Vasodilatation verstärkt, was zu einem erhöhten Bluteinstrom in die Gefäße und folglich zur Erektion des Penis führt.

Des Weiteren hat cGMP einen regulatorischen Effekt auf cAMP-degradierende PDEs. So ist zum Beispiel die Hydrolyseaktivität der PDE1 und PDE3 durch die Bindung von cGMP herabgesetzt, wohingegen die Aktivität der PDE2 verstärkt wird (Zaccolo & Movsesian, 2007). Folglich kann auf eine gegenseitige Beeinflussung der cGMP- und cAMP-Signalwege geschlossen werden.

1.2. Gastrointestinaltrakt

Der Verdauungsapparat bildet das essentielle System für die Resorption von Nährstoffen. Er erstreckt sich von Mundhöhle bis zum Anus, wobei der Gastrointestinaltrakt mit Magen, Dünndarm, Dickdarm und Anus den größten Teil des Systems bildet. Jede Komponente erfüllt hierbei spezifische Aufgaben: Die Aufspaltung der Nahrung beginnt bereits in der Mundhöhle. Dort wird sie mechanisch zerkleinert und die Kohlenhydrataufspaltung durch die im Speichel enthaltene Amylase initiiert. Über die Speiseröhre wird der Speisebrei in den Magen transportiert, wo die Kohlenhydratverdauung fortgesetzt sowie die Protein- und Fettverdauung begonnen wird. Im Zwölffingerdarm erfolgt die Neutralisation der Magensäure durch Hydrogencarbonat aus dem Pankreas. Enzyme, die aus der Bauchspeicheldrüse ausgeschüttet werden, beenden den Aufschluss der Nahrung, was die Resorption der Nahrungsbestandteile in Jejunum und Ileum ermöglicht. Das im Chymus enthaltene Wasser sowie Elektrolyte werden vor allem im Dickdarm resorbiert. Letztlich werden die unverdaulichen Nahrungsbestandteile wieder ausgeschieden. Somit ist der Gastrointestinaltrakt neben der Niere eines der wichtigsten Ausscheidungsorgane des Körpers.

Die histologische Struktur des Gastrointestinaltrakts ist mit Ausnahme einiger lokaler Besonderheiten in allen Teilen identisch. Die Wandstruktur setzt sich (luminal beginnend) aus Tunica mucosa, Lamina propria, Lamina muscularis mucosae, Tunica submucosa, zirkulärer und longitudinaler Muskelschicht sowie Tunica serosa zusammen (Abbildung 2A). Im Gegensatz zum humanen Colon kann jeder Abschnitt des murinen Colons histologisch unterschieden werden: Der proximale Abschnitt weist charakteristische fischgrätenartige Mukosaauffaltungen auf, der mittlere Abschnitt zeigt eine glatte mukosale Struktur, wohingegen im distalen Teil längsorientierte Mukosaauffaltungen zu erkennen sind.

Betrachtet man den Aufbau des Gastrointestinaltrakts, können zwei große funktionale Untereinheiten definiert werden. Zum einen die Schicht der glatten Muskulatur, welche für die Motilität und damit die Fortbewegung des Darminhaltes verantwortlich ist. Zum anderen die Mukosa, in der die Resorptions- und Sekretionsprozesse stattfinden. Diese beiden funktionalen Einheiten sollen im Folgenden auf zellulärer und funktionaler Ebene detaillierter betrachtet werden.

1.2.1. Glatte Muskulatur und Motilität

Die Hauptaufgabe des Gastrointestinaltrakts ist die Resorption von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser. Dies geht zwangsläufig mit der Lagerung, Durchmischung,

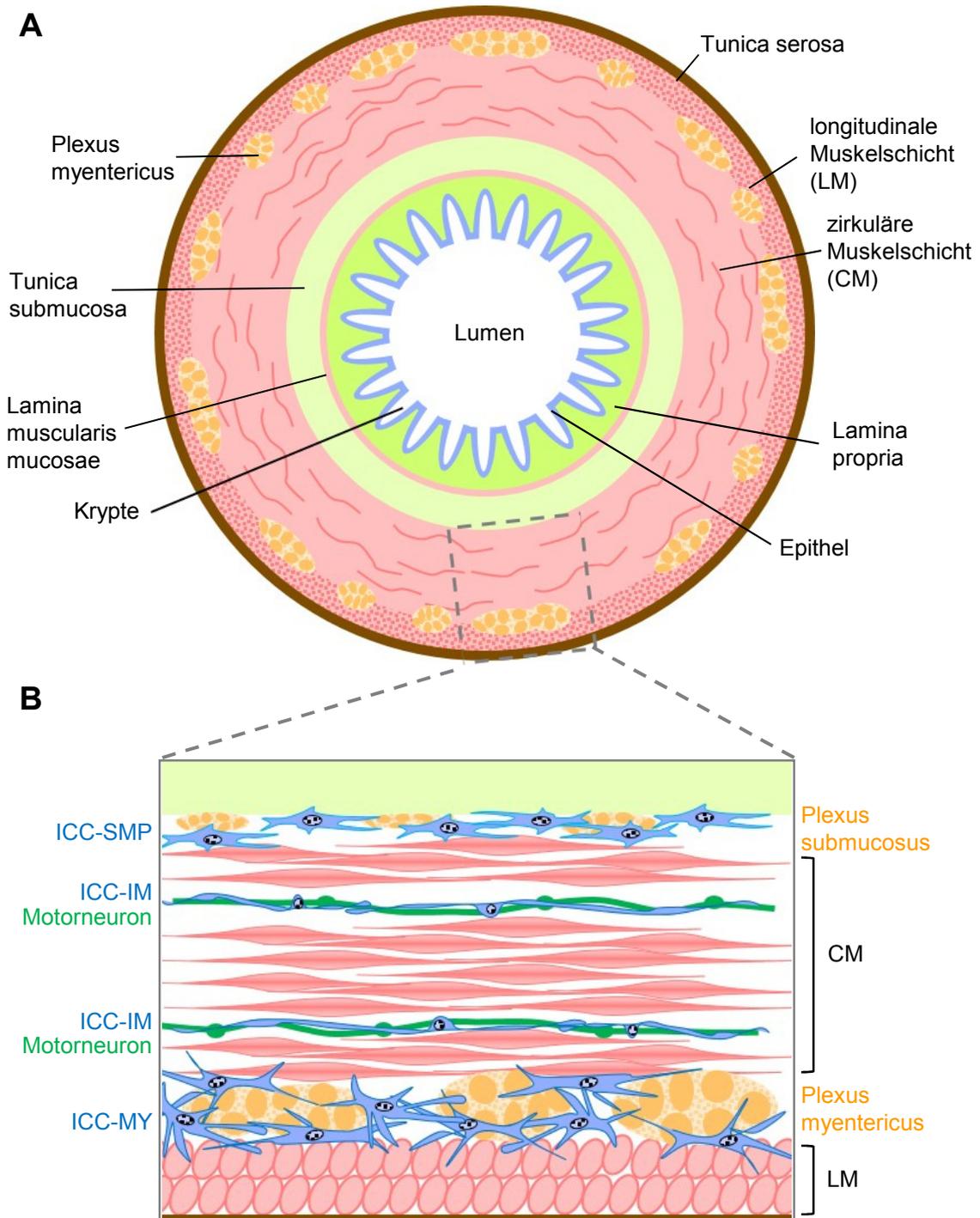


Abbildung 2: Histologischer Aufbau des Darms

(A) Histologischer Aufbau des Colons (Querschnitt). (B) Vergrößerte schematische Darstellung der glatten Muskelschicht mit enterischem Nervensystem.

ICC-SMP = ICC des submucosalen Plexus; ICC-IM = intramuskuläre ICC; ICC-MY = ICC des myenterischen Plexus; CM = zirkuläre Muskelschicht; LM = longitudinale Muskelschicht.

Kompression sowie der Ausscheidung des Fäzes einher, wofür ein zuverlässiger und koordinierter Transport des Darminhaltes notwendig ist. Dem liegt ein komplexer Motilitätsmechanismus zu Grunde, der primär durch das enterische Nervensystem (ENS) reguliert wird. Die Hauptkomponenten des ENS bilden der myenterische Plexus (Auerbach Plexus; zwischen longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht) sowie der Plexus submucosus (Meissner Plexus; zwischen zirkulärer Muskelschicht und Submukosa; Abbildung 2B). Generell ist die Kontraktilität unabhängig vom zentralen Nervensystem reguliert, kann jedoch durch sympathische und parasympathische Fasern moduliert werden (Takaki, 2003).

Mehrere Zelltypen sind in die Regulation der Kontraktilität eingebunden. Die glatten Muskelzellen bilden einen wesentlichen Bestandteil des Kontraktionsapparates. Neben den glatten Muskelzellen sind zudem die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) sowie Fibroblasten-ähnliche Zellen (FLC) an der Regulation der Motilität beteiligt. In allen drei Zelltypen wurde die Expression der NO-GC nachgewiesen (Iino *et al.*, 2008; Groneberg *et al.*, 2011), jedoch ist der detaillierte nitric oxide regulatorische Einfluss für die gastrointestinale Motilität noch unklar (Sivarao *et al.*, 2001; Goyal & Chaudhury, 2010). Im Folgenden sollen die einzelnen Zelltypen im Detail betrachtet werden.

1.2.1.1. Glatte Muskelzellen

Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells; SMC) kommen in den Wänden aller Hohlorgane wie Blutgefäße, Verdauungstrakt, Urogenitaltrakt sowie den Atemwegen vor. Im Gastrointestinaltrakt weisen die SMC eine spindelförmige Form auf, sind parallel in Bündeln angeordnet und über eine Vielzahl von gap junctions miteinander verbunden. Das daraus resultierende Synzytium ermöglicht die koordinierte Kontraktion im Verbund, weshalb sie zu den single-unit type SMC zählen.

Die Kontraktion der SMC wird vor allem durch den Botenstoff Acetylcholin vermittelt. Acetylcholin aktiviert die M₂- und M₃-Rezeptoren, welche zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten (Gq) Rezeptorfamilie gehören. Im ersten Schritt führt dies zur Aktivierung der Phospholipase C_β (PLC_β; Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004), die wiederum die Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) katalysiert (Abbildung 3). IP₃ aktiviert den IP₃-Rezeptor, was einen Ca²⁺-Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum zur Folge hat (Bootman *et al.*, 2002; Hisatsune *et al.*, 2005). Die ausgeschütteten Ca²⁺-Ionen bilden daraufhin mit Calmodulin einen Komplex, der die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) aktiviert und zu einer Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette II (MLC) führt (Somlyo & Somlyo, 2003). Auf diese Weise wird die Interaktion von Myosin mit den Aktinfilamenten ermöglicht, was letztendlich zu einer

Kontraktion führt (Webb, 2003). Neben den Ca^{2+} -abhängigen Kontraktionen kann die MLCK auch Ca^{2+} -unabhängig aktiviert werden (Klages *et al.*, 1999). Dieser Signalweg wird durch G-Proteine der $\text{G}_{12/13}$ -Familie vermittelt, welche unter anderem von Hormonen wie z.B. Thromboxan A_2 (TXA_2) aktiviert werden. Dies führt zur Stimulation der GTPase RhoA, die wiederum die Rho-Kinase (ROK) aktiviert (Somlyo & Somlyo, 2003). ROK phosphoryliert die MLC Phosphatase (MLCP), was in einer Inhibition des Enzyms resultiert. Das hat zur Folge, dass die Phosphorylierung der MLC aufrecht erhalten bleibt und somit die Ca^{2+} -abhängige Kontraktion erleichtert wird.

Die Relaxation der glatten Muskulatur wird vor allem durch die Botenstoffe cGMP und cAMP induziert. Eine erhöhte Konzentration von cAMP im Zytoplasma führt zur Aktivierung der PKA, welche ihrerseits die MLCK inhibiert. Auf diese Weise wird die Phosphorylierung der MLC und somit eine Kontraktion verhindert. Das durch die NO-GC gebildete cGMP dagegen kann eine Relaxation der glatten Muskulatur auf verschiedenen Wegen vermitteln. Hierbei spielt die PKGI eine zentrale Rolle: (1) Die PKGI aktiviert die MLCP. Hierdurch wird die Dephosphorylierung der MLC verstärkt und somit einer Kontraktion verhindert. (2) Die Spleißvariante PKGI_β inhibiert die IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER, indem sie die Phosphorylierung des Proteins IRAG (IP3-receptor associated cGMP-dependent kinase substrate) katalysiert (Schlossmann *et al.*, 2000). Der fehlende Ca^{2+} -Ausstrom verhindert folglich die Aktivierung der MLCK und somit eine Kontraktion. (3) Die Phosphorylierung des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals (BK_{Ca} -Kanal) bewirkt eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und hat damit einen erhöhten K^+ -Ausstrom zur Folge. Daraus resultiert eine Hyperpolarisation der Zelle, gefolgt von der Hemmung spannungsabhängiger L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom herabgesetzt und eine Relaxation induziert wird (Alioua *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 1999; Sausbier *et al.*, 2000).

1.2.1.2. Interstitielle Zellen von Cajal

Interstitielle Zellen von Cajal (ICC) wurden 1889 das erste Mal von dem spanischen Neuroanatomen Santiago Ramón y Cajal beschrieben (Cajal, 1889, 1893). Mithilfe von neuronenspezifischen histologischen Färbungen kam er zu der Schlussfolgerung, es handele sich bei diesen Zellen um Neurone des enterischen Nervensystems, welche die kontraktile Aktivität der benachbarten glatten Muskelzellen beeinflussen (Cajal, 1911). In den 1960er und 1970er Jahren ermöglichte die Elektronenmikroskopie die Widerlegung der Tatsache, dass es sich bei diesen Zellen um Neurone handelt. Die Identifizierung des Tyrosin-Kinase-Rezeptors Kit als spezifischer Marker für ICC

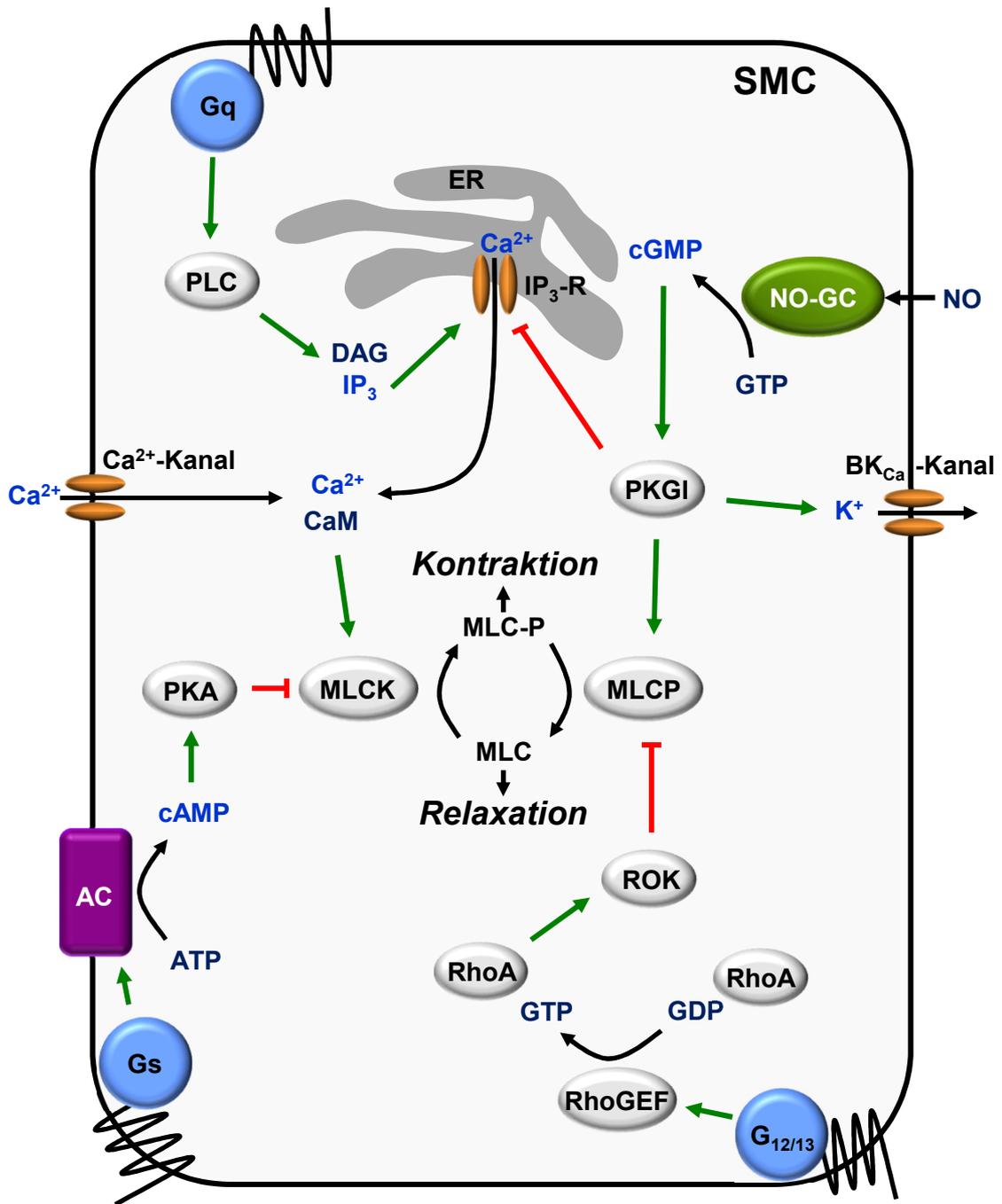


Abbildung 3: Kontraktionsmechanismen der glatten Muskulatur

Die Kontraktion der glatten Muskulatur wird durch die Interaktion von Myosin und Aktin hervorgerufen. Diese Interaktion erfordert die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC). Die Kontraktion kann entweder direkt durch eine Ca²⁺-abhängige Aktivierung der MLC-Kinase (MLCK) erfolgen oder indirekt Ca²⁺-unabhängige Inhibierung der MLC-Phosphatase (MLCP).

ermöglichte schließlich die detaillierte Analyse der Verteilung der ICC im Gastrointestinaltrakt (Ward *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1995; Torihashi *et al.*, 1995). Mittels immunohistochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen cKit konnten die ICC näher charakterisiert werden und erlaubten somit eine Einteilung der ICC anhand ihrer anatomischen Lokalisation und Form in unterschiedliche Subtypen (siehe Abbildung 2B). Neben der deskriptiven Unterteilung erfüllen die Subtypen unterschiedliche Aufgaben: ICC, welche den myenterischen Plexus in einer netzartigen Struktur umgeben (ICC-MY; Iino *et al.*, 2011), sind multipolar und formen eine Vielzahl von Fortsätzen. Gap junctions zwischen den Zellen ermöglichen eine widerstandsarme elektrische Kommunikation (Daniel *et al.*, 1998; Horiguchi & Komuro, 1998). Diesen Zellen wird eine wichtige Schrittmacheraktivität des Gastrointestinaltrakts zugeschrieben (Ward *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1995; Torihashi *et al.*, 1995; Yoneda *et al.*, 2004). Magen und Colon weisen eine weitere Gruppe von ICC auf, die sich zwischen zirkulärer Muskelschicht und Submukosa befinden (ICC-SMP). Diese Zellen sind parallel zu den glatten Muskelzellen der zirkulären Muskelschicht ausgerichtet. Sie werden neben den ICC-MY als zweites Schrittmacherzentrum des Colons von Maus und Ratte angesehen (Pluja *et al.*, 2001; Yoneda *et al.*, 2004). Somit sind diese beiden ICC-Subpopulationen, beruhend auf ihren Eigenschaften als Schrittmacherzellen, die Hauptinitiatoren der spontanen Kontraktionen im Colon und stehen folglich im Mittelpunkt dieser Arbeit. Neben den beiden Schrittmacherzentren kommen ICC zudem in den glatten Muskelzellschichten (ICC-IM) vor. Diese Zellen weisen eine spindelartige Form auf und sind parallel zu den glatten Muskelzellen angeordnet. Sie sind über gap junctions untereinander verbunden und formen ein Netzwerk mit den sie umgebenden glatten Muskelzellen (Komuro, 1999; Horiguchi *et al.*, 2003). Ihre Hauptaufgabe wird vor allem mit der enterischen Neurotransmission in Verbindung gebracht (Taxi, 1969; Thuneberg, 1982; Burns *et al.*, 1996; Ward & Sanders, 2001). In manchen Regionen des Gastrointestinaltrakts wird ihnen ebenfalls eine Schrittmacherfunktion zugeschrieben (Hashitani *et al.*, 2005). Eine spezialisierte Untergruppe der ICC-IM findet sich spezifisch im Dünndarm, die eng mit dem ‚deep muscular plexus‘ assoziiert ist (ICC-DMP). Außerdem konnte im Bereich der Serosa eine weitere Subpopulation von ICC identifiziert werden (ICC-SS; Vanderwinden *et al.*, 2000). Die genaue Funktion dieser Zellen ist jedoch bislang unbekannt.

1.2.1.3. Fibroblasten-ähnliche Zellen

Neben den ICC wurde eine weitere Gruppe von interstitiellen Zellen identifiziert, die Fibroblasten-ähnlichen Zellen (FLC). Ähnlich wie ICC sind sie vor allem um den myenterischen Plexus sowie in der Tunica muscularis vorzufinden. In Letzterer verlaufen

sie parallel zu den SMC, mit denen sie gap junctions ausbilden (Horiguchi & Komuro, 2000). Zudem weisen sie enge Verbindungen zu Nervenzellen auf, was auf eine Beteiligung der Zellen bei der enterischen Neurotransmission schließen lässt (Burns *et al.*, 1996; Kurahashi *et al.*, 2011). Lange Zeit konnten FLC von den ICC nur mittels Elektronenmikroskopie unterschieden werden. Im Gegensatz zu diesen verfügen sie über ein gut ausgebildetes raues ER, besitzen aber keine Caveolae (Horiguchi & Komuro, 2000). Erst Iino *et al.* (2009) identifizierten den platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α) als charakteristischen Marker und damit Unterscheidungsmerkmal für FLC und ICC. Seitdem sind die Zellen auch als PDGFR α ⁺-Zellen in der Literatur zu finden (Sanders *et al.*, 2010; Kurahashi *et al.*, 2011). Der PDGFR α gehört wie cKit zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Immunhistochemische Analysen zeigten die Expression von P2Y(1)-Rezeptoren und Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen mit geringer Leitfähigkeit (small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels; SK3) in der Membran der FLC. Die SK3-Kanäle stehen vor allem in Zusammenhang mit der purinergen inhibitorischen Neurotransmission (Klemm & Lang, 2002; Vanderwinden *et al.*, 2002; Gallego *et al.*, 2006; Kurahashi *et al.*, 2011). Da die FLC eine starke NO-GC Expression zeigen, wird ebenfalls eine Beteiligung der FLC in der nitrogenen Signaltransduktion vermutet (Iino *et al.*, 2008; Groneberg *et al.*, 2011; Voussen *et al.*, 2017). Die genaue Funktion konnte bislang jedoch noch nicht bestimmt werden.

1.2.1.4. Zelluläre Regulation der Kontraktilität im Colon

Eine zuverlässige Darmmotilität ist essentiell für das Leben, da nur so die notwendige Resorption von Nährstoffen garantiert werden kann. Um dies zu gewährleisten, werden Kontraktionen generiert, welche sowohl myogenen als auch neurogenen Ursprungs sind. Zu den myogenen zählen die spontanen Kontraktionen, die von Schrittmacherzellen, den ICC, generiert werden. Als neurogen werden dagegen Kontraktionen (,long distance contractions'; LDC) des ,colonic migrating motor complex' (CMMC) bezeichnet. Diese beiden Formen von Kontraktionen sollen im Folgenden detailliert betrachtet werden.

1.2.1.4.1. Myogene spontane Kontraktionen

Wie bereits erwähnt bilden ICC-MY und ICC-SM im Colon die Schrittmacherzentren für spontane Kontraktionen (Thuneberg, 1982; Ward *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1995). Sie unterliegen oszillierenden Membranpotentialschwankungen, sogenannten ,slow waves', die passiv an die glatten Muskelzellen weitergeleitet werden. Der intrazelluläre Mechanismus zur Entstehung und Weiterleitung der slow waves ist jedoch immer noch nicht vollständig bekannt. Eine Hypothese besagt, dass die spontane Ausschüttung von

Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in ICC zur kurzzeitigen Aktivierung des Anoctamin 1 (ANO1) Kanals und damit zu ‚spontaneous transient inward currents‘ (STICs) führt. Dies verursacht eine kurzzeitige Depolarisation der Zelle (‚spontaneous transient depolarisation‘; STD; Takeda *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2014; Sanders *et al.*, 2014), die in einer Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen mündet und damit zu einem vermehrtem Ca^{2+} -Einstrom führt. Dies wiederum resultiert in einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum durch IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Kanäle. Der verstärkte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu der Generierung von slow waves. Diese pflanzen sich entlang des ICC-Netzwerkes fort und gelangen passiv in die benachbarten SMC, wo sie die Grundlage für die spontanen Kontraktionen bilden (Blair *et al.*, 2014). Eine Vielzahl von Studien lassen auf eine nitreg vermittelte Modulation der spontanen Kontraktionen schließen. So weisen die ICC eine hohe NO-GC Expression auf (Iino *et al.*, 2009; Groneberg *et al.*, 2011). Zudem zeigten Organbadstudien mit longitudinaler Muskelschicht von Mauscolon unter anderem die Interaktion der NO-GC in ICC mit der Schrittmacheraktivität (Lies *et al.*, 2015). Der genaue Mechanismus ist jedoch bislang noch nicht bekannt.

1.2.1.4.2. Neurogene propulsive Kontraktionen

Der ‚colonic migrating motor complex‘ (CMMC) bezeichnet große propulsive Kontraktionen des Colons und wurde für eine Vielzahl verschiedener Spezies beschrieben (Wood, 1973; Bywater *et al.*, 1989; Fida *et al.*, 1997). Auch in humanem Colon konnten CMMC sowohl *in vivo* (Hagger *et al.*, 2003) als auch *in vitro* (Spencer *et al.*, 2012) gemessen werden. In murinem Gewebe wurden die CMMC und deren physiologische Grundlagen im Laufe der letzten Jahrzehnte von mehreren Arbeitsgruppen analysiert (Bywater *et al.*, 1989; Lyster *et al.*, 1995; Dickson *et al.*, 2010; Spencer, 2013). Die Hauptfunktion dieser Kontraktionen besteht darin, den Darminhalt weiter zu befördern (Heredia *et al.*, 2009). CMMC werden definiert als lang andauernde Kontraktionskomplexe, die im Caecum bzw. im proximalen Teil des Colons generiert werden und sich mindestens über die Hälfte des Colons fortpflanzen (Bywater *et al.*, 1989). Aus diesem Grund können die Kontraktionen, die aus einem CMMC resultieren, auch als ‚long distance contractions‘ (LDC) bezeichnet werden (Chen *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den slow waves ist die Entstehung der CMMC vom ENS abhängig, da neuronale Inhibitoren wie Tetrodotoxin und Hexamethonium diese unterdrücken (Wood, 1973; Bywater *et al.*, 1989; Lyster *et al.*, 1995; Fida *et al.*, 1997). Der Entstehung der CMMC liegt ein komplexer Regulationsmechanismus zu Grunde, in den sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Neurone involviert sind. In der Maus entstehen sie alle zwei bis vier Minuten mit einer Dauer von 40-60 s. Generell können zwei

Hauptphasen innerhalb eines CMMC unterschieden werden: Initiativ sorgt eine inhibitorische Phase für eine Relaxation des Darmabschnitts, durch die die Richtung des LDC bestimmt wird. Dieser Relaxation folgt eine Kontraktionsphase, welche die Propulsion des Fäzes zur Folge hat. Auf elektrophysiologischer Ebene sind diese Phasen durch eine kurze Hyperpolarisation (‘inhibitory junction potentials‘; IJPs) charakterisiert. Dieser Hyperpolarisation folgt eine langsame Depolarisationsphase, welche zusätzlich von oszillierenden Aktionspotentialen überlagert wird (Bywater *et al.*, 1989; Spencer *et al.*, 2005; Heredia *et al.*, 2009; Dickson *et al.*, 2010). Der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom während der Depolarisationsphase bedingt letztlich die starke phasische Kontraktion (Bywater *et al.*, 1989; Spencer *et al.*, 1998a; Spencer *et al.*, 1998c). Die Depolarisation ist vermutlich eher Folge einer Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Acetylcholin oder Tachykinin als eine Aufhebung einer Inhibition (Brierley *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2005; Dickson *et al.*, 2010).

Die Hauptkomponente für die Generierung der CMMC stellt erwiesenermaßen das ENS im myenterischen Plexus dar. Zusätzlich zum ENS sind weitere regulatorische und modulierende Mediatoren wie NO oder Serotonin beteiligt. Der Neurotransmitter NO vermittelt vor allem die Inhibition der Kontraktilität zwischen den einzelnen CMMC, die eigentliche Ausprägung des CMMC (wie Amplitude und Dauer) ist jedoch nicht durch NO beeinflusst (Lyster *et al.*, 1995; Fida *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1998a). Die Frequenz ist dagegen nach Hemmung des nitrergen Signalweges erhöht. Des Weiteren scheint NO wichtig für die Weiterleitung der Kontraktion entlang des Colons zu sein. Besonders die initiale relaxierende Phase der CMMC scheint unter nitrerem Einfluss zu stehen (Blair *et al.*, 2012). Studien mit nNOS-Knockout-Mäusen lieferten bislang kontroverse Ergebnisse. Dickson *et al.* (2010) zeigten eine erhöhte Frequenz der CMMC in nNOS-Knockout-Mäusen und postulierten NO als Modulator der CMMC-Frequenz. Im Gegensatz dazu konnte Spencer (2013) keinen Unterschied zwischen Kontrollmäusen und nNOS-Knockout-Mäusen feststellen.

1.2.2. Mukosa und Zellerneuerung

Die Mukosa des Colons ist zur Vergrößerung der Oberfläche und der damit besseren Resorption von einer Vielzahl von Krypten durchsetzt. Das Epithel setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen (Abbildung 4). Den größten Anteil bilden die Colonozyten, die vor allem für die Resorption von Wasser verantwortlich sind. Daneben ist das Epithel reich an Becherzellen, deren Aufgabe die Produktion des schützenden Schleimteppichs (vor allem MUC2) ist. Des Weiteren sind vereinzelt enteroendokrine Zellen vorzufinden, die unter anderem Serotonin produzieren. Die Lebensdauer der Colonozyten beträgt etwa sechs Tage. Damit ist das Darmepithel das am stärksten

proliferierende selbst-erneuernde Gewebe in Wirbeltieren (Heath, 1996). In der Maus wird das Epithel alle drei Tage erneuert. Diese hohe Reproduktivität wird durch Stammzellen ermöglicht, welche sich im Kryptengrund befinden. Die direkten Nachkommen der Zellen verweilen ca. zwei Tage in der Kryptenbasis und teilen sich dort vier bis fünf Mal, bis sie sich in die jeweiligen Zelltypen differenzieren und luminal wandern. Wenn sie an der Epitheloberfläche angelangt sind, erliegen sie nach wenigen Tagen dem Zelltod und werden abgeschilfert (van der Flier & Clevers, 2009).

Der Prozess der Epithelhomöostase unterliegt einem sehr komplexen Regulationsmechanismus. So kann eine Störung des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose zu der Entstehung von Adenomen führen. Beim Menschen werden vier Arten von colorectalen Adenomen anhand von histologischen Merkmale unterschieden: Das tubuläre Adenom (ca. 60 % der Fälle), das villöse Adenom, das tubulovillöse Adenom (ca. 30 % der Fälle) sowie das serratierte Adenom (Bosman *et al.*, 2010). Durch schrittweise akkumulierende Mutationen können sich die Adenome zu Karzinome entwickeln (Fearon & Vogelstein, 1990). Die Entartung ist hierbei abhängig von der Größe und der Art des Adenoms, wobei villöse Adenome mit 60 % die höchste Entartungswahrscheinlichkeit aufweisen (Nusko *et al.*, 1997). Da das Colonkarzinom zu einer der häufigsten Krebserkrankungen zählt (Siegel *et al.*, 2017), ist die detaillierte Erforschung der Regulationsmechanismen der mukosalen Erneuerung von besonderem Interesse. Aus diesem Grund soll im Folgenden auf die bislang bekannten Regulationsmechanismen der mukosalen Erneuerung näher eingegangen werden.

1.2.2.1. Stammzellen und Stammzellnische

Die Identifikation von Stammzellen ist oft mit Schwierigkeiten verbunden, da es sich um undifferenzierte Zellen handelt. Dennoch konnten einige spezifische Marker für Stammzellen des Colons definiert werden. Der bislang am besten charakterisierte Marker ist Lgr5 (Barker *et al.*, 2007). Durch in vivo ‚lineage tracing‘ konnte die Fähigkeit der Lgr5⁺-Zellen zur Selbsterneuerung und Differenzierung nachgewiesen werden (Barker & Clevers, 2010). Neben Lgr5 wurden weitere Marker wie Olfm4 (van der Flier *et al.*, 2009), Lrig1 (Powell *et al.*, 2012), Sox9 (Ramalingam *et al.*, 2012) und EphB2 (Jung *et al.*, 2011) identifiziert. Die Stammzellen verweilen in der sogenannten Stammzellnische, welche hauptsächlich von mesenchymalen Zellen der Lamina propria, benachbarten Epithelzellen und sezernierten Wachstumsfaktoren gebildet wird (Yen & Wright, 2006). Dazu zählen eine Vielzahl an Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten, glatte

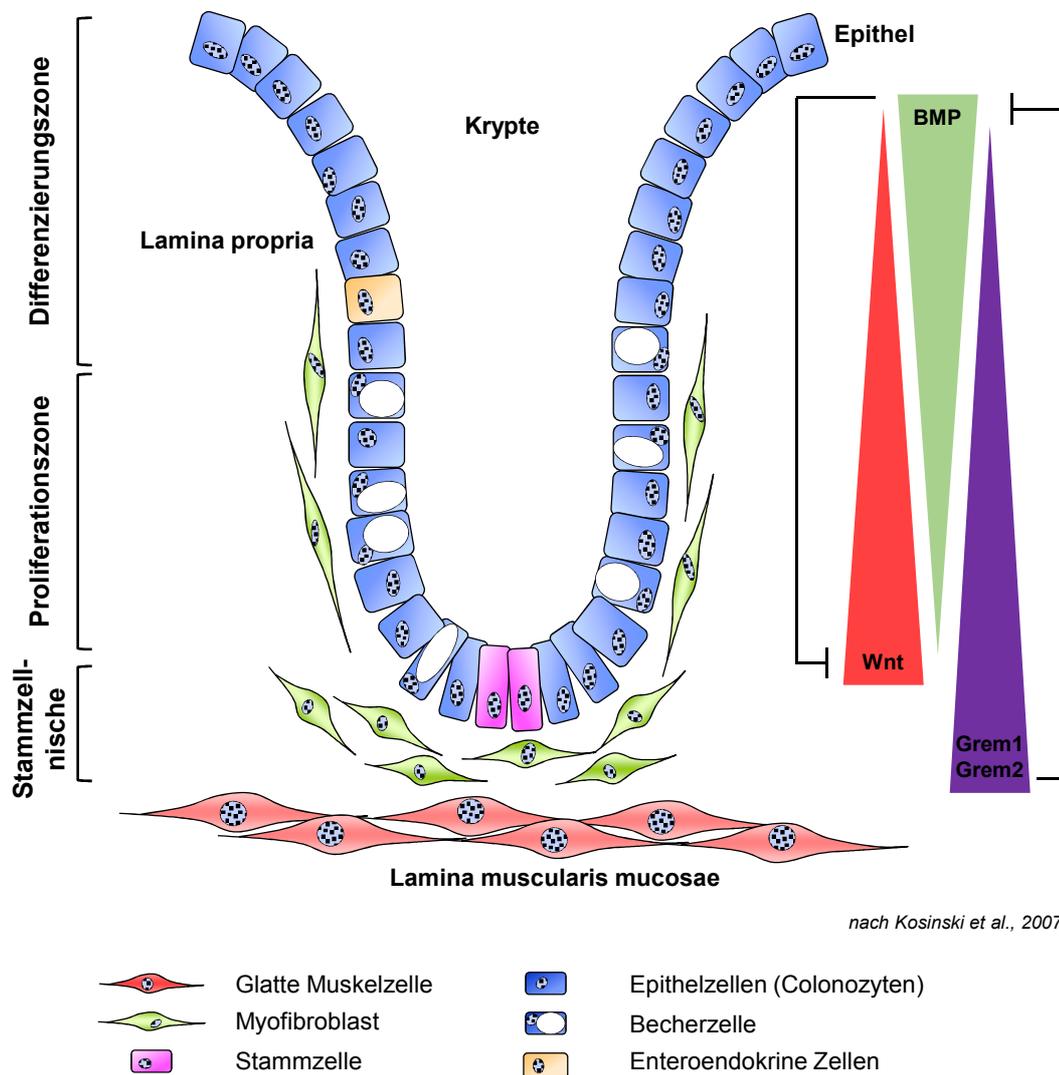


Abbildung 4: Colonkrypte - Regulationsmechanismen der Zellerneuerung

Das Epithel des Colons setzt sich aus Colonozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen zusammen. Das Epithel ist durch eine hohe Erneuerungsrate von drei Tagen charakterisiert, die durch das Vorhandensein von Stammzellen im Kryptengrund (der Stammzellnische) ermöglicht wird. Die Differenzierung der Zellen wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie Wnt, BMP und Gremlin kontrolliert.

Muskelzellen und Myofibroblasten. Die Myofibroblasten zeichnen sich durch ihre epitheliumsnahe Lokalisation aus und sind essentiell für die Regulation der epithelialen Zelldifferenzierung (Powell *et al.*, 1999).

Die Differenzierung der Zellen beziehungsweise die Erhaltung der Stammzellnische wird durch verschiedene Signalmoleküle reguliert, über die im Folgenden ein kurzer Abriss gegeben werden soll (siehe Abbildung 4).

1.2.2.2. Wnt

Der Wnt/ β -Catenin Signalweg ist grundlegend für die Regulation der Proliferation in der Colonkrypte (van der Flier & Clevers, 2009). Wnt gehört zu der Familie der sezernierten Glykoproteine und übernimmt vor allem eine Schlüsselfunktion bei der Zelldeterminierung und der Regulation der asymmetrischen Zellteilung. Dies begründet auch die verstärkte Expression von Wnt am Grund der Colonkrypte zur Erhaltung der Stammzellnische (siehe Abbildung 4; Powell *et al.*, 2011). In Abwesenheit von Wnt wird das intrazellulär vorliegende β -Catenin durch ständige Phosphorylierung abgebaut. Der Zerstörungsapparat besteht unter anderem aus dem Tumorsuppressorprotein ‚adenomatous polyposis coli‘ (APC). Die Bindung von Wnt an seinen Rezeptor aktiviert das Protein Dishevelled (Dsh), welches wiederum die Phosphorylierung und damit den Abbau von β -Catenin inhibiert und zu dessen Akkumulation in der Zelle führt (Kinzler & Vogelstein, 1996). Daraufhin bindet β -Catenin den Transkriptionsfaktor ‚T cell factor 4‘ (TCF4) und bedingt letztendlich die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen, welche vor allem für die Zellproliferation verantwortlich sind (Bienz & Clevers, 2000).

1.2.2.3. BMP

Die mesenchymal abstammenden ‚bone morphogenic proteins‘ (BMP) stellen die Hauptantagonisten des Wnt-Signalweges entlang der Krypte dar (Waite & Eng, 2003; Zhang & Li, 2005). Sie gehören zu der übergeordneten TGF β -Familie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Wie andere Mitglieder dieser Familie erfolgt die Signaltransduktion über die Aktivierung der SMAD-Proteine, welche als Dimer in den Zellkern gelangen und dort die Transkription spezifischer Zielgene aktivieren (Miyazono *et al.*, 2010). Der BMP-Signalweg bedingt vor allem die epitheliale Differenzierung und inhibiert die Ausbreitung der Stammzellen, weshalb der aktive Signalweg vor allem im oberen Bereich der Krypte aktiv ist (siehe Abbildung 4; Hardwick *et al.*, 2004; Sneddon *et al.*, 2006). In den Epithelzellen kann eine erhöhte Aktivität von phosphoryliertem SMAD 1, 5 und 8 nachgewiesen werden, was die Zellen vermutlich in ihrem differenzierten Zustand hält (Reynolds *et al.*, 2014). Die Differenzierung wird vor allem über die Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bedingt: Die BMP vermittelte

Stabilisierung des ‚phosphatase and tensin homolog‘ (PTEN) führt zu verminderter Aktivität der Serin-Threonin Kinase Akt, die normalerweise die Zellteilung fördert, die Apoptose inhibiert (Kaestner *et al.*, 1997) und zu einer verstärkten β -Catenin-Aktivität führt (He *et al.*, 2000; Zhang & Li, 2005).

Die Inhibierung des BMP-Signalweges bedingt im Mausmodell starke Beeinträchtigungen der Kryptenstruktur und ähnelt dem Phänotyp einer humanen juvenilen Polyposis. Die Mukosa dieser Mäuse zeichnet sich durch eine stark entartete Kryptenstruktur mit ektopischen Kryptenformationen, dilatierten Zysten, Entzündungsinfiltraten sowie anfänglichen Dysplasien aus (Haramis *et al.*, 2004).

1.2.2.4. Der BMP-Antagonist Gremlin

Eine weitere wichtige regulatorische Funktion nehmen BMP-Antagonisten ein, die im unteren Teil der Krypte sezerniert werden. Dort inhibieren sie den BMP-Signalweg, um den Stammzellcharakter der intestinalen Stammzellen zu erhalten. Die Inhibitoren Gremlin1, Gremlin2 und chordin-like1 werden von Myofibroblasten des Kryptengrundes sowie von den Zellen der Lamina muscularis mucosae sezerniert. Diese lokale Inhibierung des BMP-Signalweges führt zu einem Vorherrschen des Wnt-Signalweges und trägt damit zur Etablierung der Stammzellnische bei (Kosinski *et al.*, 2007). Zudem führt ein Verlust von Zellen der Lamina muscularis mucosae zu einer Dysregulation der epithelialen Homöostase (Kosinski *et al.*, 2007). Auch in humanen Studien mit Fokus auf intestinale Neoplasien konnte eine gesteigerte Gremlin-Expression festgestellt werden (Kosinski *et al.*, 2007; Jaeger *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2015), welche vor allem mit der Metastasierung assoziiert wird (Karagiannis *et al.*, 2013; Karagiannis *et al.*, 2015).

1.2.2.5. Die Rolle der NO-GC bei der Entwicklung von Adenomen

Wie bereits erwähnt kann eine Störung der Zellteilungsprozesse in der Mukosa zu Adenomen beziehungsweise Karzinomen führen. Vor allem der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wird als zentraler Effektor bei der Tumorgenese gesehen (Morin *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2002). Ein weit verbreitetes Modell zur Charakterisierung der Tumorgenese im Darm ist das APC-Mausmodell. Diese Tiere weisen Mutationen im APC-Gen auf und entwickeln dadurch bedingt Mukosaentartungen im Darm und folglich multiple intestinale Neoplasien (Moser *et al.*, 1990). Im Menschen ist das APC-Gen zudem die häufigste genetische Mutation, die zu einer Entwicklung von Polypen führt (Rubinfeld *et al.*, 1993).

Die Rolle von NO im Hinblick auf die Entstehung von Adenomen ist nicht im Detail erforscht. Einige Studien zeigen, dass eine Inhibierung des cGMP-Signalweges, durch eine verminderte NOS-Aktivität (Chhatwal *et al.*, 1994; Schleiffer *et al.*, 2000)

beziehungsweise eine gesteigerte PDE-Expression und die dadurch gefolgte Suppression von β -Catenin (Piazza *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2015), mit einer Adenomentstehung assoziiert ist. Außerdem wird eine verminderte PKG-Aktivität und die damit ausbleibende antiapoptotische Wirkung (Hou *et al.*, 2006) sowie die verminderte Expression der GC-Aktivatoren Guanylin und Uroguanylin (Shailubhai *et al.*, 2000; Notterman *et al.*, 2001) mit der Entstehung von Colon-Adenokarzinomen assoziiert. Des Weiteren konnte durch eine Erhöhung der cGMP-Konzentration in humanen Colonkarzinom-Zellen die Aktivierung der PKG und dadurch eine Induktion der Apoptose nachgewiesen werden (Thompson *et al.*, 2000; Deguchi *et al.*, 2004). Eine Vielzahl von Studien thematisiert die Rolle der im Epithel vorkommenden membranständigen Cyclase GUCY2C in Verbindung mit der Karzinogenese (Lin *et al.*, 2012; Blomain *et al.*, 2016). Hier wird vor allem die Stilllegung des Enzyms als eine Ursache für die Tumorigenese gesehen (Notterman *et al.*, 2001; Glebov *et al.*, 2006). Eine Störung des NO-GC-Signalweges wurde bislang jedoch noch nicht mit einer Tumorentwicklung assoziiert.

1.3. Transgene Mausmodelle

Für die medizinische Grundlagenforschung spielen transgene Tiermodelle eine wichtige Rolle. Die Möglichkeit gezielt spezifische Gene einzuführen bzw. zu entfernen bietet ein breites Spektrum an Möglichkeiten, um die Funktion einzelner Enzyme unter physiologischen Gesichtspunkten näher zu charakterisieren. Diese gezielt eingebrachten Mutationen ermöglichen die Evaluation pathophysiologischer Aspekte. Mausmodelle eignen sich besonders für physiologische Studien, da das Mausgenom zu 99% mit dem menschlichen Erbgut korreliert. 96% davon liegen sogar in vergleichbarer Nachbarschaft vor (Capecchi, 1994; Houdebine, 2007). Des Weiteren wird die Generierung der Mauslinien dadurch vereinfacht, dass murine embryonale Stammzellen in Kultur gehalten werden können (Capecchi, 1989a, b). Neben den wissenschaftlichen Aspekten hat das Mausmodell auch praktische Vorzüge. So stehen durch die hohe Reproduktionsrate schnell Generationsfolgen zur Verfügung. Außerdem entstehen, bedingt durch ihre geringe Körpergröße und dem daraus resultierenden geringen Futter- und Raumanspruch, lediglich relativ geringe Tierhaltungskosten. Im Hinblick auf die NO/cGMP-Signalkaskade gibt es derzeit verschiedene Mausmodelle, die eine Beeinträchtigung der Signalkaskade auf unterschiedlichen Ebenen aufweisen. Diese verschiedenen Mausmodelle sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

1.3.1. Mausmodelle für die NOS

Wie bereits erwähnt sind drei Isoformen der NOS bekannt (Tsutsui *et al.*, 2009). Da die Isoformen durch unterschiedliche Gene kodiert werden, konnte für jede eine Knockout-Mauslinie generiert werden, durch die Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung des jeweiligen Enzyms gezogen werden konnten.

Für die nNOS wurden zwei verschiedene Knockout-Linien entwickelt. Eines dieser Linien basiert auf der genomischen Deletion von Exon 2. Der Phänotyp dieser Tiere ist charakterisiert durch aggressives Verhalten (Nelson *et al.*, 1995) und einen stark vergrößerten Magen, der vermutlich durch eine Hypertrophie des Pylorus-Sphinkters bedingt ist (Huang *et al.*, 1993). Des Weiteren treten bei diesen Tieren vermehrt Bezoare auf (Sivarao *et al.*, 2008). Eine Schwachstelle dieses Modelles ist jedoch, dass eine Spleißvariante der nNOS in Organen wie Gehirn und Darm weiterhin funktionell aktiv ist und somit keinen zuverlässigen Knockout darstellt (Eliasson *et al.*, 1997). Folglich wurde eine weitere Knockout-Linie generiert mit Deletion des Exons 6. Diese Tiere wiesen im Gegensatz zu dem vorherigen Knockout-Modell keine nNOS-Aktivität in den Geweben auf. Der Phänotyp der Tiere ist vergleichbar mit dem der Exon 2-Knockout-Linie: Die Tiere leiden ebenfalls unter einer Pylorus-Stenose (Gyurko *et al.*, 2002) und sie sind durch eine kurze Lebensdauer charakterisiert, die durch flüssige Nahrung etwas verlängert werden kann. Dieser starke Phänotyp unterstreicht die essentielle Rolle der nNOS für die gastrointestinale Motilität.

Knockout-Mäuse für die eNOS zeigten einen stark erhöhten Blutdruck sowie eine fehlende Gefäßrelaxation durch Acetylcholin (Huang *et al.*, 1995). Des Weiteren wurden Defizite bei der Angio- und Arteriogenese festgestellt (Dai & Faber, 2010), was Rückschlüsse auf einen antiproliferativen Effekt der eNOS in der glatten Gefäßmuskulatur zulässt (Moroi *et al.*, 1998; Rudic *et al.*, 1998).

Für die dritte Isoform, die iNOS, sind eine Vielzahl von Knockout-Mauslinien entwickelt worden, jedoch weist keine dieser Linien einen besonders starken Phänotyp auf. Die Tiere waren lediglich anfälliger für Infekte mit gleichzeitig verringertem Risiko, einen septischen Schock zu erleiden (Laubach *et al.*, 1995).

1.3.2. Mausmodelle für die NO-GC

In dieser Arbeitsgruppe wurden mehrere Knockout-Mauslinien für die NO-GC generiert. Durch Deletion der β_1 -Untereinheit wurde ein globaler Knockout der NO-GC (GCKO) erzeugt (Friebe *et al.*, 2007). Diese Tiere sind durch eine erheblich verringerte Lebenserwartung und eine stark ausgeprägte Wachstumsretardierung charakterisiert. 80 % der Tiere sterben bereits innerhalb der ersten Tage nach der Geburt. Die übrigen Tiere überleben noch weitere drei bis fünf Wochen. In diesem Zeitraum werden die Tiere

für gewöhnlich abgesetzt und es findet die Umstellung der Nahrung von Muttermilch auf feste Nahrung statt. Untersuchungen des Gastrointestinaltrakts zeigten, dass die Tiere eine verlängerte Darmpassagezeit aufweisen, was auf eine beeinträchtigte gastrointestinale Motilität schließen lässt. Nach Umstellen der Tiere auf eine ballaststoffarme Diät in Kombination mit der Gabe eines Protonenpumpen-Inhibitors kann die Überlebensrate gesteigert werden.

Neben dem schweren gastrointestinalen Phänotyp weisen die Tiere zudem kardiovaskuläre Störungen auf. Adulte GCKO-Mäuse entwickeln im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren einen erhöhten systolischen Blutdruck (30 mmHg). Die Ursache dafür ist vermutlich das Fehlen der NO-vermittelten Relaxation der Blutgefäße. So konnte in Organbadversuchen in isolierter GCKO-Aorta keine NO-vermittelte Relaxation hervorgerufen werden (Friebe *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in GCKO-Tieren eine NO-vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation ausbleibt. Sowohl die Thrombin-induzierte Ca^{2+} -Ausschüttung als auch die ADP-induzierte Adhäsion bleiben von NO-Donatoren unbeeinflusst. In vivo äußert sich dies vor allem in einer deutlich verringerten Blutungszeit der GCKO-Tiere. Diese Daten implizieren die NO-GC als den einzigen NO-Rezeptor in murinen Thrombozyten, der über eine verminderte Ca^{2+} -Ausschüttung inhibierend auf die Adhäsion sowie die Aggregation von Thrombozyten einwirkt (Dangel *et al.*, 2010).

Da es sich, wie bereits beschrieben, bei der NO-GC um ein Dimer handelt, wurden neben den Knockout-Tieren für die β_1 -Untereinheit auch Mausmodelle generiert, bei denen die α_1 - bzw. die α_2 -Untereinheit deletiert wurde (Mergia *et al.*, 2006; Vanneste *et al.*, 2007). Bei beiden Knockout-Mauslinien führte die Deletion zu keinem sonderlich stark ausgeprägten Phänotyp. Des Weiteren wurde durch die Deletion die Expression der jeweils anderen α -Untereinheit nicht beeinflusst. Demnach findet keine Expressionskompensation statt. Dennoch zeigten nähere Untersuchungen, dass die vorhandene Isoform die jeweils andere NO-GC-Isoform funktionell ersetzen kann. So konnte in Aorten von α_1 -Knockout-Tieren eine NO-GC-Expression von 6 % nachgewiesen werden, die auf die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform zurück zu führen ist. In Aorta von α_2 -Knockout-Tieren wurde noch eine 94 %-ige Expression der NO-GC, hervorgerufen von der $\alpha_1\beta_1$ -Isoform, nachgewiesen. Dies erklärt vermutlich die weniger stark ausgeprägten Phänotypen der Knockout-Mausmodelle der α -Untereinheit im Vergleich zum Knockout-Mausmodelle der β_1 -Untereinheit. So zeigten die α_2 -Knockout-Tiere keine Veränderung des Blutdrucks, die α_1 -Knockout-Tiere lediglich einen leicht erhöhten Blutdruck (7 mmHg). Demnach scheinen geringe Restmengen an funktionell erhaltener NO-GC auszureichen, um deren physiologische Funktion aufrecht zu erhalten. Die hohe

Expression der NO-GC in den SMC der Gefäße kann somit als Reservefunktion angesehen werden, durch die die Sensitivität gegenüber NO erhöht wird und die NO-Responsibilität gewährleistet.

Im Gastrointestinaltrakt bewirkt eine Deletion der α_1 -Untereinheit lediglich in männlichen Mäusen eine leichte Verlängerung der Darmpassagezeit. In Jejunum ist die nitric oxide Relaxation jedoch nahezu vollständig verschwunden und zudem geschlechtsunabhängig. Die verbleibende Relaxation kann durch den spezifischen NO-GC-Inhibitor ODQ vollständig gehemmt werden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die verbleibende Relaxation vermutlich von der $\alpha_2\beta_1$ -Isoform vermittelt wird (Dhaese *et al.*, 2008; Dhaese *et al.*, 2009).

Kürzlich wurde zudem eine Knockin-Mauslinie generiert, die durch eine His105/Phe-Punktmutation innerhalb der β_1 -Untereinheit charakterisiert ist. Diese Mutation resultiert in einer NO-GC, die kein Häm-Molekül und somit keine NO-Sensitivität mehr aufweist. Dies ermöglicht die Analyse der NO-abhängigen und -unabhängigen Aktivität der NO-GC. Ähnlich wie die GCKO-Tiere, zeigen Tiere dieser Knockin-Mauslinie eine verringerte Lebensdauer (Thoonen *et al.*, 2015).

1.3.3. Mausmodelle für die PKG

Die Expression der PKGI ist vor allem in Thrombozyten, der glatten Gefäßmuskulatur und ubiquitär im Gastrointestinaltrakt beschrieben (Geiselhöringer *et al.*, 2004). Die Knockout-Mäuse weisen eine erheblich verringerte Lebenszeit auf, die vermutlich in einer stark beeinträchtigten gastrointestinalen Motilität begründet liegt (Pfeifer *et al.*, 1998). So zeigen sie eine verlängerte Darmpassagezeit, stark dilatierte Darmabschnitte wie Magen, Duodenum und Caecum sowie eine Hypertrophie und Stenose des Pylorus (Ny *et al.*, 2000). Neben dem gastrointestinalen Phänotyp weisen die Tiere auch starke Beeinträchtigungen im vaskulären System auf. Experimentelle Analysen von Aorten dieser Tiere zeigten keine Relaxation nach Acetylcholin-Exposition sowie eine beeinträchtigte Relaxation nach der Gabe von NO-Donatoren. Des Weiteren zeigten männliche Tiere dieser Mauslinie eine beeinträchtigte Reproduktionsfähigkeit, was eine erektile Dysfunktion vermuten lässt (Hedlund *et al.*, 2000). Diese Resultate führen zu der Annahme, dass die PKGI eine zentrale Funktion im NO/cGMP-Signalweg in den glatten Muskelzellen einnimmt.

1.3.4. Mausmodelle für ICC

Vor allem im Hinblick auf die Erforschung von gastrointestinalen Motilitätsstörungen sind ICC-Knockout-Mausmodelle von besonderem Interesse, da eine Vielzahl von Krankheitsbildern mit einer Reduktion der ICC assoziiert wird (Farrugia, 2008; Ordog *et*

al., 2009). Der Verlust der ICC hat eine gestörte Kommunikation zwischen enterischen Neuronen und SMC zur Folge und führt so zu einer verringerten Motilität.

Die Identifizierung des Proto-Onkogens cKit als spezifischer Marker für ICC ermöglichte unter anderem die Generierung von Knockout-Mausmodellen für ICC. Neben den ICC ist cKit essentiell für die Bildung verschiedener anderer Zelltypen wie Melanocyten und Mastzellen (Maeda *et al.*, 1992; Lennartsson *et al.*, 2005). cKit liegt auf dem gleichen Allel auf Chromosom 5 des Mausgenoms wie der als ‚dominant-white spotting‘ bezeichnete W-Lokus cKit (Chabot *et al.*, 1988; Geissler *et al.*, 1988). Da eine komplette Mutation des cKit-Lokus letal ist, kamen Mauslinien mit verschiedenen Punktmutationen, und damit verbundenen funktionellen Einschränkungen der cKit-Aktivität zum Einsatz. Diese wurden unter der Annahme, dass die ICC in ihrer Entwicklung von der cKit-vermittelten Signalkaskade abhängig sind, als Zell-Knockout-Mausmodelle zur funktionellen Untersuchung der ICC verwendet. Abhängig von der Mutation weisen diese Tiere verschiedene Phänotypen auf. Charakteristisch sind zum Beispiel depigmentierte Bereiche des Fells, die sowohl bei heterozygoten als auch bei homozygoten Tieren auftreten. Vor allem die W/W^y-Mäuse wurden zur Analyse der funktionellen Effekte von ICC verwendet (Takagi *et al.*, 2003). Der Einsatz und der Nutzen der Tiere hängen jedoch vom Grad der ICC-Deletion ab, die sich innerhalb der ICC-Untergruppen und innerhalb der Darmabschnitte unterscheidet. So fehlen im Dünndarm dieser Mäuse die ICC-MY beinahe vollständig, wohingegen die ICC-IM weiterhin vorzufinden sind (Ward *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu sind in verschiedenen Magenregionen die ICC-MY weiterhin vorhanden, während hier die Anzahl der ICC-IM stark verringert ist (Burns *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1998). Ca. 40 % der W/W^y-Mäuse zeigen einen gastrointestinalen Phänotyp, der sich in Magenulcera sowie -papillomen äußert (Kitamura *et al.*, 1980). Experimente auf zellulärer Ebene lieferten kontroverse Ergebnisse. So konnte einerseits eine Beeinträchtigung post-junktionaler Antworten auf Ausschüttung nitreger und cholinergener Neuronen in verschiedenen gastrointestinalen Geweben gezeigt werden (Burns *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2003). Andererseits gibt es jedoch auch Untersuchungen der W/W^y-Mäuse, die keine wesentlichen Beeinträchtigungen der cholinergen und purinergen Neurotransmission sowie der nitregeren Innervation zeigen (Huizinga *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Eindeutige Erklärungen gibt es bislang nicht, jedoch sollten experimentelle Bedingungen sowie besonders der Grad der unvollständigen Deletion der ICC beachtet werden. Verbliebene ICC könnten kompensatorisch die Funktion übernehmen und auf diese Weise die widersprüchlichen Ergebnisse zur Folge haben.

2. Zielsetzung

Die NO/cGMP-Signalkaskade erfüllt eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Stickstoffmonoxid (NO) wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet und aktiviert die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC), was zur Bildung von cGMP führt. cGMP wiederum aktiviert verschiedene Effektorproteine, darunter die cGMP aktivierte Proteinkinase (PKG), die unter anderem eine Relaxation der glatten Muskulatur induziert.

Expression der NO-GC-Untereinheiten im Colon

Die NO-GC ist ein Dimer, das sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzt. Da zwei α -Untereinheiten existieren, können zwei Isoformen gebildet werden ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$). Die genaue Expressionsverteilung der Isoformen ist im Colon bislang noch nicht bekannt. Aus diesem Grund sollte im ersten Teil der Arbeit die Verteilung der Isoformen näher charakterisiert werden:

- Nachweis der NO-GC β_1 -Untereinheit auf Proteinebene mittels Immunhistochemie
- Nachweis der NO-GC α -Untereinheiten auf mRNA-Ebene mittels In-situ-Hybridisierung

NO-GC in der glatten Muskelschicht

Grundlage der gastrointestinalen Motilität ist das komplexe Zusammenspiel von Kontraktion und Relaxation. Die Relaxation wird zu einem großen Anteil durch NO vermittelt, dessen Hauptrezeptor die NO-GC darstellt. Im Gastrointestinaltrakt konnte die NO-GC in der glatten Muskelschicht bislang in den glatten Muskelzellen (SMC), interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) und Fibroblasten-ähnlichen Zellen (FLC) nachgewiesen werden. Die spezifische Funktion der NO-GC in den einzelnen Zelltypen ist bislang unklar. Zur detaillierten Aufklärung wurden in unserer Arbeitsgruppe globale NO-GC Knockout-Tiere (GCKO) sowie zell-spezifische Knockout-Mäuse (SMC-GCKO; ICC-GCKO und SMC/ICC-GCKO) generiert. Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass die NO-GC in diesen Zellen eine wichtige regulatorische Funktion bei der Modulation der spontanen Kontraktionen in der longitudinalen Muskelschicht des proximalen Colons einnimmt. Die NO-vermittelte Modulation der spontanen Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht und der propulsiven Kontraktionen (LDC) entlang des gesamten Colons sind bislang noch nicht detailliert untersucht. Aus diesem

Grund sollen in dieser Arbeit folgende Punkte anhand der Knockout-Mausmodelle analysiert werden:

- Myographiestudien der zirkulären Muskelschicht
- Analyse der propulsiven Kontraktionen des gesamten Colons anhand von Kontraktionsmuskarten

NO-GC in der Mukosa

Die Erneuerung des Darmepithels unterliegt einer komplexen Regulation, deren Störung zur Entwicklung von Adenomen bzw. Karzinomen führen kann. Bei den Untersuchungen der SMC-GCKO-Mauslinie konnten im Colon dieser Tiere 5 Monate nach Tamoxifen-Behandlung Entartungen der Mukosa festgestellt werden. Die Rolle von NO im Hinblick auf die Entstehung von mukosalen Entartungen ist nicht im Detail beforscht. Aus diesem Grund soll im dritten Teil dieser Arbeit dieser Befund im Colon von SMC-GCKO-Tiere näher analysiert werden, um einen potentiellen Zusammenhang zwischen der NO-GC und der Entstehung von Adenomen zu zeigen:

- Statistische Erhebung zur Inzidenz der mukosalen Entartung
- Charakterisierung der mukosalen Entartung mittels histologischer Färbungen
- Genexpressionsanalyse zur Identifikation potentieller Effektoren
- Charakterisierung der potentiellen Effektoren mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Chemikalie	Hersteller
DABCO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	L-NAME	Alexis, Lausen (CH)
DEA-NO	Enzo, Lörrach	β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
DePex	Serva, Heidelberg	Miglyol	Apotheke des Uniklinikums
Eosin	Morphisto, Frankfurt/Main	Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe
GelRed	Biotium, Fremont (USA)	NDS	Biowest, Nuaille (F)
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	ODQ	Alexis, Lausen (CH)
Glycerol	Merck, Darmstadt	Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxilin	Morphisto, Frankfurt/Main	PFA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hexamethonium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Saccharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf	Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle weiteren Salze und Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bestellt.

3.1.2. Puffer

Genotypisierung

Alkalischer Lysepuffer

NaOH	1 M
EDTA	50 μ M
pH 8,0	

Neutralisationspuffer

Tris/HCl	0,1 M
----------	-------

Organbad

Krebs-Henseleit-Puffer

NaCl	118 mM
KCl	4,7 mM
CaCl ₂	2,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	25 mM
Glukose	7,5 mM

Lösung A

NaCl	172,5 g
KCl	8,75 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	9,36 g
KH ₂ PO ₄	4,05 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,34 g
+ 1000 ml Aqua dest	

Lösung B

NaHCO ₃	52,5 g
+ 1000 ml Aqua dest	

Der Krebs-Henseleit-Puffer (K-H-Lösung) wurde jeden Tag frisch zubereitet. Für 1 l K-H-Lösung wurden je 40 ml Lösung A und Lösung B mit 1,5 g Glukose gemischt und bei 37 °C kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) versetzt, um einen pH-Wert von 7,4 aufrechtzuerhalten

Histologie

PFA (4 %ige Lösung)

PBS 1x	1000 ml	800 ml PBS wurden auf 60 °C erwärmt und 40 g Paraformaldehyd unter Zugabe von NaOH gelöst. Das Volumen wurde auf 1000 ml aufgefüllt und der pH auf 6,9 eingestellt.
Paraformaldehyd	40 g	
NaOH (1N)		
HCl		

Immunhistochemie

PBS (10x Stammlösung)

NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄	14,4
KCl	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
pH 7,4 mit HCl	
+ 1000 ml Aqua dest	

Mowiol

Mowiol	12 g
H ₂ O	30 ml
0,2 M Tris pH 8,5	60 ml
Glycerol	30 g
DABCO	2,5%

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämalaun

Hämatoxylin	1 g
Aqua dest	1000 ml
NaIO ₃	0,2 g
NaIO ₃	50 g
C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂	50 g
C ₆ H ₈ O ₇	1 g

Eosin

Eosin	0,1 g
+ 100 ml Aqua dest	

3.1.3. Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Hersteller
NO-GC	Kaninchen	1:800	laboreigen
cKit	Ratte	1:200	Linaris, Wertheim
Ki67	Ratte	1:100	eBioscience, Frankfurt
Alexa-555 anti-Kaninchen	Esel	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa-488 anti-Ratte	Esel	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	-	1:1000	Applichem, Heidelberg

3.1.4. Sonden für In-situ-Hybridisierung

Sonde	Erkennungsstelle (Basenpaare; Referenzgenom)	Katalognummer bei ACD
Mm-Gucy1b3-E10	1313 – 1528 (Exon 10); NM_017469.4	464321
Mm-Gucy1a2	686 – 1650; NM_001033322.2	496311
Mm-Gucy1a3	704 – 1655; NM_021896.5	449671
Mm-Gremlin1	398 – 1359; NM_011824.4	314741
Positiv Kontrolle	PPIB-C1/POLR2A-C2	321651
Negativ Kontrolle	DapB (von Bacillus subtilis Stamm)	320751

3.1.5. Kits, Geräte und Software

Geräte	Modellbezeichnung	Hersteller
UV-Transilluminator	Fluo-Link	Biometra
CCD-Kamera	QuickStore	MS-Laborgeräte
Organbad	Multi Myograph Model 610M	Danish Myo Tech
PowerLab	Powerlab 8/30	AD Instruments
Pumpe	REGLO Analog	Ismatec
Pumpschläuche	SC0189	Ismatec
Webcam	Logitech® HD Webcam C525	Logitech
Einplatinencomputer	Raspberry Pi 3, Model B	Raspberry Pi Trading
Bioanalyser	Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent
Sequenzierer	NextSeq 500	Illumina
Gewebeinfiltrations Automat	TP1020	Leica
Lichtmikroskop	BZ-9000	Keyence

Software	Hersteller
Image J	Wayne Rasband (www.imagej.nih.gov/ij/)
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.
Lab Chart 8	AD Instruments
Microsoft Excel 2013	Microsoft Excel 2013
HD Video Converter Factory Pro	WonderFox Soft

Kit	Hersteller
RNA-Extraktions Kit	Qiagen®
RNAscope® 2.5 HD Reagent Kit-RED	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® 2.5 HD Duplex Reagent Kit	Advanced Cell Diagnostics
TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit, Set A	Illumina
SuperScript II reverse transcriptase	Life technologies
NextSeq® 500/550 High Output Kit v2	Illumina

3.2.1. Tiere

3.2.1.1. Haltung und Zucht

Die für die Versuche verwendeten Mauslinien (GCKO, SMC-GCKO, ICC-GCKO, SMC/ICC-GCKO) wurden von Andreas Friebe zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden gemäß den allgemeinen Anforderungen in Makrolon-Typ-II-Käfigen (max. 4 adulte Tiere) oder Makrolon-Typ-II-long-Käfigen (max. 6 adulte Tiere) gehalten. Als Einstreu wurden Holzspäne verwendet. Alle Tiere erhielten Wasser und Futter ad libitum. Bedingt durch ihren gastrointestinalen Phänotyp erhielten GCKO-Tiere eine ballaststoffarme Diät (Altromin 1013) in Kombination mit einem Protonenpumpeninhibitor (Omeprazol und Bikarbonat). Alle übrigen Mauslinien wurden mit einer Nager-Standarddiät (Altromin 1320) versorgt.

Zur Zucht der Mauslinien wurden je zwei heterozygote Weibchen im gebärfähigen Alter (8 bis 45 Wochen) und ein heterozygoten Männchen (7 Wochen bis 1 Jahr) verpaart. 18 bis 21 Tage nach der Geburt wurden die Nachkommen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Das Kreuzungsschema der Mauslinien ist in Abbildung 5 dargestellt.

Die Versuche zur Untersuchung der Darmmotilität wurden mit adulten Mäusen im Alter von 8 bis 20 Wochen, die Analyse der Adenomentwicklung mit Tiere in einem Alter von 20 bis 48 Wochen durchgeführt. Mit Ausnahme der SMC-GCKO- und SMC/ICC-GCKO-Linien wurden für die Versuche zu gleichen Anteilen Tiere beider Geschlechter verwendet. Bei der SMC-GCKO-Mauslinie konnten nur männliche Nachkommen eingesetzt werden, da das SMMHC-Cre-Transgen auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist.

Als Kontrollen für GCKO-Mäuse dienten reine WT-Geschwister-Tiere; für die zellspezifischen und damit induzierten Knockout-Tiere dienten heterozygote, Cre-exprimierende Geschwister-Tiere als Kontrollen. Da bei den Motilitätsstudien keine Unterschiede zwischen WT- und heterozygoten Kontrolltieren festgestellt werden konnte, wurden lediglich die Werte der WT-Tiere dargestellt.

Als weiteres Mausmodell wurden Reporter-mäuse generiert. Hierzu wurde der Mausstamm Ai14 von Jackson verwendet, welcher ein tdTomato-Gen mit einem vorgeschalteten geflochtenen STOP-Codon enthält. Die Kreuzung dieser Mauslinie mit Tieren, welche eine durch Tamoxifen aktivierte Cre-Rekombinase exprimieren, bewirkt durch Tamoxifeninjektion folglich die Deletion des STOP-Codons. Dies wiederum hat die Expression des fluoreszierenden Farbstoffs zur Folge. Eine Kreuzung der Reporter-mauslinie mit der SMMHC-Cre-Mauslinie führt zur spezifischen Expression des fluoreszierenden Proteins in Zellen mit aktiven SMMHC-Promotor. Auf diese Weise

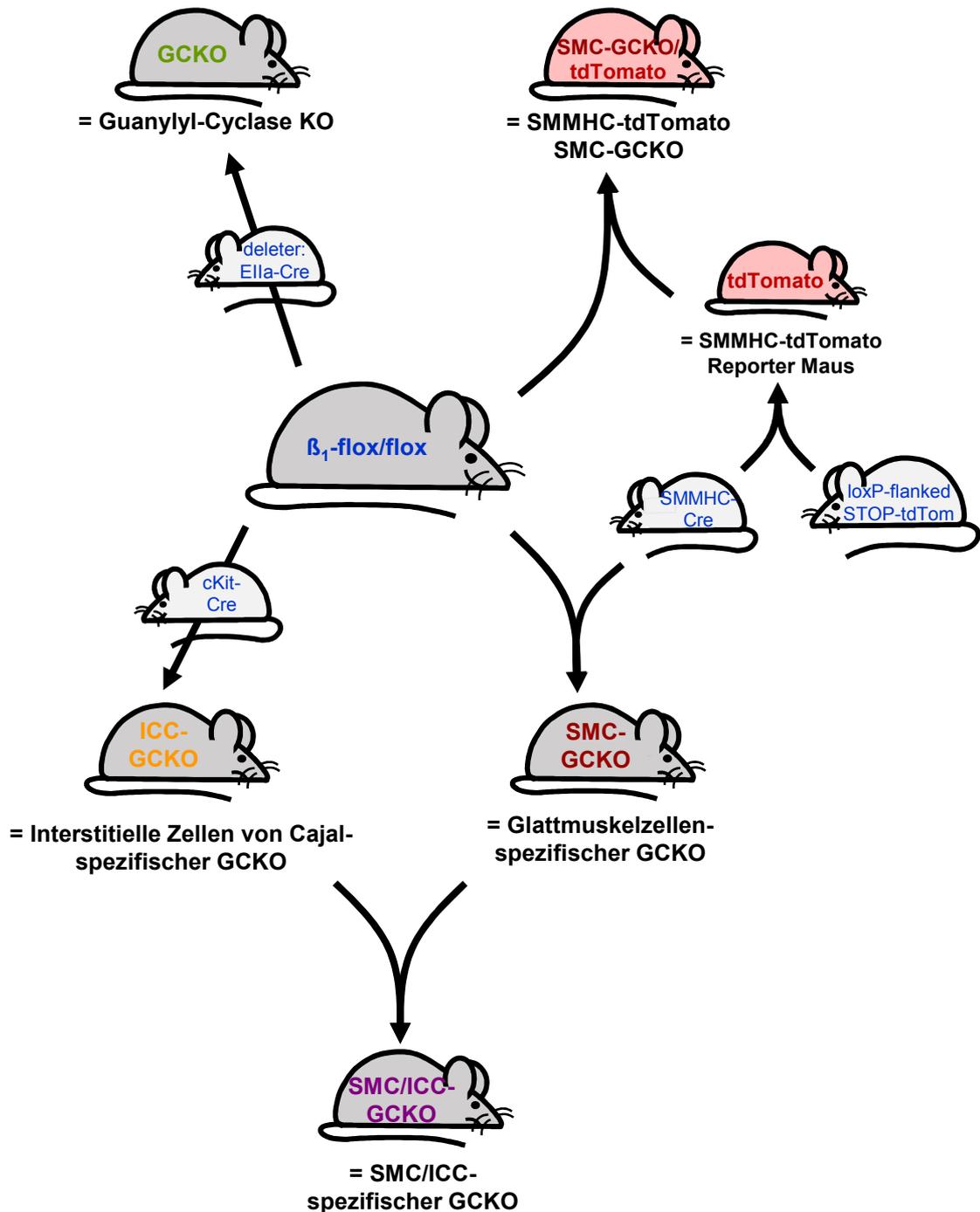


Abbildung 5: Generierung der Knockout-Mausmodelle

Zur Generierung der globalen Knockout-Mäuse wurden Tiere mit gefloxtem Exon 10 der NO-GC β_1 -Untereinheit (β_1 -flox/flox) mit Tieren gekreuzt, die die Cre ubiquitär exprimieren (Ella-Cre). Um zellspezifische Mauslinien zu erhalten, wurden die β_1 -flox/flox-Mäuse mit Mäusen verpaart, die die Cre gewebsspezifisch exprimieren. Für die spezifische Deletion der NO-GC in SMC wurde die Cre unter dem SMMHC-Promotor, für die Deletion in ICC unter dem cKit-Promotor exprimiert. Kreuzung der SMC-GCKO- mit ICC-GCKO-Tiere führten zu Doppel-GCKO-Mäusen, welchen die NO-GC sowohl in SMC als auch in ICC fehlt. Das Einkreuzen einer tdTomato-Maus ermöglichte die Nachverfolgung von Zellen, in welchen der SMMHC-Promotor zur Zeit der Tamoxifen-Behandlung aktiv war.

können Zellen nachverfolgt werden, in denen zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Behandlung der SMMHC-Promotor und damit die Cre-Rekombinase aktiv war.

3.2.1.2. Induktion der zellspezifischen Knockout-Tiere und Reporter-mäuse

Zur Induktion der Cre-Rekombinase in zellspezifischen Knockout-Tieren (SMC-GCKO, ICC-GCKO, SMC/ICC-GCKO), heterozygoten Kontrolltieren sowie tdTomato-Reporter-mäuse wurde den Mäusen im Alter von 6 bis 8 Wochen Tamoxifen (1 mg i.p.; gelöst in Miglyol 812) an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert. Ab Tag 50 nach der letzten Injektion wurden die Tiere in den Experimenten eingesetzt, da ab diesem Zeitpunkt die NO-GC-Expression nicht mehr nachgewiesen und somit von einem zuverlässigen Funktionsverlust ausgegangen werden kann (Groneberg *et al.*, 2010).

3.2.1.3. Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde den Tieren im Alter von 21 Tagen Ohr-gewebe entnommen und mithilfe der HotSHOT Methode lysiert (Truett *et al.*, 2000). Von den Lysaten wurden spezifische DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988a; Saiki *et al.*, 1988b). Anschließend wurden die aus der PCR resultierenden DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Aaij & Borst, 1972). Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mithilfe des Farbstoffs GelRed (1:50.000), dessen Ethidium-Untereinheit in die Basen der DNA interkaliert und somit spezifisch die DNA-Banden anfärbt. Die Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht auf einem UV-Transilluminator führte zur Emission eines fluoreszierenden Signals, welches mithilfe einer CCD-Kamera detektiert wurde.

3.2.2. Motilitätsmessungen

3.2.2.1. Myographiestudien

Präparation des Gewebes

Die Tiere wurden mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchhöhle wurde geöffnet, der gesamte Darm freipräpariert und direkt in Carbogen-gepufferte K-H-Lösung überführt. Das Mesenterium wurde entfernt und der Darminhalt mithilfe einer Schlundsonde mit K-H-Lösung von distal nach proximal ausgespült. Während der gesamten Präparation wurde darauf geachtet, dass der Darm nicht durch exzessive Dehnung strapaziert wurde.

Zur Analyse der Kontraktilität der zirkulären Muskelschicht wurde der proximale Teil des Colons verwendet. Dieser Abschnitt des Darms ist bei Mäusen durch fischgrätenartige Mukosafalten charakterisiert, wodurch er leicht von den anderen Teilen zu unterscheiden

ist. Aus jedem Colon wurden vier nahezu gleichgroße Ringe von 2,5 mm Länge präpariert und im Organbad fixiert.

Organbadmessungen

Für die Untersuchungen wurden vier 4-Kanal-Multi-Myographen (Modell 610M, Danish Myo Technology) verwendet. Die einzelnen Kammern wurden mit jeweils 5 ml K-H-Lösung befüllt, kontinuierlich bei 37 °C gehalten und mit Carbogen versetzt. Nach Fixierung der Colonringe im Organbad wurden die Gewebestücke auf 2 mN vorgespannt und für 45 min äquilibriert. Während dieser Zeit entwickelte das Gewebe spontane Kontraktionen, die über die ganze Zeit aufgezeichnet wurden. Die Analyse der Kontraktionen erfolgte jedoch erst nach der Äquilibrierungsphase. Hierfür wurden die Kontraktionen zunächst unter Kontrollbedingungen untersucht. Im Anschluss erfolgte die Analyse der pharmakologischen Einflüsse von DEA-NO (NO-Donor; 10 µM), L-NAME (nNOS-Inhibitor; 200 µM), ODQ (NO-GC-Inhibitor; 10 µM) und TTX (spannungsabhängige Na⁺-Kanal-Blocker; 1 µM). Am Ende jeder Messung wurde IBMX (unspezifischer PDE-Hemmstoff; 100 µM) zugefügt, um eine maximale Relaxation des Gewebes zu induzieren. Dieser Wert wurde für die weitere Auswertung als 0 % Kontraktion definiert, um die relative Änderung des Muskeltonus zu bestimmen. In die Auswertung wurden nur solche Colonringe einbezogen, welche eine eindeutige Relaxation nach der Applikation von IBMX zeigten.

3.2.2.2. Kontraktionsmusterkarten

,whole colon'-Präparation

Der gesamte Darm wurde entnommen und in 4 °C kalte K-H-Lösung überführt. Dünn- und Dickdarm wurden sorgfältig voneinander getrennt. Das Mesenterium wurde vollständig entfernt und der Darminhalt behutsam mithilfe einer Schlundsonde von distal nach proximal ausgespült. Während der gesamten Präparation wurde der Puffer mehrmals durch frische, gekühlte K-H-Lösung ersetzt. In beide Öffnungen des Colons wurde jeweils eine verkürzte Kanüle (1,20 x 50 mm) eingeführt und mit einem Faden fixiert. Ein kleines Stück Schlauch am Ende der Kanülen sowie Kerben in den Kanülen dienten zur besseren Fixierung und verhinderten ein Abrutschen des Darms. Der Darm wurde in einer mit 300 ml K-H-Lösung gefüllte Kammer mithilfe der Kanülen fixiert, sodass er zwar gestreckt, aber nicht gedehnt vorlag. Abbildungen 6A und 6B zeigen den Aufbau der Messanlage. Die K-H-Lösung wurde kontinuierlich mit Carbogen versetzt und bei 37 °C gehalten. Die Bewegungen des Darms wurden mithilfe einer Webcam (Logitech® HD Webcam C525) aufgezeichnet. Um optimale Videoaufnahmen zu erhalten, wurden die Carbogen-zuleitenden Schläuche mit einem feinen Gitter

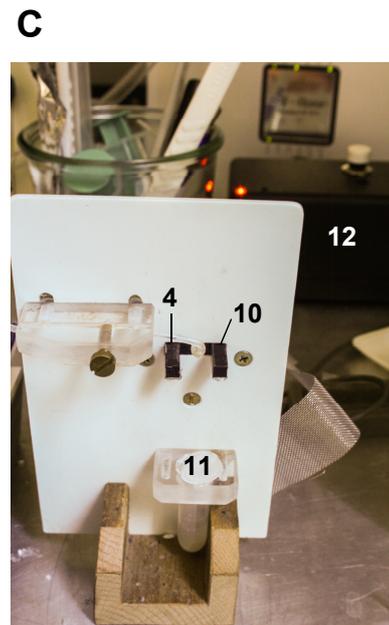
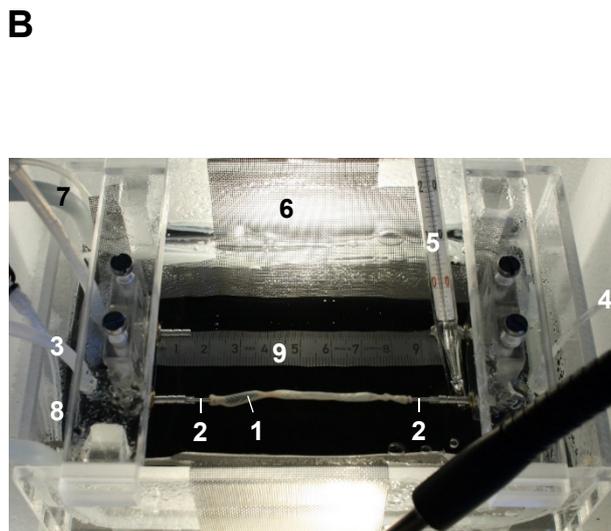
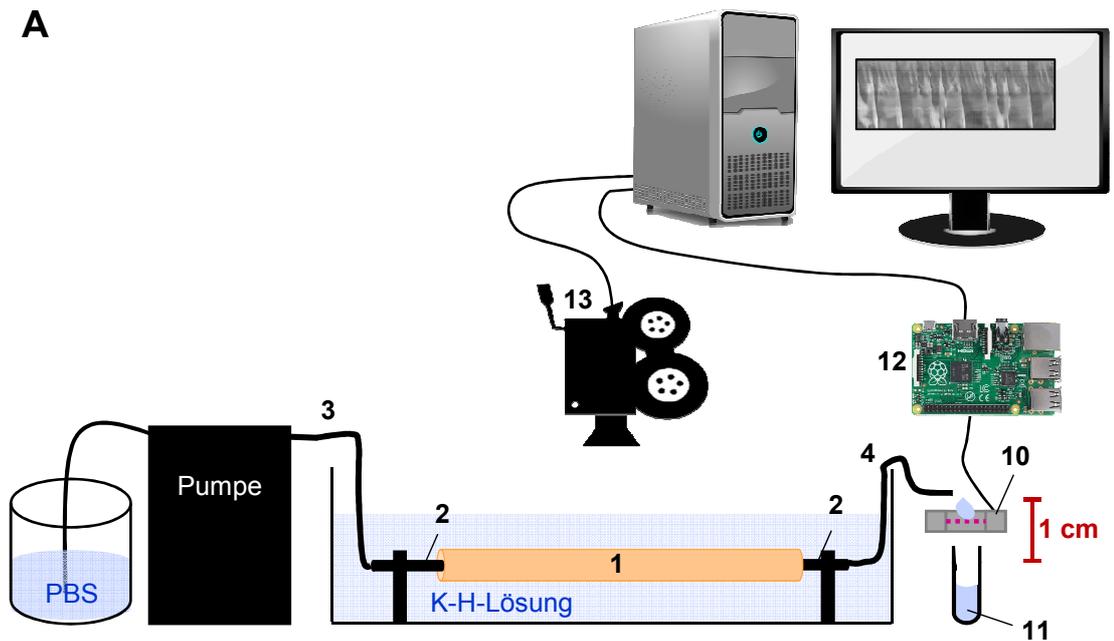


Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Messungen der ‚whole colon‘-Motilität

(A) Das Colon wurde in eine Kammer eingespannt und kontinuierlich mit PBS durchspült. Der Zeitpunkt des Ausflusses wurden mithilfe einer Lichtschranke dokumentiert. (B) Die institutseigene Konstruktion der Kammer. (C) Lichtschrankensystem zur Erfassung der Ausflusstropfen.

Legende: 1 Colon; 2 Kanülen; 3 Zufluss; 4 Abfluss; 5 Thermometer; 6 Metallgitter; 7 Schläuche zum Wärmeaustausch; 8 Begasung; 9 Lineal; 10 Lichtschranke; 11 Auffangbehälter; 12 Raspberry Pi; 13 Kamera

abgedeckt, sodass eine möglichst ruhige Flüssigkeitsoberfläche vorlag. Der Darm wurde während des gesamten Experiments kontinuierlich mit PBS durchspült (Flussrate $30 \mu\text{l min}^{-1}$). Der dadurch entstehende Ausfluss wurde aufgezeichnet, um die Darmbewegungen dem Flüssigkeitsaustritt zuordnen zu können. Hierfür wurde ein Lichtschrankensystem verwendet (siehe Abbildung 6C): Das Ende des Abflussschlauchs wurde 1 cm oberhalb der Colonebene über der Lichtschranke fixiert. Jeder Ausflusstropfen wurde von der Lichtschranke erfasst und das erzeugte Signal mithilfe eines Einplatinencomputers (Raspberry Pi) dokumentiert. Auf diese Weise konnte jeder Tropfen zeitlich eindeutig zugeordnet werden.

Messungen der Darmbewegung des gesamten Colons

Nach einer einstündigen Äquilibrationsphase entwickelten die Colonpräparate propulsive Kontraktionen, welche sich entlang des Colons fortpflanzten. Diese kontraktile Aktivität wurde im Folgenden für je 30 min zunächst unter Kontrollbedingungen sowie in der Anwesenheit von pharmakologischen Stoffen wie L-NAME ($200 \mu\text{M}$), TTX ($1 \mu\text{M}$) und Hexamethonium ($100 \mu\text{M}$) aufgezeichnet.

Erstellung der Kontraktionsmusterkarten

Die Videoaufnahmen wurden mithilfe eines Plugin (gMaps ON) für ImageJ in Durchmesserkarten umgerechnet. Dieses Plugin wurde basierend auf einem Java Algorithmus von S.P. Parsons (McMaster Universität, Hamilton, Kanada) programmiert und zur Verfügung gestellt. In den Kontraktionsmusterkarten (Spatiotemporal Maps) wird der Durchmesser entlang der gesamten Länge des Colons als Funktion der Zeit dargestellt. Die Karten geben damit Aufschluss über Frequenz, Dauer und Richtung der Kontraktionen entlang des gesamten Colons. Die Zeitpunkte des Ausflusssaustritts wurden anschließend in den Karten markiert, sodass sie den Kontraktionen zugeordnet und zudem eine Aussage über die Effektivität der Kontraktionen getroffen werden konnte. Des Weiteren wurde mithilfe von Zeit-Plots die Änderungen des Durchmessers entlang der Zeit dargestellt, anhand derer der absolute Durchmesser der Genotypen analysiert wurde.

3.2.3. Histologie

3.2.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, der Darm entnommen, das Mesenterium entfernt und der Darminhalt mithilfe einer Schlundsonde von distal nach proximal ausgespült. Der proximale Teil des Colons wurde bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für 24 h in 4 % PFA immersionsfixiert und danach in PBS überführt. Die Proben wurden in PBS dreimal 20 – 25 s entgast. Die Entwässerung der Proben und Paraffineinbettung erfolgte mithilfe des Gewebefiltrationsautomaten (Leica TP1020) nach folgendem Protokoll:

	Lösungsmittel	Zeit (h)
1	Ethanol 70 % (I)	0,5
2	Ethanol 70 % (II)	1
3	Ethanol 80 %	2,5
4	Ethanol 96 %	2,5
5	Ethanol 100 % (I)	1
6	Ethanol 100 % (II)	2
7	Ethanol 100 % (III)	2
8	Xylol (I)	1
9	Xylol (II)	2
10	Xylol (III)	2
11	Paraffin (I)	3,5
12	Paraffin (II)	2,5

Gewebsschnitte von 5 µm Dicke wurden angefertigt und anschließend mittels Hämatoxilin und Eosin nach folgendem Protokoll gefärbt:

	Lösungsmittel	Zeit (min)
1 + 2	Xylol (II + I)	je 10
3 + 4	Ethanol 100 % (II + I)	je 2
5	Ethanol 96 %	2
6	Ethanol 80 %	2
7	Ethanol 70 %	2
8	Ethanol 50 %	2
9	Aqua dest	2
10	Hämalaun nach Mayer	10
11	Aqua dest	spülen
12	Leitungswasser (fließend)	10
13	Aqua dest	spülen
14	Eosin 0,1 % wässrig	10
15	Aqua dest	spülen
16	Ethanol 96 %	2
17 + 18	Ethanol 100 % (I + II)	je 5
19 + 20	Xylol (I + II)	je 5

Danach wurden die Schnitte mit DePex eingedeckt und mithilfe eines Keyence Lichtmikroskops ausgewertet.

3.2.3.2. Immunhistochemie

Mäuse wurden durch Isofluran betäubt und durch zervikaler Dislokation getötet. Das jeweilige Gewebe wurde unmittelbar im Anschluss präpariert, von Darminhalt gesäubert und in 2 % Paraformaldehyd (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) für 1,5 h fixiert. Danach wurde das Gewebe über Nacht in 20 % Saccharose-Lösung bei 4 °C inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 5-10 µm dicke Kryoschnitte wurden

hergestellt, luftgetrocknet und nochmal mit 4 % PFA fixiert. Die Schnitte wurden permeabilisiert (0,1 % Triton, 20 min) und mit entsprechenden Primär-Antikörpern bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte für 10 min mit DAPI (1:1000 in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Mowiol eingedeckt und an einem Konfokalmikroskop (Leica SP8) mit den entsprechenden Filtersätzen ausgewertet.

Prozentuale Bestimmung der NO-GC-Deletionsrate in ICC-GCKO-Colon

Zur Bestimmung der Effektivität des Tamoxifen-induzierten Knockout-Modells wurden jeweils drei Kryoschnitte von Colongewebe aus vier ICC-GCKO-Tieren angefertigt. Diese wurden mittels Immunhistochemie mit Antikörpern gegen cKit und NO-GC angefärbt. Anhand der mikroskopischen Bilder konnten die Zellen, die sowohl cKit- als auch NO-GC-positive Signale zeigten (gelbes Signal), ausgezählt und die Deletionsrate bestimmt werden. Die Auszählung wurde von zwei unabhängigen Personen durchgeführt.

3.2.3.3. In-situ-Hybridisierung

Die Mäuse wurden Isofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Das Colon wurde in K-H-Lösung präpariert und mit 4 % PFA für 24 h bei 4 °C fixiert. Um Gefrierschäden zu vermeiden wurde das Gewebe in 20 % und 30 % Saccharose in PBS für jeweils weitere 24 h inkubiert und danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, die zunächst mit 4 % PFA für 15 min postfixiert und danach durch eine Alkoholreihe zur besseren Haftung an den Objektträgern dehydriert wurden (jeweils 5 min in 50 % EtOH, 70 % EtOH und 2x 100 % EtOH). Danach wurden die Schnitte luftgetrocknet und 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Assay wurde mit dem RNAscope® 2.5 HD Duplex Reagent Kit bzw. RNAscope® 2.5 HD Reagent Kit-RED durchgeführt (Wang *et al.*, 2012). Demaskierung der Proben erfolgte für 5 min in einem Dampfgarer. Nach vollständigem Trocknen der Schnitte wurden die Schnitte mit Protease III bzw. Protease IV für 30 min bei 40 °C inkubiert und danach der Assay nach Anleitung unter Verwendung der entsprechenden Sonden durchgeführt.

3.2.4. Analyse der mukosalen Veränderungen im SMC-GCKO-Colon

Bei intensiven Untersuchungen von SMC-GCKO-Colon ist aufgefallen, dass diese Tiere ca. 5 Monate nach Tamoxifen-Behandlung mukosale Veränderungen entwickelten. Daher wurden Tiere 5 Monate nach Tamoxifen-Behandlung auf diesen Phänotyp hin untersucht. Hierfür wurde Colon von induzierten, heterozygoten Kontrolltieren, induzierten SMC-GCKO-Tieren und nicht-induzierte SMC-GCKO-Tiere evaluiert. Von

der SMC-GCKO-Mauslinie wurden Tiere aus der institutseigenen Tierhaltung sowie Tiere, welche zur Züchterhaltung vor Jahren in eine andere Versuchstierhaltung separiert wurden analysiert. Zur makroskopischen Analyse der Mukosastruktur wurde das Colon präpariert und in Carbogen-versetzter K-H-Lösung entlang des Mesenteriums geöffnet. Das Gewebe wurde mit Pins fixiert, sodass Aufnahmen der Mukosastruktur angefertigt werden konnten. Zur statistischen Auswertung der Entartung wurden die Häufigkeit sowie Gewicht und Alter der Tiere dokumentiert.

3.2.5. RNA-Extraktion und mRNA-Sequenzierung

Für die RNA-Extraktion wurden die Mäuse (6 WT, 6 SMC-GCKO; Alter ca. 7 Monate) mittels zervikaler Dislokation getötet und die Präparation des Colons schnellstmöglich in eiskaltem PBS + 0,6 % β -Mercaptoethanol durchgeführt. Proximales Colon wurde entlang des Mesenteriums geöffnet, vom Darminhalt gesäubert und in frische Pufferlösung überführt. Die Mukosafalten (8-10 WT-Mukosafalten; 5 entartete SMC-GCKO-Mukosafalten) wurden von der glatten Muskelschicht getrennt und in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Das Gewebepulver wurde direkt in den RLT-Puffer des Qiagen® RNA-Extraktions Kit überführt und mittels QIAshredder Säulen homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation nach Anweisung des Qiagen® RNA-Extraktions Kit.

Die folgenden Schritte wurden von der *Core Unit Systemmedizin (SysMed)* der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg durchgeführt. Vor dem weiteren Einsatz der Proben wurden deren Qualität mithilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzer (RNA 6000 nano Bioanalyzer-Lauf) überprüft. Bei entsprechender Qualität wurde die mRNA unter Verwendung SuperScript II reverse transcriptase in cDNA umgeschrieben und diente als Grundlage zur Erstellung einer Sequenzierbibliothek mithilfe des TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit, Set A. Diese wurde anschließend mit einem Illumina NextSeq 500 Sequenzierer (NextSeq® 500/550 High Output Kit v2) sequenziert. Zunächst wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analyse; PCA) der Sequenzierdaten durchgeführt, um die Homogenität des Datensatzes zu evaluieren. Des Weiteren wurde zur besseren Kategorisierung der differentiell exprimierten Gene eine ‚gene set enrichment‘-Analyse (GSEA) unter der Verwendung der KEGG-Signalwege sowie der "Hallmarks"-Kategorisierung des Broad-Instituts durchgeführt.

3.2.6. Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPadPrism 5.0 für Windows durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die n-Werte geben die Anzahl der in dem jeweiligen Experiment verwendeten Tiere an. Für den Vergleich unabhängiger Variablen von WT, GCKO, SMC-GCKO, ICC-GCKO und SMC/ICC-GCKO wurde der Kruskal-Wallis Test (Abbildung 15, 16, 18, 24, 27; Tabelle 3, 5) bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way analysis of variance; ANOVA) für wiederholte Messungen (Abbildung 10C; Tabelle 1, 2, 4) durchgeführt. Ergab der globale Test ein P-Value $\leq 0,05$ wurden *post-hoc*-Tests unter Erfüllung der jeweiligen Voraussetzungen wie folgt angewendet:

Zur Bewertung der pharmakologisch induzierten Veränderungen der spontanen Kontraktionen innerhalb eines Genotyps wurde entweder der gepaarte-t-Test (Tabelle 2, 4) bzw. der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Abbildung 24C und D) durchgeführt. Zur Evaluation der Unterschiede zwischen WT- und den Knockout-Mäusen wurde entweder der Mann-Whitney-U-Test (Abbildung 15, 16, 18, 24A und B, 27; Tabelle 3) bzw. der nicht-gepaarte t-Test mit Welch-Korrektur (Tabelle 2, 4) angewendet.

4. Ergebnisse

4.1. Expression der NO-GC-Untereinheiten im Colon

Die NO-GC ist ein Dimer, das sich aus einer α - und einer β -Untereinheiten zusammensetzt. Während von der β -Untereinheit auf Proteinebene lediglich eine Isoform (β_1) existiert, werden in Säugetierzellen zwei verschiedene α -Untereinheiten (α_1 und α_2) exprimiert, wodurch zwei verschiedene Isoformen ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) gebildet werden können. Da die genaue Verteilung der Untereinheiten im Colon nicht bekannt ist, wurden immunhistochemische Färbungen sowie In-situ-Hybridisierungen durchgeführt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von proximalem Colon mit Antikörpern gegen die β_1 -Untereinheit. Die β_1 -Untereinheit wurde sowohl in der glatten Muskelschicht als auch in der Mukosa exprimiert (siehe Abbildung 7A). In der glatten Muskelschicht (siehe Abbildung 7B) war die β_1 -Untereinheit besonders stark im Bereich des myenterischen Plexus sowie in einzelnen Zellen innerhalb der glatten Muskelschicht vorzufinden.

Für die α -Untereinheiten sind bislang keine zuverlässigen Antikörper vorhanden, weshalb Querschnitte von proximalem Colon mittels In-situ-Hybridisierung analysiert wurden. Hierfür wurden Sonden verwendet, die die mRNA der jeweiligen Untereinheit spezifisch erkennen. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung dargestellt. Wie die β_1 -Untereinheit wurden die α -Untereinheiten sowohl in der glatten Muskelschicht als auch im Bereich der Mukosa exprimiert (siehe Abbildung 8 A). Die mRNA der α_1 -Untereinheit (rote Punkte) war in der gesamten glatten Muskelschicht des Colons exprimiert. Die mRNA der α_2 -Untereinheit (blaue Punkte) war dagegen hauptsächlich im Bereich des myenterischen Plexus und vereinzelt in der glatten Muskelschicht vorzufinden (siehe Abbildung 8B). In der Mukosa waren beide Untereinheiten in Zellen der Lamina propria sowie der Submukosa exprimiert (siehe Abbildung 8C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform ubiquitär vorkommt, wohingegen die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform hauptsächlich im myenterischen Plexus und vereinzelt in der glatten Muskelschicht und der Mukosa vorliegt.

4.2. Motilitätsmessungen

4.2.1. Myographiestudien an proximalem Colon

4.2.1.1. Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht in WT- und GCKO-Colon

Colonringe von 2,5 mm Länge wurden in das Organbad eingespannt und entwickelten spontane Kontraktionen. Generell konnten drei unterschiedliche Kontraktionstypen unterschieden werden (Abbildung 9A): (a) Kleine, hochfrequente Kontraktionen,

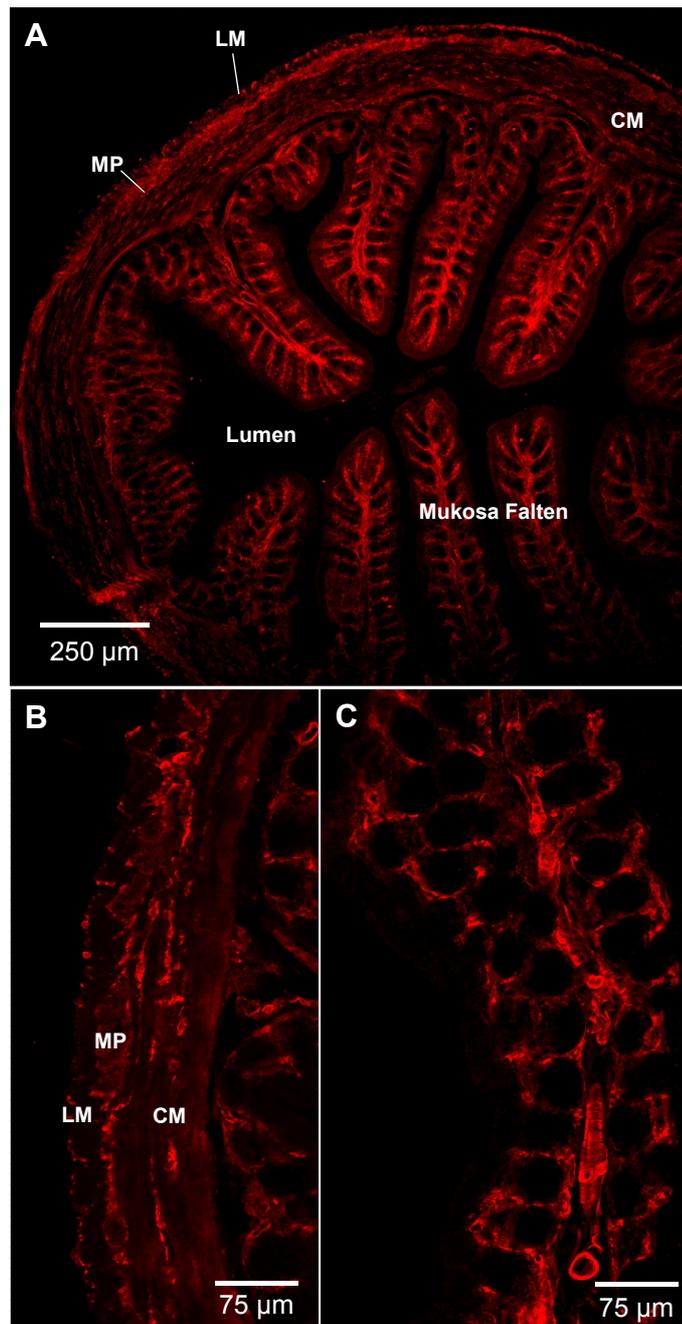


Abbildung 7: Expression der NO-GC β_1 -Untereinheiten in proximalem Colon
 Immunohistochemische Färbung von proximalem Colon unter Verwendung von Antikörpern gegen die NO-GC β_1 -Untereinheiten (rot). Dargestellt ist ein Übersichtsbild (A) sowie detaillierte Aufnahmen der glatten Muskelschicht (B) sowie einer Mukosafalte (C). LM = longitudinale Muskelschicht; CM = zirkuläre Muskelschicht; MP = myenterischer Plexus

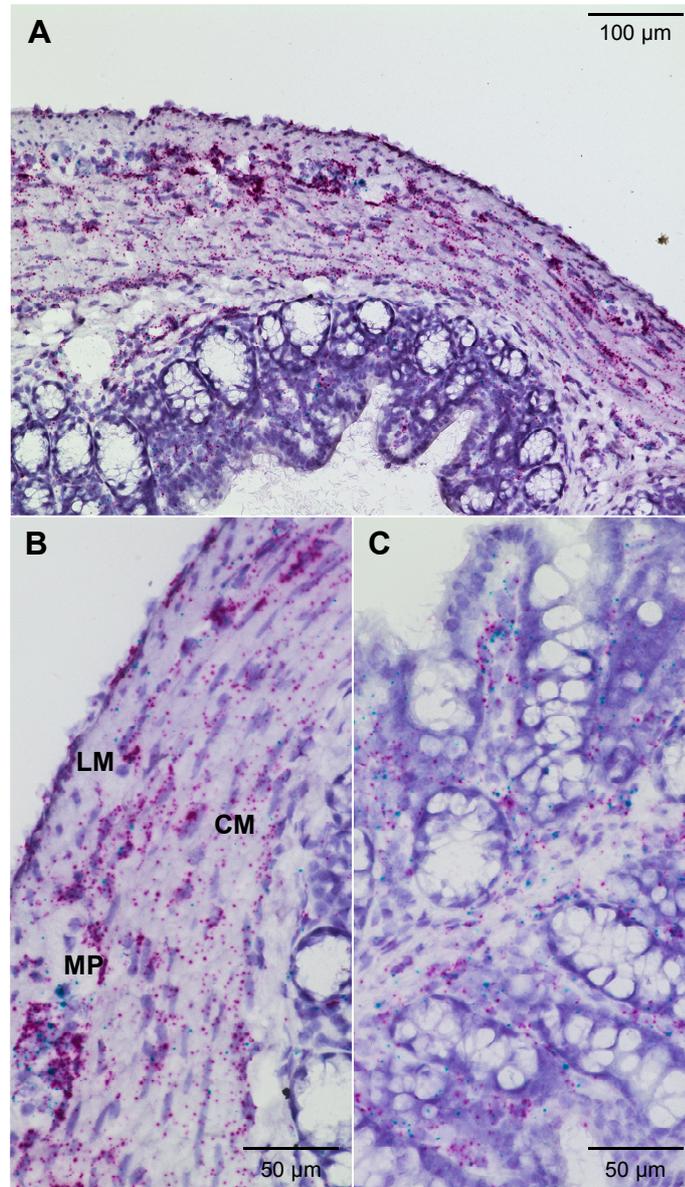


Abbildung 8: Verteilung der NO-GC α -Untereinheiten in proximalem Colon

In-situ-Hybridisierung von WT-Colon-Querschnitten mit Sonden gegen die NO-GC α_1 -Untereinheit (rote Punkte) sowie die NO-GC α_2 -Untereinheit (blaue Punkte). Dargestellt ist ein Übersichtsbild (A) sowie detaillierte Aufnahmen von der glatten Muskulatur (B) sowie einer Mukosafalte (C). LM = longitudinale Muskelschicht; CM = zirkuläre Muskelschicht; MP = myenterischer Plexus

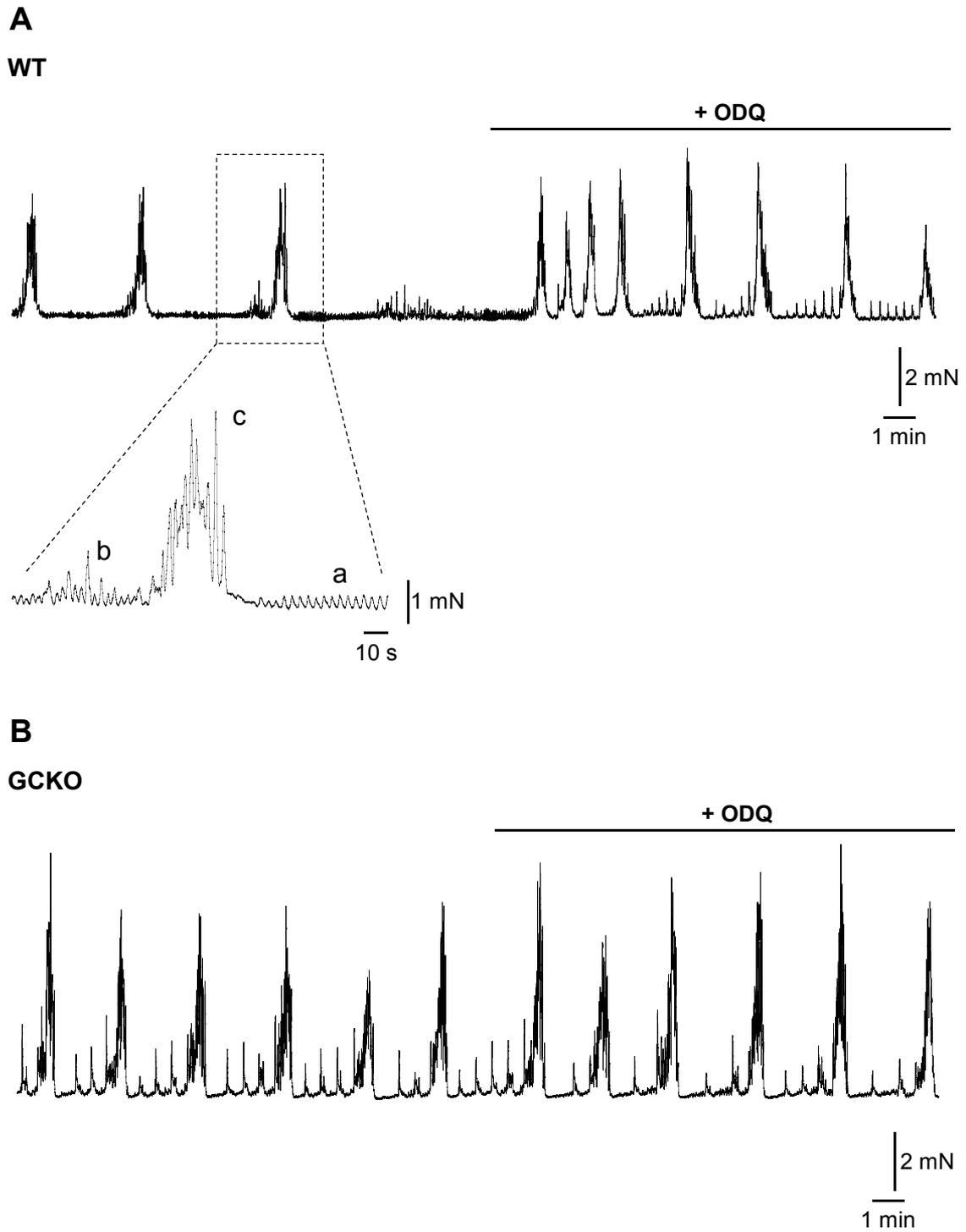


Abbildung 9: Kontraktionsmuster von WT- und GCKO-Colonringen

Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der spontanen Kontraktionen von WT-Colon (A) und GCKO-Colon (B) unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von ODQ (10 μ M). Die Vergrößerung der WT-Spur zeigt die drei unterschiedlichen Kontraktionstypen: a) kleine hochfrequente Ripples, b) mittlere Kontraktionen und c) lang andauernde große Kontraktionen.

sogenannte Ripples, (b) mittlere Kontraktionen mit einer größeren Amplitude und (c) große Kontraktionen, welche über einen längeren Zeitraum andauerten. Die Ripples traten durchgängig mit einer Frequenz von $20,0 \pm 0,5$ Kontraktionen pro Minute (cpm – contractions per minute) und einer Dauer von $2,9 \pm 0,1$ s auf (Tabelle 1). Die mittleren Kontraktionen traten unter Kontrollbedingungen unregelmäßig auf und wurden von den großen Kontraktionen unterbrochen. Aus diesem Grund wurde die Frequenz nur in den Zeiträumen bestimmt, in denen die Kontraktionen kontinuierlich auftraten. Diese Analyse ergab für WT-Colon eine Frequenz von $3,3 \pm 0,3$ cpm mit einer durchschnittlichen Dauer von $4,7 \pm 0,3$ s je Kontraktion (Tabelle 2). Die großen Kontraktionen waren durch eine lange andauernde Kontraktion ($39,4 \pm 3,2$ s) mit überlagerten kurzen Kontraktionen gekennzeichnet. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Kontraktionen variierte zwischen 1,5 und 6 min, weshalb die Frequenz nicht ausgewertet werden konnte und als ‚sporadisch‘ beschrieben wurde (Tabelle 3).

Im Vergleich dazu zeigten Colonringe des globalen NO-GC-Knockouts (GCKO) ein sehr regelmäßiges und organisiertes Kontraktionsmuster (siehe Abbildung 9B). Die Ripples waren mit einer Frequenz von $2,3 \pm 1,8$ cpm und einer Dauer von $2,6 \pm 0,2$ s im Vergleich zum WT unverändert (siehe Tabelle 1). Mittels Immunhistochemie konnten wir keine Expression der NO-GC in ICC-SMP aufzeigen, welche als Schrittmacherzellen für die Ripples angesehen werden (Abbildung 10A; Wang *et al.*, 2014). Weder ODQ (Abbildung 10B und 10C) noch TTX (nicht abgebildet) führten zu einer Beeinflussung der Dauer bzw. Frequenz der Ripples. Demnach scheint die NO-GC nicht in die Generierung bzw. Regulation der Ripples involviert zu sein.

Im Unterschied zu den Ripples führte das Fehlen der NO-GC in GCKO-Colon jedoch zu einem vermehrten Auftreten von mittleren Kontraktionen. Die Kontraktionen waren durchgängig vorhanden mit einer im Vergleich zu WT-Colon erhöhten Dauer von $12,7 \pm 1,6$ s (WT: $4,7 \pm 0,3$ s) und einer verringerten Frequenz von $2,0 \pm 0,1$ cpm (WT: $3,3 \pm 0,3$ cpm; siehe Tabelle 2). Die großen Kontraktionen traten in GCKO-Colon sehr regelmäßig mit einer Frequenz von $0,40 \pm 0,04$ cpm und einer Dauer von $31,4 \pm 2,8$ s auf (siehe Tabelle 3).

Nach der Applikation des spezifischen NO-GC-Inhibitors ODQ glichen die Eigenschaften der Kontraktionen in WT-Colon denen von GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 9A und 9B): Die mittleren Kontraktionen wurden deutlicher, wiesen eine verlängerte Dauer (Kontrollbedingungen: $4,7 \pm 0,3$ s; ODQ: $11,1 \pm 1,3$ s) sowie eine verringerte Frequenz (Kontrollbedingungen: $3,3 \pm 0,3$ cpm; ODQ: $2,5 \pm 0,3$ cpm) auf. Die großen Kontraktionen traten gehäuft auf und die Frequenz glich der von GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen (WT: $0,36 \pm 0,05$ cpm; GCKO:

Tabelle 1: Dauer und Frequenz der Ripples

	Dauer (s)		Frequenz (cpm)	
	Kontrolle	+ ODQ (10 µM)	Kontrolle	+ ODQ (10 µM)
WT	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,2	19,8 ± 0,5	20,3 ± 1,2
GCKO	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,2	23,3 ± 1,8	21,8 ± 1,7
SMC-GCKO	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2	20,3 ± 0,9	19,3 ± 0,5
ICC-GCKO	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,1	20,8 ± 1,4	20,3 ± 0,5
SMC/ICC-GCKO	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,2	19,0 ± 0,7	18,0 ± 0,9

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 4 Tieren.

Tabelle 2: Dauer und Frequenz der mittleren Kontraktionen

	Dauer (s)			Frequenz (cpm)		
	Kontrolle	ODQ (10 µM)	TTX (1 µM)	Kontrolle	ODQ (10 µM)	TTX (1 µM)
WT	4,7 ± 0,3	11,0 ± 1,3**	15,1 ± 2,0**	3,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,2
GCKO	12,7 ± 1,6††	13,0 ± 2,1	16,1 ± 1,2	2,0 ± 0,1††	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1
SMC-GCKO	6,7 ± 1,2	11,0 ± 1,9*	20,1 ± 3,4*	2,9 ± 0,3	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2*
ICC-GCKO	7,6 ± 1,6	11,4 ± 1,0*	11,8 ± 2,0*	3,1 ± 0,5	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,3
SMC/ICC-GCKO	14,5 ± 3,0†	13,4 ± 2,5	16,9 ± 2,3	1,8 ± 0,2††	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,3

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5-6 Tieren.

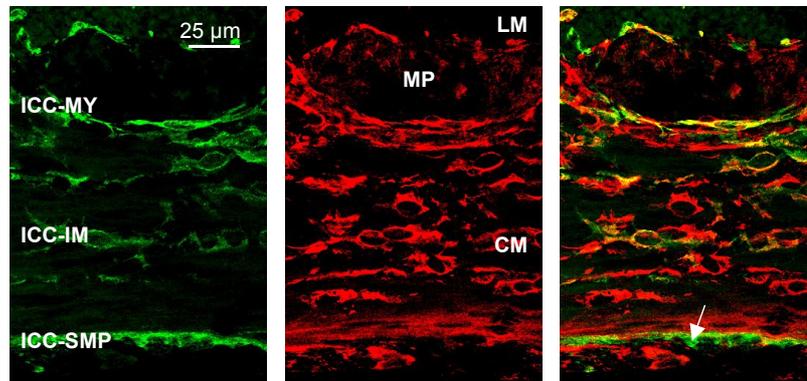
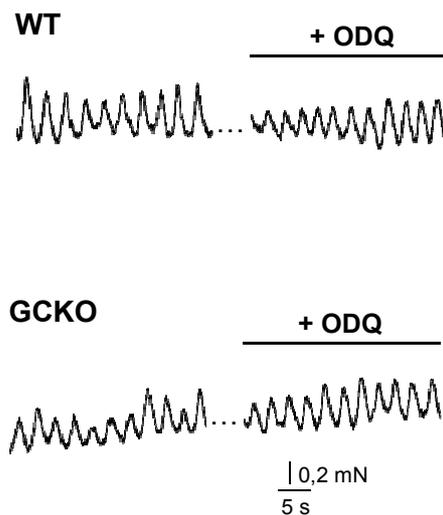
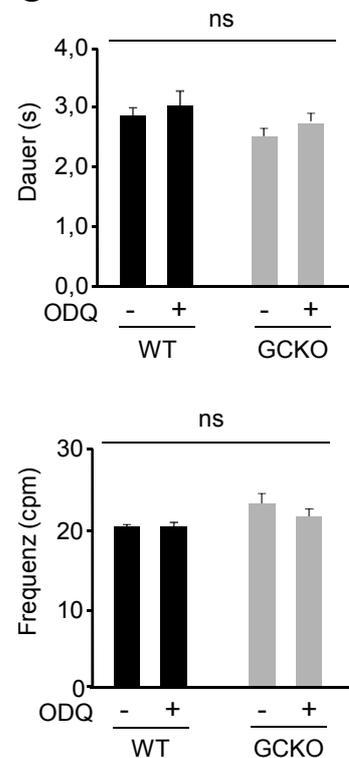
† = P<0,05; †† = P<0,01 verglichen mit WT

* = P<0,05; ** = P<0,01 verglichen mit Kontrollbedingungen

Tabelle 3: Dauer und Frequenz der großen Kontraktionen

	Dauer (s)		Frequenz (cpm)	
	Kontrolle	+ ODQ (10 µM)	Kontrolle	+ ODQ (10 µM)
WT	39,4 ± 3,2	34,7 ± 2,2	sporadisch	0,36 ± 0,05
GCKO	31,4 ± 2,8	30,9 ± 1,9	0,40 ± 0,04	0,37 ± 0,01
SMC-GCKO	34,7 ± 2,1	36,5 ± 1,7	sporadisch	sporadisch
ICC-GCKO	34,9 ± 3,4	31,9 ± 1,6	sporadisch	0,43 ± 0,05
SMC/ICC-GCKO	32,8 ± 0,8	35,5 ± 1,6	0,48 ± 0,14	0,45 ± 0,11

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 4-6 Tieren.

A**B****C****Abbildung 10: Detaillierte Analyse der Ripples**

(A) Immunhistochemische Färbung des submukosalen Plexus mittels Antikörper gegen NO-GC (rot) und cKit (grün). CM = zirkuläre Muskelschicht; ICC-IM = ICC innerhalb der glatten Muskelschicht; ICC-MY = ICC des myenterischen Plexus; ICC-SMP = ICC des submukosalen Plexus; LM = longitudinale Muskelschicht; MP = myenterischer Plexus; Pfeil markiert ICC-SMP, die keine NO-GC exprimieren. (B) Originalspuren der Ripples von WT- und GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von ODQ (10 μ M). (C) Statistische Analyse von Frequenz und Dauer der Ripples vor und nach der Zugabe von ODQ. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von n = 4 pro Genotyp (ns = nicht signifikant).

0,40 ± 0,04 cpm). Im Gegensatz dazu blieb das Kontraktionsmuster des GCKO-Colon unverändert (siehe Abbildung 9; Tabelle 2 und 3).

Anschließend wurde der Effekt der neuronalen NO-Produktion auf die spontanen Kontraktionen mithilfe des nNOS-Inhibitors L-NAME evaluiert. L-NAME hatte die gleichen Auswirkungen auf die spontanen Kontraktionen von WT-Colon wie es zuvor mit ODQ beobachtet wurde (Abbildung 11): Die mittleren Kontraktionen waren prominenter und wiesen im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine verlängerte Dauer (Kontrollbedingungen: 4,7 ± 0,3 s; L-NAME: 15,5 ± 2,9 s) sowie eine verringerte Frequenz (Kontrollbedingungen: 3,3 ± 0,3 cpm; L-NAME: 2,1 ± 0,3 cpm) auf (Tabelle 4). Die großen Kontraktionen entstanden ebenfalls vermehrt mit einer Frequenz von 0,40 ± 0,04 cpm (Tabelle 5). Die spontanen Kontraktionen von GCKO-Colon zeigten wie erwartet keine Veränderung. Diese Ergebnisse zeigen, dass basal gebildetes NO im Colon der Maus sowohl die mittleren als auch die großen Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht moduliert.

Tabelle 4: Effekt von L-NAME auf mittlere Kontraktionen in WT und GCKO

	Mittlere Kontraktionen			
	Dauer (s)		Frequenz (cpm)	
	Kontrolle	L-NAME (200 µM)	Kontrolle	L-NAME (200 µM)
WT	5,6 ± 0,6	15,5 ± 2,9 **	3,4 ± 0,1	2,1 ± 0,3 *
GCKO	13,9 ± 2,1 ††	14,9 ± 0,7	1,9 ± 0,2†††	1,7 ± 0,2

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 Tieren.

† = P<0,05; ††† = P<0,001 verglichen mit WT

* = P<0,05; ** = P<0,01 verglichen mit Kontrollbedingungen

Tabelle 5: Effekt von L-NAME auf große Kontraktionen in WT und GCKO

	Große Kontraktionen			
	Dauer (s)		Frequenz (cpm)	
	Kontrolle	L-NAME (200 µM)	Kontrolle	L-NAME (200 µM)
WT	29,4 ± 4,0	30,2 ± 4,5	sporadisch	0,4 ± 0,04
GCKO	27,1 ± 1,1	27,0 ± 1,7	0,5 ± 0,09	0,5 ± 0,08

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 Tieren.

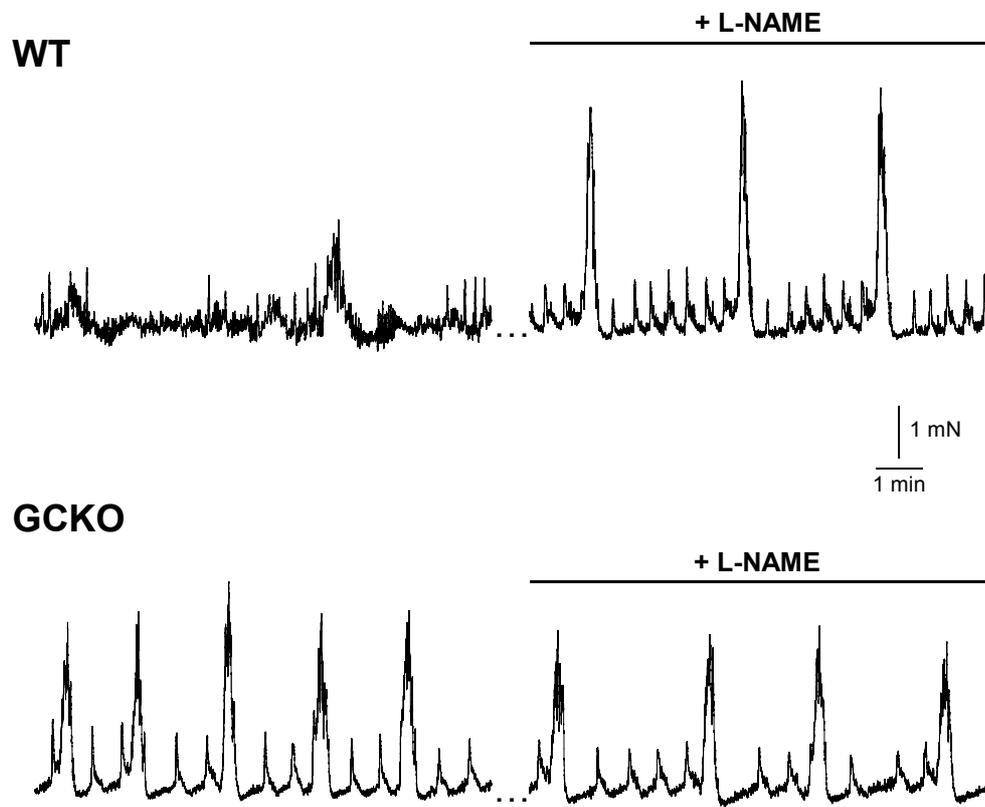


Abbildung 11: Effekt von L-NAME auf spontane Kontraktionen

Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der spontanen Kontraktionen von WT- und GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von L-NAME (200 μ M).

4.2.1.2. Kontraktionsmuster der zirkulären Muskelschicht von zellspezifischen Knockout-Mäusen

Um die spezifische Beteiligung der NO-GC in ICC und SMC an der Modulation der mittleren und großen Kontraktionen zu evaluieren, wurden Colonringe von Knockout-Mäusen, denen die NO-GC spezifisch in ICC, SMC oder in beiden Zelltypen fehlt, in das Organbad eingespannt. Frequenz und Dauer der Ripples aller zellspezifischen Knockout-Mäuse unterschieden sich nicht von denen in WT- und GCKO-Colon (siehe Tabelle 1), weshalb auf diese nicht näher eingegangen wurde. Ein detaillierter Vergleich der mittleren und großen Kontraktionen zwischen den Genotypen erfolgt separat in den Abschnitten 4.2.1.3. und 4.2.1.4.

Evaluation des SMC-GCKO

Zunächst sollte die Deletion der NO-GC in SMC-GCKO nachgewiesen werden. Der Nachweis der NO-GC in SMC war mittels Immunhistochemie nicht möglich, da die verhältnismäßig starke Expression der NO-GC in ICC und FLC die Darstellung in den SMC erschwerte. Aus diesem Grund wurde die In-situ-Hybridisierung angewendet, um die Deletion der NO-GC auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Querschnitte von Colongewebe von WT und SMC-GCKO wurden mit Sonden, welche die β_1 -Untereinheit bzw. die α_2 -Untereinheit der NO-GC spezifisch erkennen, inkubiert. In Bezug auf die Evaluierung der Deletionseffizienz wird im Folgenden nur auf die β_1 -Untereinheit der NO-GC eingegangen. Diese war im WT in der gesamten Muskelschicht gleichmäßig exprimiert (rote Punkte; Abbildung 12A). Im Gegensatz dazu wies die Muskelschicht des SMC-GCKO eine stark verminderte Expression der β_1 -Untereinheit auf. Die verminderte Expression der NO-GC-mRNA in SMC-GCKO-Colon deutet demnach auf eine effektive Deletion des Exon 10 im Gen der NO-GC β_1 -Untereinheit in SMC und einen daraus resultierenden Verlust der funktionellen NO-GC hin. Das Kontraktionsmuster von SMC-GCKO-Colon glich dem von WT-Colon (Abbildung 12B). Die mittleren Kontraktionen wiesen eine Dauer von $6,7 \pm 1,2$ s sowie eine Frequenz von $2,9 \pm 0,3$ cpm auf (siehe Tabelle 2). Die großen Kontraktionen hatten eine Dauer von $34,7 \pm 2,1$ s (siehe Tabelle 3) und traten ebenfalls sporadisch auf. Der Abstand zwischen den einzelnen Kontraktionen variierte von 1,0 min bis 7,0 min.

Evaluation des ICC-GCKO

Die Deletion der NO-GC in ICC wurde mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Hierfür wurden Antikörper gegen NO-GC (rot) und die Tyrosinkinase cKit (grün) verwendet. Abbildung 13A zeigt den mit Antikörpern gefärbten myenterischen Plexus von WT- und ICC-GCKO-Colon. Im WT-Gewebe war eine eindeutige Kolo-kalisation der Antikörper gegen cKit und NO-GC zu erkennen (gelbe Farbe). Die durch Tamoxifen induzierte

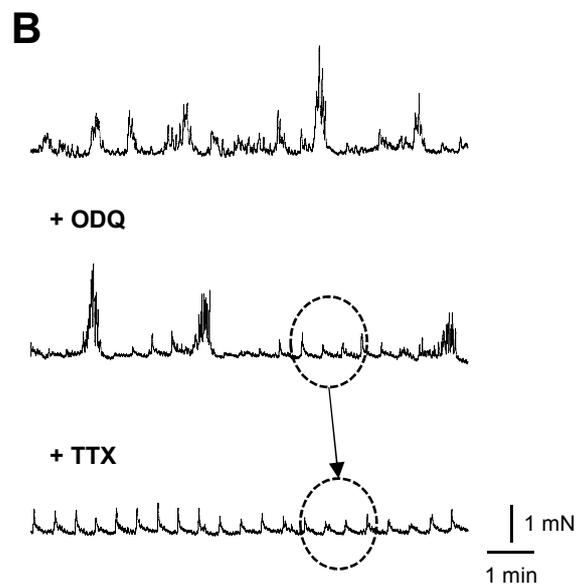
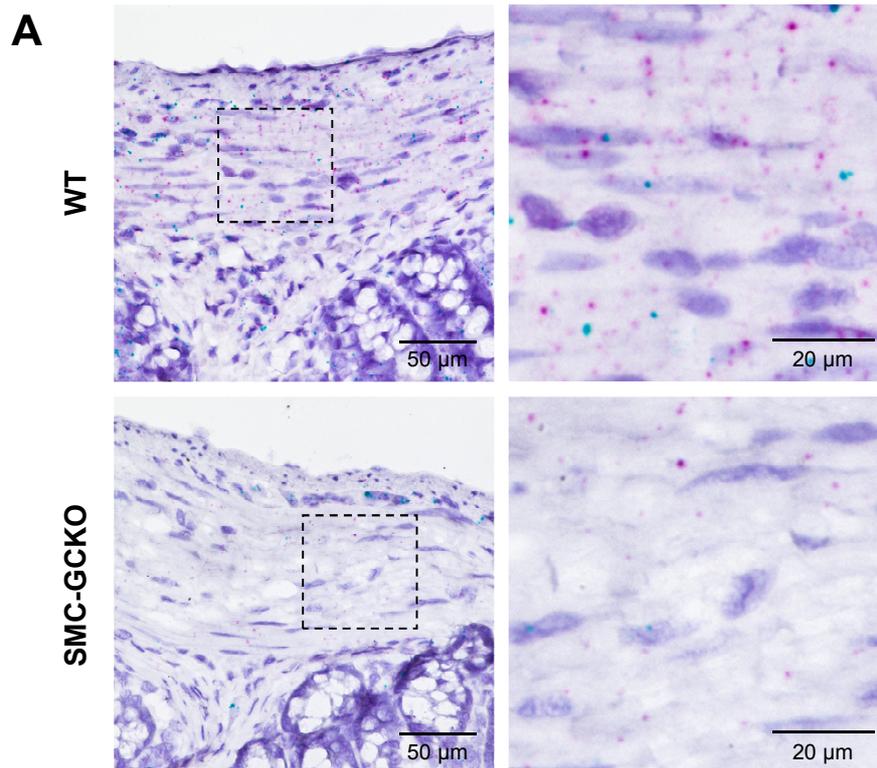
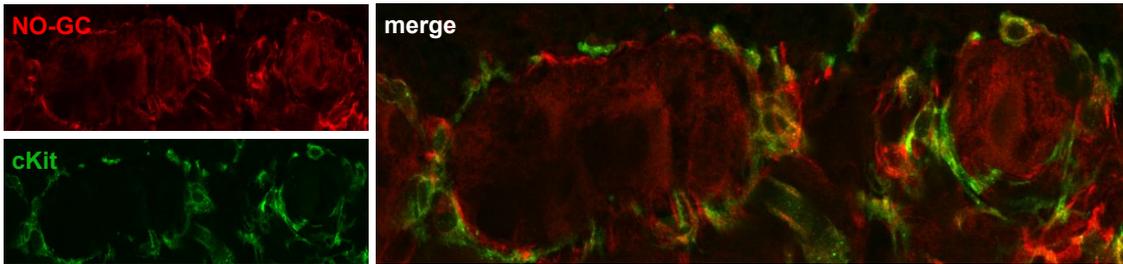


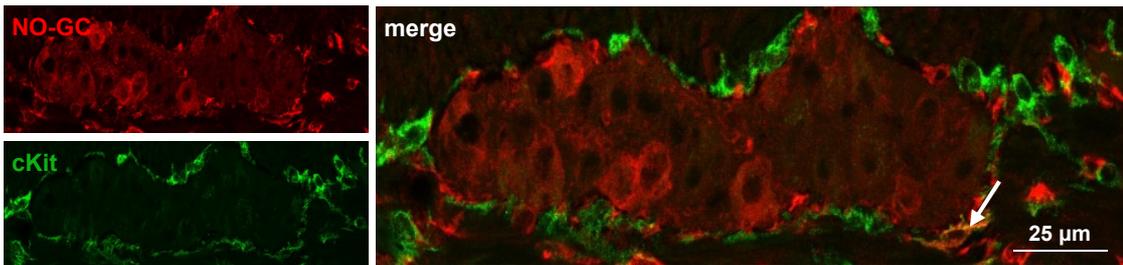
Abbildung 12: Evaluation von SMC-GCKO-Colon

(A) in-situ-Hybridisierung von Querschnitten von WT- und SMC-GCKO-Colon. Die NO-GC wurde durch Sonden, welche die mRNA der β_1 -Untereinheit (rote Punkte) sowie die mRNA der α_2 -Untereinheit (blaue Punkte) der NO-GC spezifisch erkennen, sichtbar gemacht. Einzelne Punkte markieren einzelne mRNA-Moleküle. Gestrichelte Rahmen markieren den Vergrößerungsausschnitt (Bilder rechts). (B) Repräsentative Originalaufnahmen der Kontraktionsmuster von SMC-GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von ODQ (10 μ M) und TTX (1 μ M). Gestrichelte Ovale verdeutlichen die identische Form der mittleren Kontraktionen in der Anwesenheit von ODQ und TTX.

A
WT



ICC-GCKO



Wiedergabe aus „Nitroergic signaling via interstitial cells of Cajal regulates motor activity in murine colon“; Lies B, Beck K, Keppler J, Saur D, Groneberg D, Friebe A; *J Physiol*. (2015) mit Genehmigung von WILEY.

B

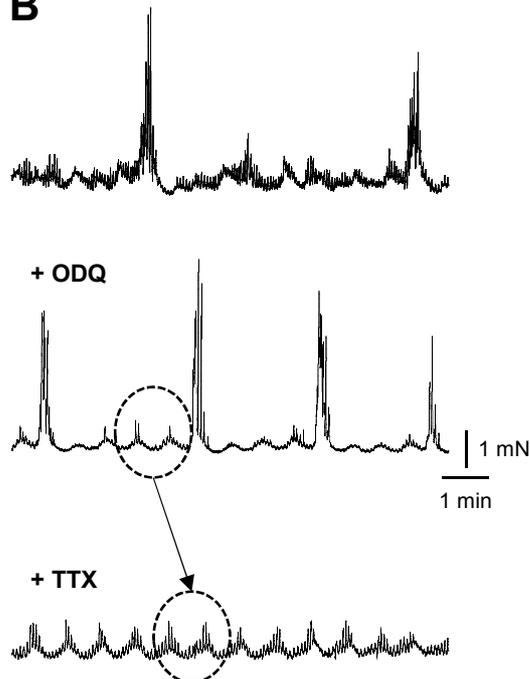


Abbildung 13: Evaluation von ICC-GCKO-Colon

(A) Immunhistochemische Färbung des myenterischen Plexus von WT- und ICC-GCKO-Colon. Es wurden Antikörper gegen NO-GC (rot) und cKit (grün) verwendet. Gelbe Signale zeigen die Kolokalisation der beiden Signale. Weißer Pfeil markiert eine einzelne cKit-positive Zelle, die trotz induzierter Deletion noch eine NO-GC-Expression aufweist. (B) Repräsentative Originalaufnahmen der Kontraktionen von ICC-GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von ODQ (10 μ M) und TTX (1 μ M). Gestrichelte Ovale verdeutlichen die identische Form der mittleren Kontraktionen in der Anwesenheit von ODQ und TTX.

Exzision des Exon 10 in ICC-GCKO-Gewebe führte zu einem fast vollständig fehlenden NO-GC-Signal in cKit-positiven Zellen. Lediglich eine Zelle zeigte eine Kolo-kalisation von NO-GC und cKit (weißer Pfeil, siehe Abbildung 13A). Die Auszählung der NO-GC-exprimierenden, cKit-positiven Zellen in ICC-GCKO-Colon ergab eine Ausschnittrate von 97 %.

Das Kontraktionsmuster der ICC-GCKO-Colonringe glich dem des WT (Abbildung 13B). Die mittleren Kontraktionen wiesen eine Dauer von $7,6 \pm 1,6$ s sowie eine Frequenz von $3,1 \pm 0,5$ cpm auf (siehe Tabelle 2). Wie im WT traten die großen Kontraktionen sporadisch und unregelmäßig mit einer Dauer von $34,9 \pm 3,4$ s auf (siehe Tabelle 3). Die Zeitspanne zwischen den einzelnen Kontraktionen erstreckte sich von 1,0 bis 6,0 min.

Evaluation des SMC/ICC-GCKO

Die Kreuzung von ICC-GCKO- und SMC-GCKO-Tieren führte zu Mäusen, denen die NO-GC spezifisch in SMC und ICC fehlte (SMC/ICC-GCKO). Abbildung 14A zeigt das typische Kontraktionsmuster des SMC/ICC-GCKO. Interessanterweise ähnelt dieses Kontraktionsmuster dem des GCKO (Abbildung 14B): Die mittleren Kontraktionen traten mit einer Dauer von $14,5 \pm 3,0$ s und einer Frequenz von $1,8 \pm 0,2$ cpm auf (siehe Tabelle 2). Die großen Kontraktionen zeigten eine Frequenz von $0,48 \pm 0,14$ cpm und eine Dauer von $32,8 \pm 0,8$ s (siehe Tabelle 3).

4.2.1.3. Detaillierte Analyse der mittleren Kontraktionen

Im Anschluss daran wurden die mittleren Kontraktionen im Detail analysiert. Die mittleren Kontraktionen in WT-Colon wiesen eine durchschnittliche Dauer von $4,7 \pm 0,3$ s. Während die Dauer der Kontraktionen in SMC-GCKO- und ICC-GCKO-Colon den Messwerten von WT-Colon ähnelte ($6,7 \pm 1,2$ s bzw. $7,6 \pm 1,6$ s), waren die mittleren Kontraktionen in SMC/ICC-GCKO und GCKO Colon signifikant verlängert (siehe Tabelle 2).

Inhibition der NO-GC durch ODQ führte zu mittleren Kontraktionen, die in allen Mauslinien identischen waren (Dauer ca. 12 s; Frequenz ca. 2,2 cpm; siehe Tabelle 2). Lediglich die Dauer und Frequenz der mittleren Kontraktionen von GCKO- und SMC/ICC-GCKO-Colon blieb unverändert. Demzufolge ist die Dauer der mittleren Kontraktionen durch eine simultane Aktivität der NO-GC in SMC und ICC beeinflusst, was in einer Erhöhung der Frequenz und einer verkürzten Dauer resultiert.

Nach der Zugabe von TTX (Abbildung 12B, 13B, 14A und B) traten die mittleren Kontraktionen weiterhin auf und Frequenz und Dauer der Kontraktionen zeigten die gleichen Veränderung wie in Anwesenheit von ODQ (siehe Tabelle 2). Diese Ergebnisse zeigen, dass die mittleren Kontraktionen myogenen Ursprungs sind und durch neuronal ausgeschüttete Transmitter moduliert werden.

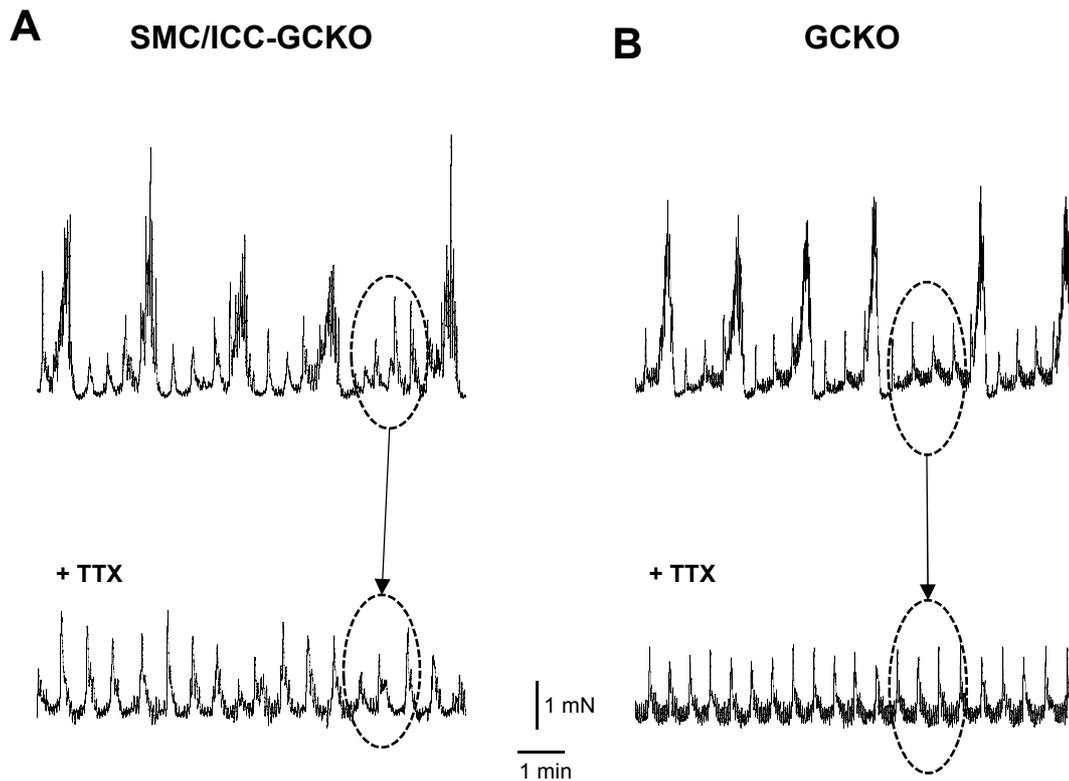


Abbildung 14: Kontraktionsmuster von SMC/ICC-GCKO- und GCKO-Colon
 Repräsentative Spuren von SMC/ICC-GCKO- (A) und GCKO-Colon (B) unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von TTX (1 μ M). Gestrichelte Ovale verdeutlichen die identische Form der mittleren Kontraktionen unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von TTX.

4.2.1.4. Detaillierte Analyse der großen Kontraktionen

Die großen Kontraktionen wurden entsprechend der mittleren Kontraktionen ausgewertet. In WT-Colon wiesen die großen Kontraktionen eine durchschnittliche Dauer von $39,4 \pm 3,2$ s auf (siehe Tabelle 3). Die Dauer der großen Kontraktionen in den übrigen Knockout-Mauslinien war identisch. Im Hinblick auf die Frequenz konnten zwei Muster unterschieden werden: In WT-, SMC-GCKO- und ICC-GCKO-Colonringen traten die großen Kontraktionen sporadisch auf (siehe Tabelle 3). Im Gegensatz dazu traten die großen Kontraktionen in GCKO- und SMC/ICC-GCKO-Colon regelmäßig auf, die Frequenz betrug ca. 0,5 cpm. In Anwesenheit von ODQ glichen Frequenz von WT- und ICC-GCKO-Kontraktionen der von GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen. Lediglich in SMC-GCKO-Präparationen blieb das sporadische Muster der großen Kontraktionen erhalten. Eine Erklärung hierfür konnte bislang jedoch noch nicht gefunden werden. Dennoch kann anhand der Ergebnisse des SMC/ICC-GCKO- sowie GCKO-Colon auf die Wichtigkeit des inhibitorischen Einfluss der NO-GC in beiden Zelltypen auf die zyklische Motoraktivität geschlossen werden.

TTX unterdrückte die großen Kontraktionen in allen Genotypen (Abbildung 12B, 13B, 14A und B), was deren neurogenen Ursprung zeigt.

4.4.1.5. Pharmakologische Aktivierung der NO-GC und deren Effekte auf den Muskeltonus

Im Folgenden wurde die Auswirkung einer akuten NO-GC-Aktivierung auf die Colon-Kontraktilität evaluiert. Der radikalische NO-Donor DEA-NO führte in WT-Colonringen zur Unterdrückung der mittleren und großen Kontraktionen sowie zu einer Reduktion des Muskeltonus ($90,0 \pm 4,8$ % der maximalen durch IBMX induzierten Relaxation; Abbildungen 15A und B). Im Gegensatz dazu blieben sowohl die spontanen Kontraktionen als auch der Muskeltonus in GCKO-Colon nach NO-Gabe unverändert. ICC-GCKO-Colonringe glichen denen des WT; auch hier wurden die spontanen Kontraktionen durch DEA-NO unterdrückt und der Muskeltonus vermindert ($89,0 \pm 11,2$ %). In SMC-GCKO-Gewebe wurden zwar die spontanen Kontraktionen durch DEA-NO unterdrückt, allerdings blieb der Muskeltonus unbeeinflusst.

Umgekehrt führte die Inhibition der NO-GC durch ODQ zu einem Anstieg des Muskeltonus in WT- und ICC-GCKO-Präparationen ($75,0 \pm 18,8$ % bzw. $84,0 \pm 24,7$ %), wohingegen der Muskeltonus in GCKO- und SMC-GCKO-Colon unverändert blieb (Abbildung 16A und B). Colonringe des SMC/ICC-GCKO zeigten die gleichen Effekte wie SMC-GCKO-Colon (nicht abgebildet). Diese Ergebnisse zeigen die spezifische nitrerge Regulation des Muskeltonus über die NO-GC in SMC.

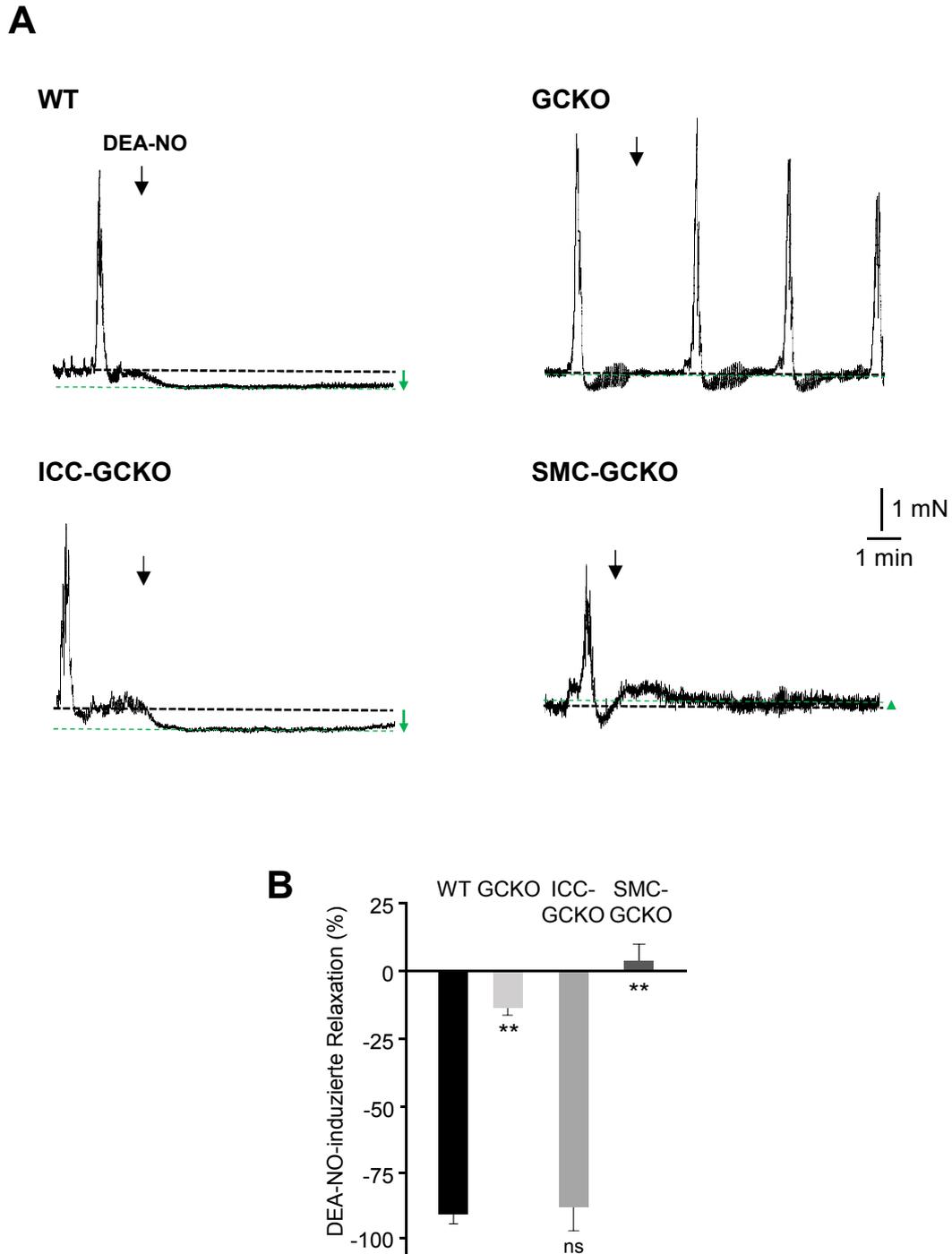


Abbildung 15: Effekt des NO-Donors DEA-NO auf die zirkuläre Muskelschicht
 (A) Effekt von DEA-NO (10 μ M) auf proximale Colonringe von WT, GCKO, SMC-GCKO und ICC-GCKO. Schwarze Pfeile markieren den Zeitpunkt der DEA-NO-Gabe; schwarze gestrichelte Linien den Ruhetonus; grüne gestrichelte Linien den Tonus nach DEA-NO-Gabe; grüne Pfeile verdeutlichen die relative Tonusänderung. (B) Statistische Analyse des Muskeltonus nach der Zugabe von DEA-NO (10 μ M). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ pro Genotyp (ns = nicht signifikant, ** $P < 0.01$ verglichen mit WT).

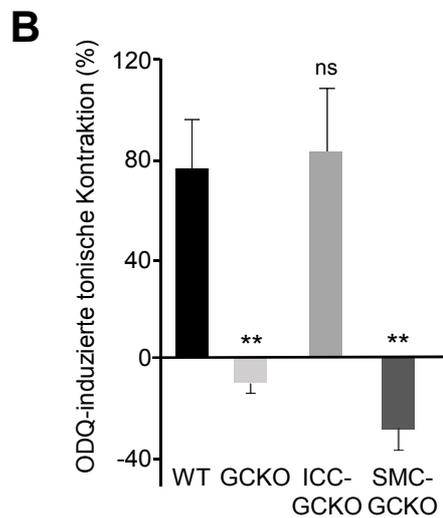
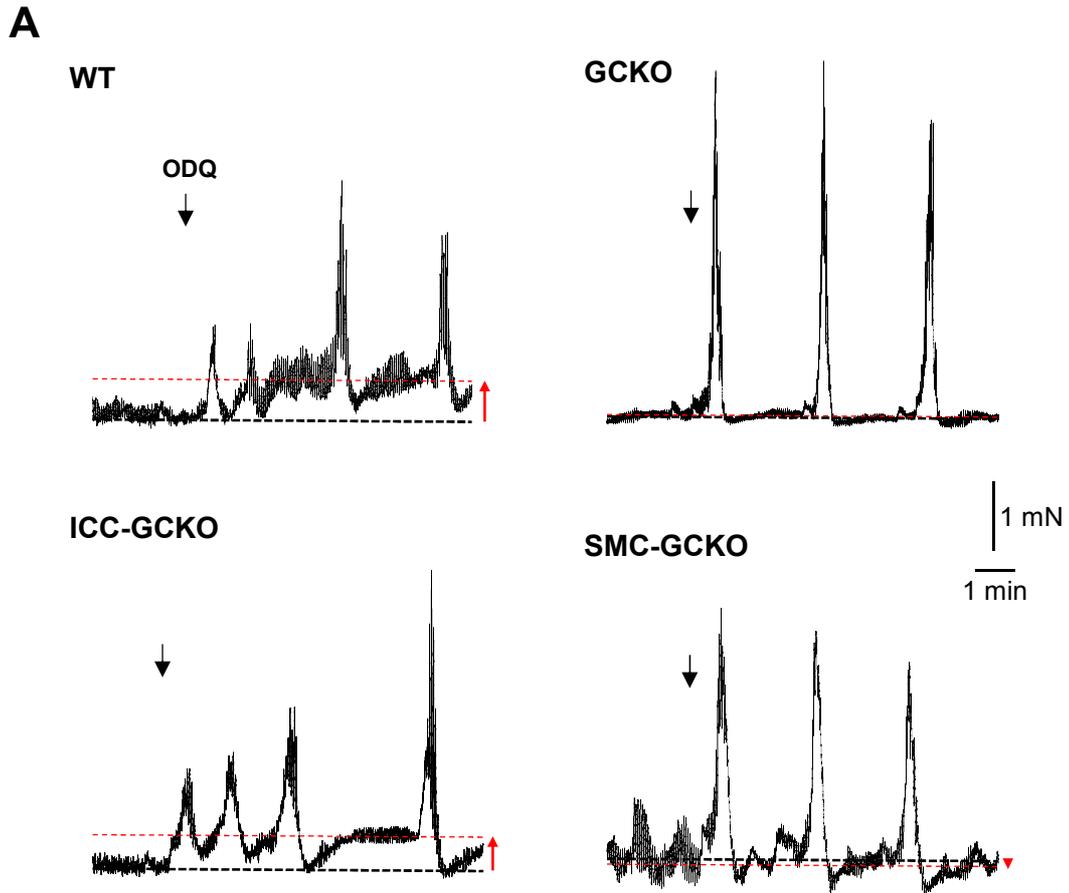


Abbildung 16: Effekt von ODQ auf den Muskeltonus

(A) Effekt von ODQ (10 μ M) auf proximale Colonringe von WT, GCKO, SMC-GCKO und ICC-GCKO. Schwarze Pfeile markieren den Zeitpunkt der ODQ-Gabe; schwarz gestrichelte Linien markieren den Ruhetonus; rot gestrichelte Linien den Tonus nach ODQ-Gabe; rote Pfeile verdeutlichen die relative Tonusänderung. (B) Statistische Analyse des Muskeltonus nach NO-GC-Inhibierung durch ODQ (10 μ M). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ pro Genotyp (ns = nicht signifikant, ** $P < 0.01$ verglichen mit WT).

4.2.2. Analyse der Colonmotilität mithilfe von Kontraktionsmusterkarten

4.2.2.1. Charakteristika der Kontraktionsmusterkarten unter Kontrollbedingungen

In den vorangegangenen Untersuchungen wurden die spontanen Kontraktionen von kleinen Colonringen in Hinblick auf Dauer und Frequenz untersucht. Da es sich bei einem Teil dieser Kontraktionen um fortpflanzende Kontraktionen handelte, wurden im Folgenden die Bewegungsabläufe des gesamten Colons mithilfe von Kontraktionsmusterkarten analysiert. Hierfür wurde das gesamte Colon in einem Organbad fixiert und die Bewegungen des Darms mit einer Kamera aufgenommen. Die Videoaufnahmen wurden anschließend in Kontraktionsmusterkarten konvertiert. Abbildung 17A zeigt eine repräsentative Karte eines WT-Colons. In den Karten war der Durchmesser entlang der Länge des Colons (y-Achse) über der Zeit (x-Achse) aufgetragen. Die Skalierung erfolgte anhand der Grautöne: Eine weiße Färbung signalisierte einen großen Durchmesser, das heißt eine Relaxation; eine schwarze Färbung einen kleinen Durchmesser, das heißt eine Kontraktion. Da die Grautöne nicht auf einen definierten Durchmesser normiert waren, konnten sie nicht zum direkten Vergleich des absoluten Durchmessers herangezogen werden. Diese Kontraktionsmusterkarten eignen sich besonders zur Analyse der ‚long distance contractions‘ (LDC). Diese Kontraktionen sind Teil des ‚colonic migrating motor complex‘ (CMMC) und nach ihrer Eigenschaft benannt, sich über mindestens zwei Drittel des Colons fortzupflanzen. In WT-Colon waren diese Kontraktionen durch eine initiale Relaxationsphase (Abbildung 17A – „1“) und eine propulsive Kontraktionsphase (Abbildung 17A – „2“) charakterisiert. Nach der Kontraktionsphase entspannte sich das Colon, bis eine neue Relaxationsphase initiiert wurde. Die LDC begannen im proximalen Teil und pflanzten sich entlang der gesamten Länge des Colons fort; die Frequenz betrug $0,43 \pm 0,03$ cpm (Abbildung 17A und 18A). Während des gesamten Experiments wurde das Colon kontinuierlich mit einer Pufferlösung durchspült. Die Aufzeichnung der Ausflusstropfen (Abbildung 17; Pfeilspitzen) ermöglichte eine Korrelation des Ausflusses mit den LDC, wodurch Rückschlüsse auf die Effektivität der einzelnen Kontraktionen gezogen werden konnten. In WT-Präparationen führten $94,1 \pm 4,0$ % der Kontraktionen zu einem Austritt von Flüssigkeit (Abbildung 18B).

In GCKO-Colon traten die LDC, verglichen mit WT, mit einer erhöhten Frequenz von $0,69 \pm 0,04$ cpm auf (siehe Abbildung 17B und 18A). Im Vergleich zu WT-Colon konnten jedoch keine klaren Phasen definiert werden. Vielmehr schienen die glatten Muskelschichten des Colons in einem definierten Zeitfenster segmentiert zu kontrahieren: Die Kontraktionen wanderten lediglich über kurze Distanzen und waren besonders im proximalen Teil von stetig relaxierten Bereichen unterbrochen. Zudem

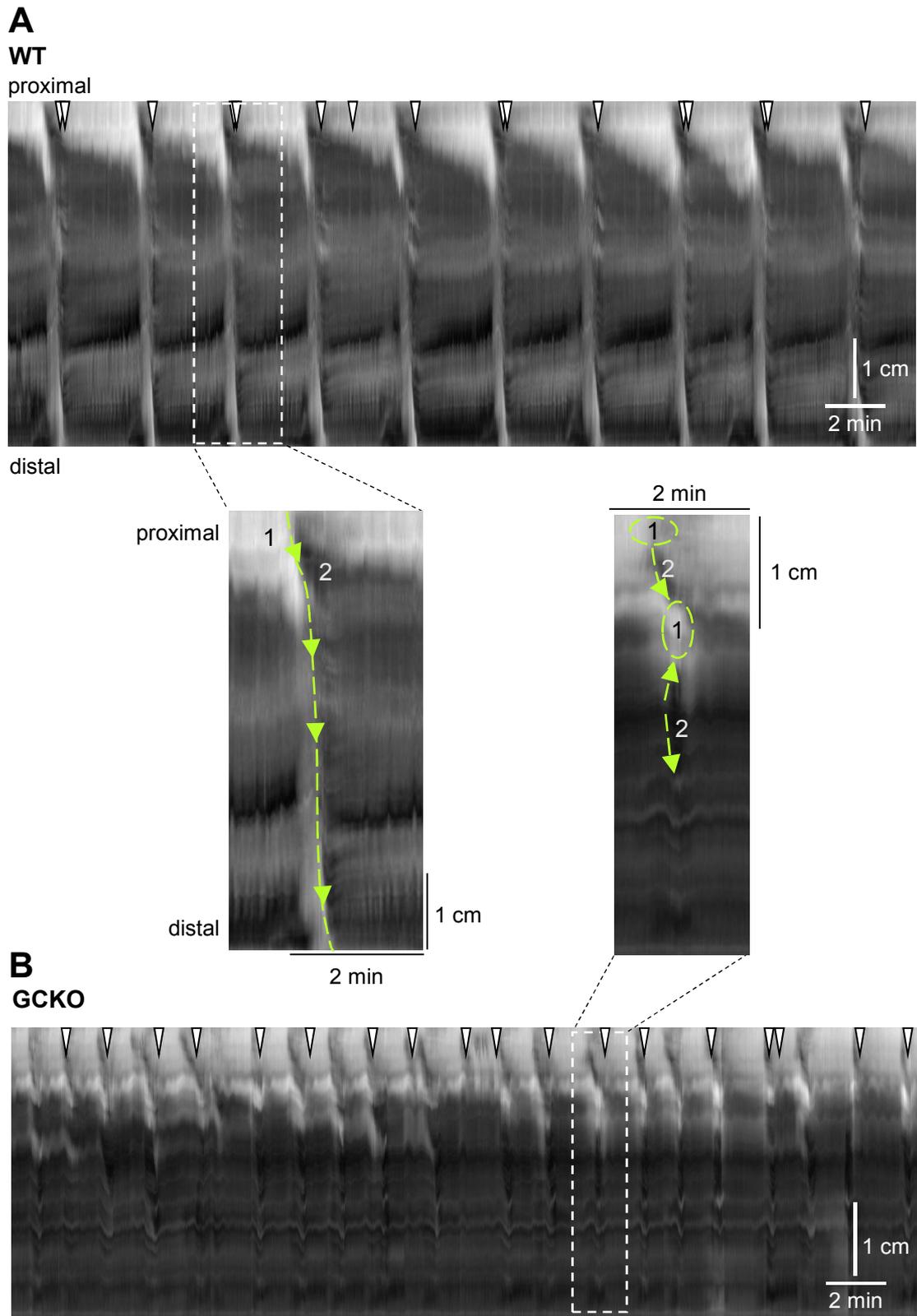


Abbildung 17: Kontraktionsmusterkarten von WT- und GCKO-Colon
Repräsentative Kontraktionsmusterkarten von WT (A) und GCKO (B) ‚whole colon‘-Präparationen. Skalierung des Durchmessers erfolgt anhand der Grautöne, wobei Weiß eine Relaxation (1) und Schwarz eine Kontraktion (2) signalisiert. Die weißen Pfeilspitzen markieren den Zeitpunkt eines Ausflusstropfens.

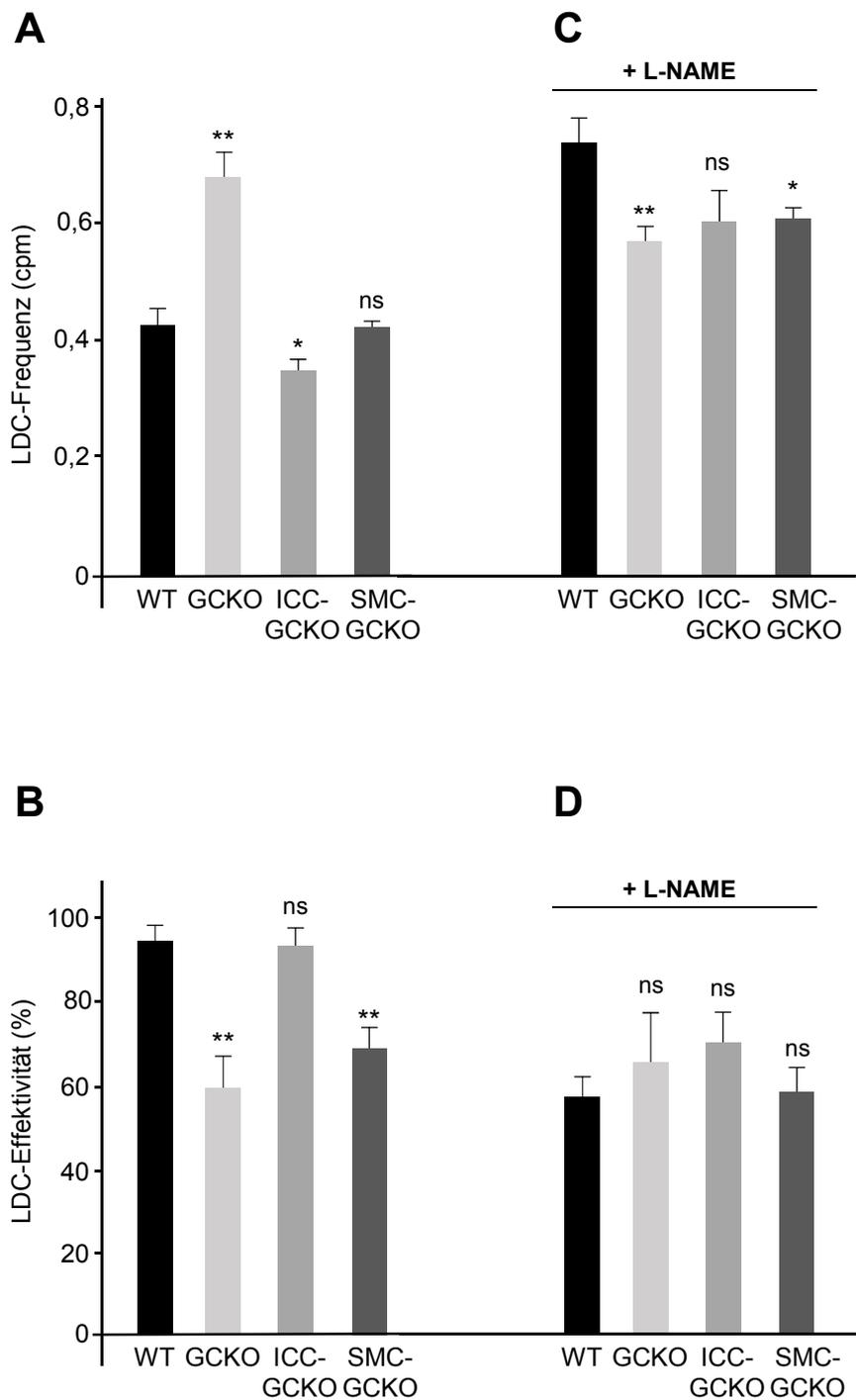


Abbildung 18: Frequenz- und Effektivitätsanalyse der LDC

Graphen zeigen statistische Analyse der Frequenz sowie der Effektivität der LDC von WT-, GCKO-, SMC-GCKO- und ICC-GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen (A/B) sowie in der Anwesenheit von 200 μ M L-NAME (C/D). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von n = 6 pro Genotyp (ns = nicht signifikant; * = P<0,05; **P<0.01 verglichen mit WT).

finden sich gehäuft retrograd gerichtete Kontraktionen (siehe Abbildung 17 – grüne Pfeile). Die Analyse der Ausflusstropfen zeigte eine verringerte Effektivität im Vergleich zu WT-Colon: Lediglich $59,0 \pm 7,5$ % der Kontraktionen hatten einen Ausfluss zur Folge (siehe Abbildung 18B).

Anschließend wurden die zellspezifischen Knockout-Tiere untersucht. In SMC-GCKO-Colon war die Frequenz der LDC verglichen mit WT-Colon unverändert ($0,43 \pm 0,01$ cpm; Abbildung 19A und 18A). Jedoch war die Effektivität der Kontraktionen von SMC-GCKO-Colon beeinträchtigt: Durchschnittlich führten nur $68,5 \pm 4,9$ % der Kontraktionen zu einem Ausfluss (siehe Abbildung 18B). Im Gegensatz zu GCKO-Colon waren die Ausflusstropfen jedoch auf einzelne Kontraktionen konzentriert (siehe Abbildung 19A – grün gestrichelte Ovale). Besonders auffällig war, dass diese Kontraktionen durch definiert ausgebildete Relaxations- und Kontraktionsphasen gekennzeichnet waren.

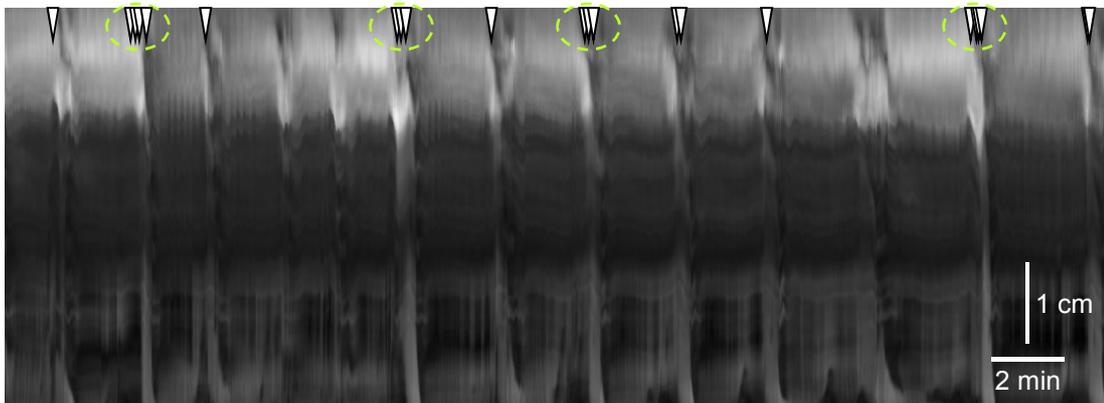
In ICC-GCKO-Colon war die Frequenz der LDC mit durchschnittlich $0,36 \pm 0,02$ cpm leicht reduziert (siehe Abbildung 19B und 18A). Ähnlich wie WT-Colon hatten $92,8 \pm 4,0$ % der Kontraktionen einen Ausfluss zur Folge (siehe Abbildung 18B), obwohl die Form der LDC keine eindeutige Einteilung in Relaxationsphase und Kontraktionsphase erlaubte. Lediglich im distalen Teil konnte eine klare Unterscheidung der zwei Phasen getroffen werden. Im proximalen Teil dagegen traten die Kontraktionen ähnlich wie in GCKO-Colon nur lokal auf.

4.2.2.2. Einfluss von L-NAME auf 'long distance contractions'

Um den Einfluss von basalem NO auf die LDC zu analysieren, wurde die nNOS mithilfe des NOS-Inhibitors L-NAME inhibiert. L-NAME erhöhte die Frequenz der LDC in WT-Colon (Kontrollbedingungen: $0,43 \pm 0,03$ cpm; L-NAME: $0,73 \pm 0,04$ cpm), SMC-GCKO-Colon (Kontrollbedingungen: $0,43 \pm 0,01$ cpm; L-NAME $0,61 \pm 0,02$ cpm) und ICC-GCKO-Colon (Kontrollbedingungen: $0,36 \pm 0,02$ cpm; L-NAME: $0,60 \pm 0,05$ cpm), die mit der Frequenz von GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen ($0,69 \pm 0,04$ cpm) identisch war (Abbildung 20, 21 und 18C). In GCKO-Colon war die Frequenz mit $0,57 \pm 0,02$ cpm leicht verringert (siehe Abbildung 20 und 18C). Weiterhin führte L-NAME zu einer verminderten Effektivität der Kontraktionen in WT-Colon ($56,9 \pm 4,7$ %) und ICC-GCKO-Colon ($69,8 \pm 7,5$ %; Abbildung 18D). Auch in SMC-GCKO-Colon war der Anteil der effektiven Kontraktionen geringfügig verringert ($58,0 \pm 6,1$ %), wohingegen die Effektivität der Kontraktionen von GCKO-Colon von L-NAME unbeeinflusst blieb ($65,7 \pm 11,2$ %). Die Form der einzelnen LDC glich in Anwesenheit von L-NAME der von GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen: Innerhalb der LDC konnten keine

A

SMC-GCKO



B

ICC-GCKO

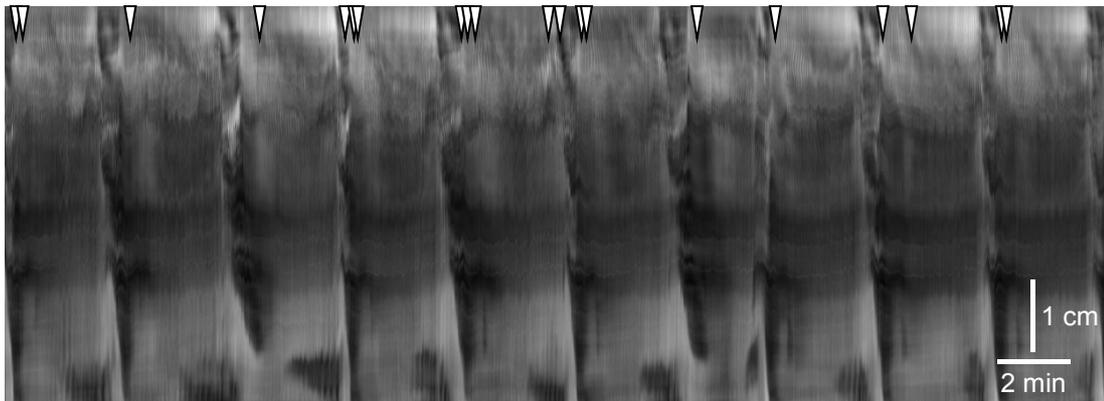


Abbildung 19: Kontraktionsmusterkarten von SMC-GCKO- und ICC-GCKO-Colon
Repräsentative Kontraktionsmusterkarten von SMC-GCKO (A) und ICC-GCKO (B) ‚whole colon‘-Präparationen. Die weißen Pfeilspitzen markieren jeweils den Zeitpunkt eines Ausflusstropfens; grün gestrichelte Ovale auffällige LDC in SMC-GCKO-Colon, die einen gehäuften Ausfluss zur Folge hatten.

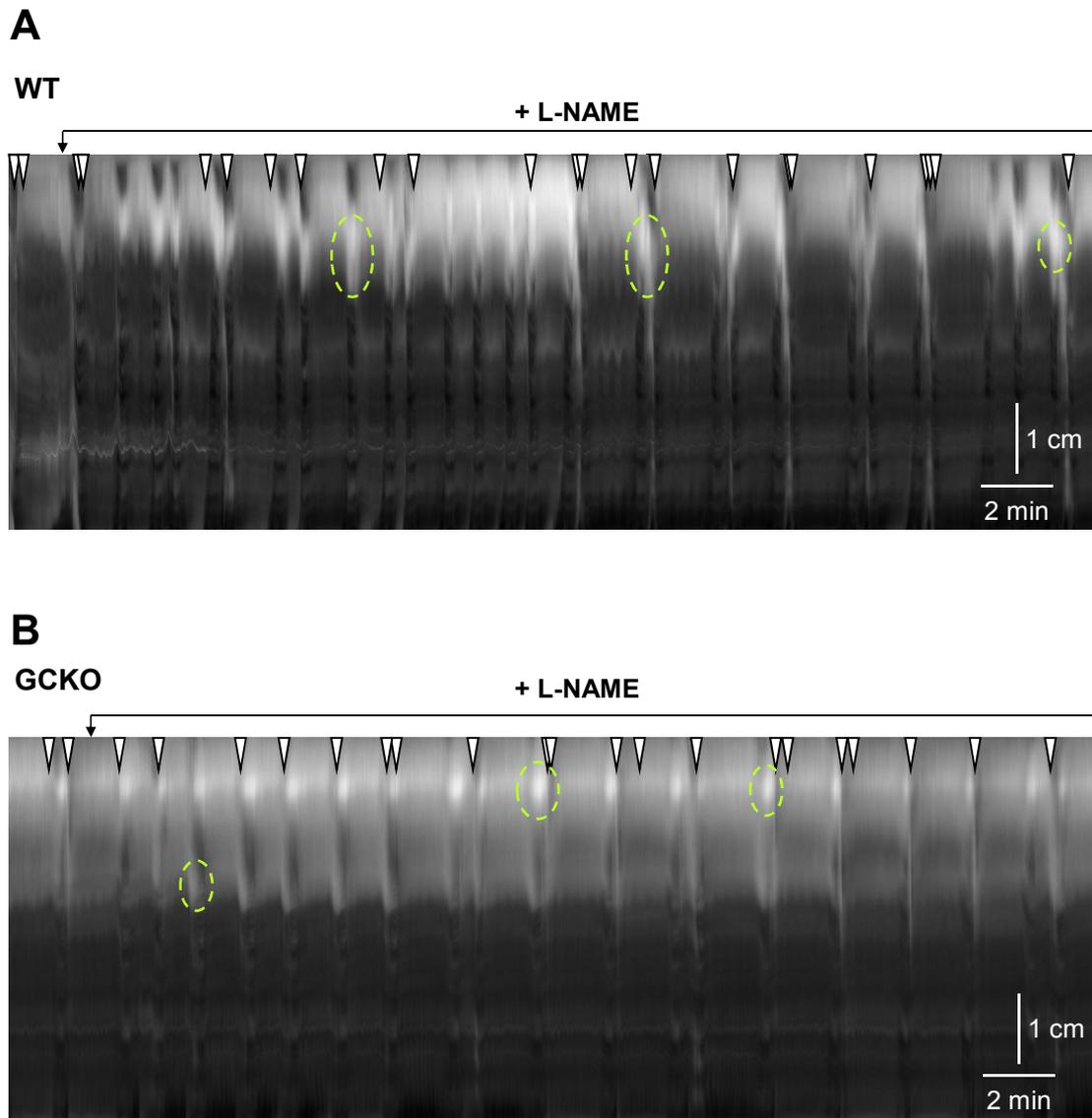


Abbildung 20: Effekt von L-NAME auf LDC in WT- und GCKO-Colon

Repräsentative Kontraktionsmusterkarten von WT (A) und GCKO (B) ‚whole colon‘-Präparationen in Anwesenheit von L-NAME (200 μ M). Die weißen Pfeilspitzen markieren jeweils den Zeitpunkt eines Ausflusstropfens; grün gestrichelte Ovale stark dilatierte Bereiche innerhalb eines LDC, die die fortlaufende Kontraktion unterbrechen.

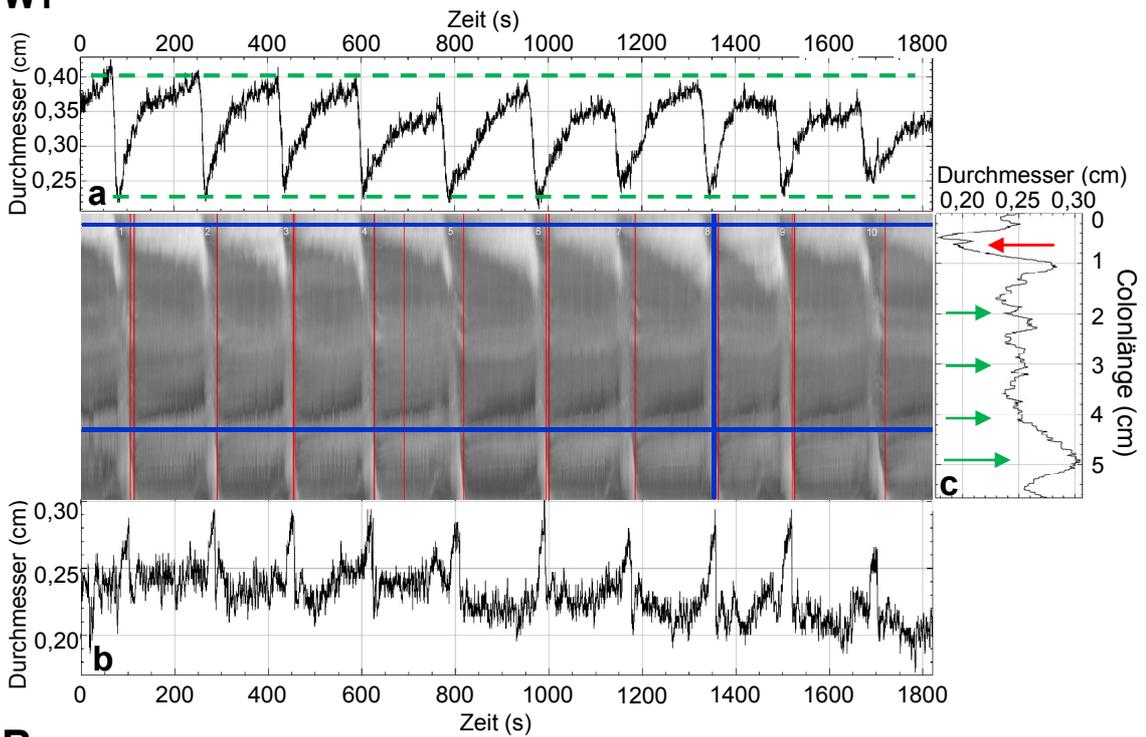
Relaxations- und Kontraktionsphasen definiert werden. Stattdessen wiesen die Präparationen segmentierte Kontraktionen innerhalb eines definierten Zeitfensters auf. Des Weiteren propagierten die Kontraktionen lediglich über kurze Distanzen und zeigten eine vermehrte retrograde Ausrichtung. Besonders charakteristisch waren stark dilatierte Bereiche des proximalen Colons (siehe Abbildung 19 und 20 – grün gestrichelte Ovale). Diese Daten zeigen einen regulatorischen Einfluss der NO-GC einerseits auf die Frequenz, andererseits auf die Effektivität der einzelnen LDC. Hierbei scheint die Effektivität vor allem durch die NO-GC in SMC beeinflusst zu sein. An der Regulation der Frequenz ist dagegen sowohl die NO-GC in ICC als auch in SMC beteiligt.

4.2.2.3. Durchmesseranalyse

Da die NO-GC einen Einfluss auf den Muskeltonus in Colonringen hatte, wurde im Folgenden der Durchmesser des gesamten Colonpräparats analysiert. Durch fehlende Standardisierung konnte der Durchmesser nicht direkt anhand der Grautöne aus den Karten abgelesen werden, weshalb Plot-Profile erstellt wurden (Abbildung 22 und 23). Hierfür wurden verschiedene Profilebene definiert (siehe Abbildung 22 und 23 – blaue Linien): Eine Profilebene parallel zur Zeitachse resultierte demnach in einem neuen Plot, in dem der Durchmesser über der Zeit aufgetragen wird (Abbildung 22 und 23 – Plots ober- (a) bzw. unterhalb (b) der Karte). Eine weitere Profilebene parallel zur Colonlänge führte dementsprechend zu einem Plot, in dem der Durchmesser über der Colonlänge aufgetragen wurde (Abbildung 22 und 23 – Plot rechts (c) der Karte). Auf diese Weise konnte eine detailliertere Analyse der Ausprägungsform der LDC durchgeführt werden. WT-Colon zeigte ein strukturiertes Durchmesserprofil im proximalen Colon: Der Darm kontrahierte in regelmäßigen Abständen bei gleichzeitiger aboraler Erweiterung des Durchmessers. Die Amplitude der Kontraktionen war bei allen Kontraktionen nahezu identisch, sodass die Minima und Maxima der Amplitude eine Grenzlinie ausbildeten (siehe Abbildung 22Aa – grün gestrichelte Linien). Im distalen Teil dagegen war ein basaler Tonus zu erkennen, der lediglich während der relaxierenden Phase der LDC reduziert wurde und so eine Vergrößerung des Durchmessers verursachte (siehe Abbildung 22Ab). Die Ausflusstropfen korrelierten exakt mit den Zeitpunkten des kleinsten Durchmessers im proximalen sowie den größten Durchmessern im distalen Teil des Colons. Diese Synchronisation des proximalen und distalen Colons spiegelte sich ebenfalls im Plot-Profil entlang des Colons wieder. Das proximale Colon war kontrahiert (siehe Abbildung 22Ac – rote Pfeile), wohingegen der distale Teil stark relaxiert war (siehe Abbildung 22Ac – grüne Pfeile).

Das Durchmesserprofil von GCKO-Colon war im proximalen Teil weniger klar strukturiert

A
WT



B
GCKO

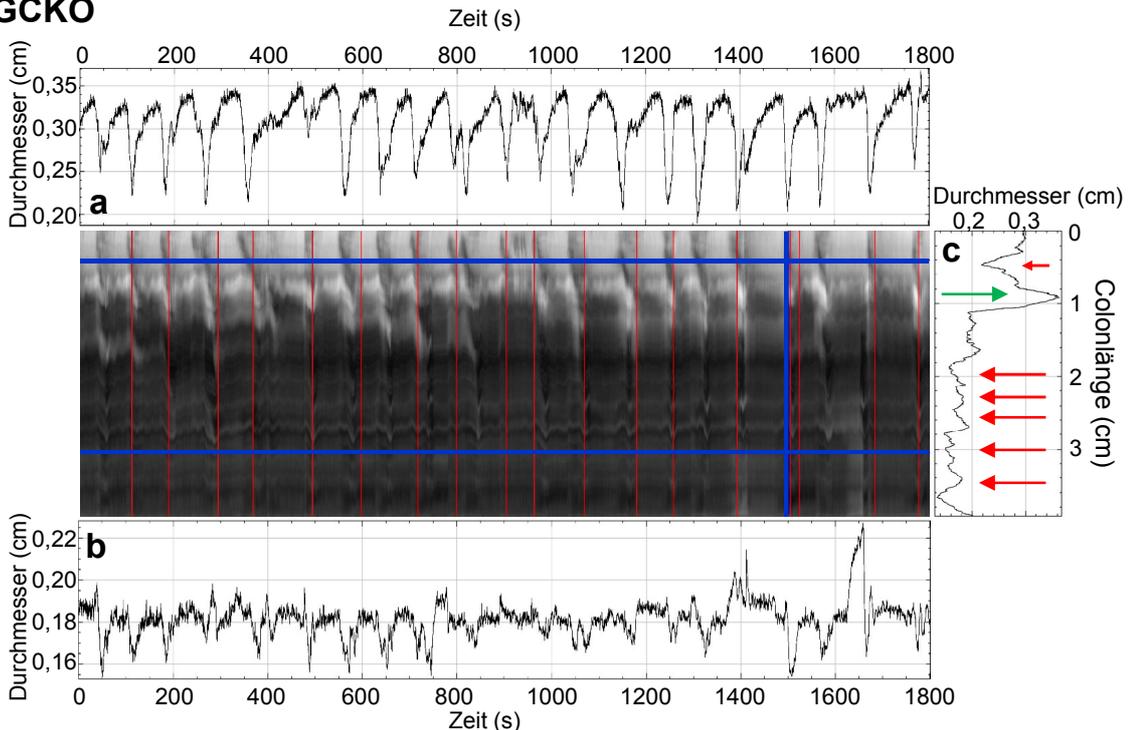


Abbildung 22: Durchmesseranalyse der Kontraktionsmusterkarten von WT und GCKO

Repräsentative Plot-Profile aufgetragen als Durchmesser über der Zeit im proximalen (Plot oberhalb der Karte - a) und distalen (Plot unterhalb der Karte - b) Colonabschnitt sowie entlang der Colon-Achse (Plot rechts der Karte - c) von WT- (A) und GCKO-Kontraktionsmusterkarten (B). Rote Pfeile = Kontraktion; grüne Pfeile = Relaxation; blaue Linien = Plot-Profil-Ebene; rote Linien = Zeitpunkt der Ausflusstropfen

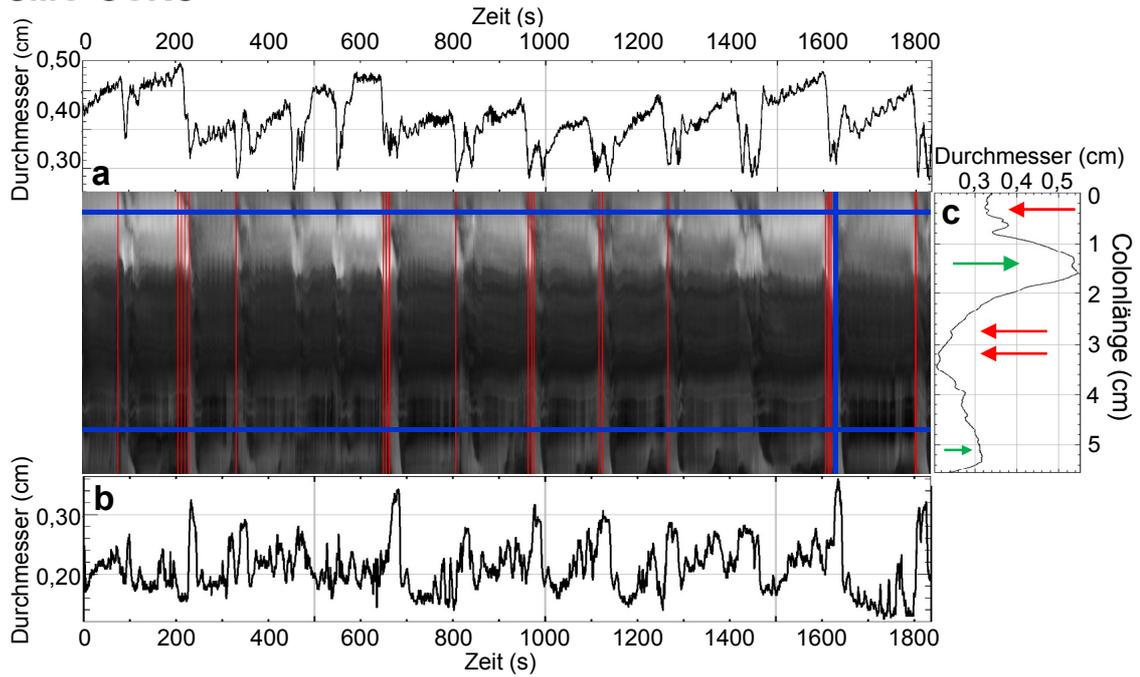
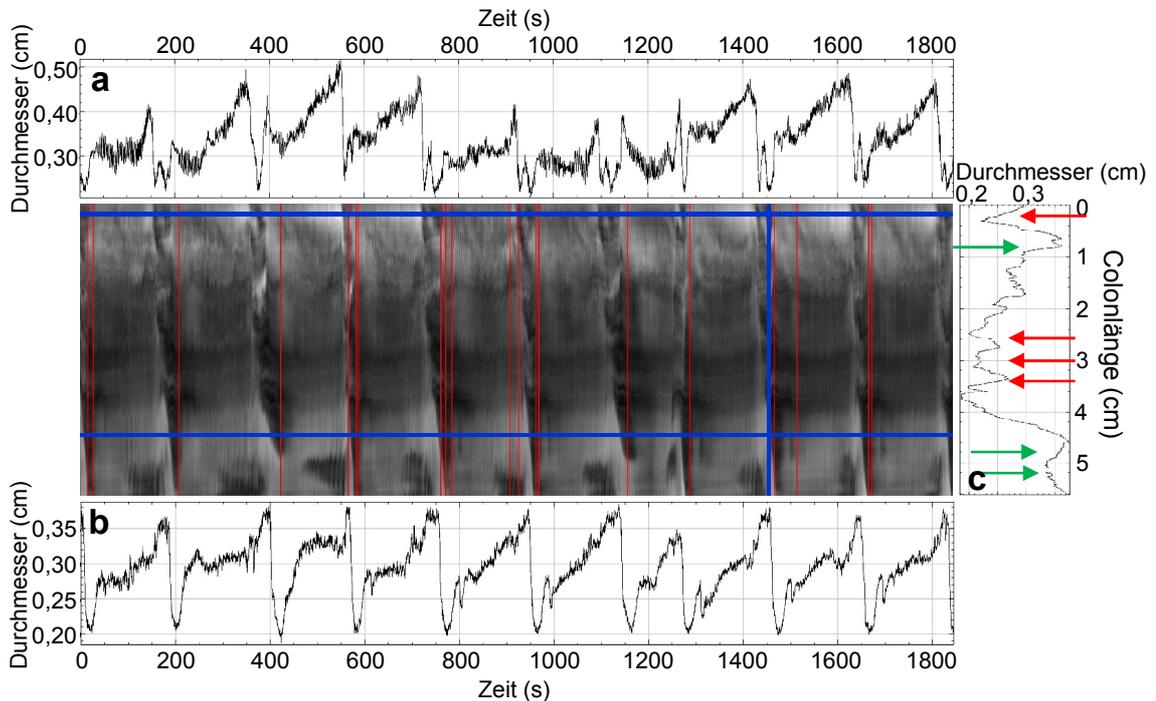
A**SMC-GCKO****B****ICC-GCKO**

Abbildung 23: Durchmesseranalyse der Kontraktionsmusterkarten von SMC-GCKO und ICC-GCKO

Repräsentative Plot-Profilen aufgetragen als Durchmesser über der Zeit im proximalen (Plot oberhalb der Karte - a) und distalen (Plot unterhalb der Karte - b) Colonabschnitt sowie entlang der Colon-Achse (Plot rechts der Karte - c) von SMC-GCKO- (A) und ICC-GCKO-Kontraktionsmusterkarten (B). Rote Pfeile = Kontraktion; grüne Pfeile = Relaxation; Blaue Linien = Plot-Profil-Ebene; rote Linien = Zeitpunkt der Ausflusstropfen

(siehe Abbildung 22B). So wiesen die einzelnen Kontraktionen im Gegensatz zu WT-Colon unterschiedliche Amplituden auf und die Zeitspanne zwischen den Kontraktionen variierte (siehe Abbildung 22Ba). Im distalen Teil zeigte sich ähnlich wie in WT-Colon ein basaler Tonus, jedoch wurde dieser zum Zeitpunkt der LDC von einer Kontraktion unterbrochen (siehe Abbildung 22Bb). Des Weiteren konnten die Ausflusstropfen nicht eindeutig den Relaxationen bzw. Kontraktionen zugeordnet werden. Der Verlauf des Durchmessers entlang des Colons zeigte eine leichte Kontraktion im proximalen Teil, der eine starke Relaxation folgte. Diese Relaxation beschränkte sich jedoch lediglich auf den proximalen Teil, wohingegen der distale Abschnitt stark kontrahiert war (siehe Abbildung 22Bc). Dies könnte unter anderem die Ursache für die verminderte Effektivität sein Tropfen auszustoßen.

In SMC-GCKO-Colon wies das Durchmesserprofil des proximalen Colons ebenfalls eine unstrukturierte Form auf (siehe Abbildung 23A). Wie in GCKO-Colon variierten auch hier die maximalen und minimalen Werte des Durchmessers (siehe Abbildung 23Aa). Im distalen Teil war nur schwer eine Grundlinie zu erkennen. Diese wurde, ähnlich wie in WT-Colon, teilweise von starken Relaxationen unterbrochen (siehe Abbildung 23Ab). Interessanterweise korrelierten diese wenigen Relaxationen mit den LDC, die einen vermehrten Ausfluss zur Folge hatten. Daraus lässt sich schließen, dass diese LDC, bedingt durch die koordinierte Relaxations- und Kontraktionsphase, effizienter waren als die übrigen. Das Durchmesserprofil entlang des Colons von SMC-GCKO ähnelte dem von GCKO-Colon. Hier war ebenfalls eine anfängliche Kontraktion im proximalen Teil (siehe Abbildung 23Ac – rote Pfeile) gefolgt von einer starken Relaxation zu sehen (siehe Abbildung 23Ac – grüne Pfeile). Der gesamte distale Teil war wiederum stark kontrahiert.

Proximales Colon von ICC-GCKO wies ebenfalls ein unstrukturiertes Durchmesserprofil auf (siehe Abbildung 23B). Besonders auffällig war das Plot-Profil des distalen Colonabschnittes (siehe Abbildung 23Bb). Im Gegensatz zu den anderen Genotypen war hier kein Basaltonus zu erkennen. Vielmehr zeigte er ein dem proximalen Abschnitt ähnliches Muster: Einer Kontraktion folgte ein gradueller Anstieg des Durchmessers bis erneut eine Kontraktion folgte. Interessanterweise wurde der Ausstoß der Flüssigkeit in den meisten Fällen durch diese Kontraktionen initiiert. Der Durchmesser Verlauf entlang des LDC zeigte sowohl Eigenschaften von WT- sowie GCKO-Colon. Zum Zeitpunkt der proximalen Kontraktion war der mittlere Abschnitt des Colons stark kontrahiert (siehe Abbildung 23Bc – rote Pfeile), während der distale Abschnitt stark relaxiert war (siehe Abbildung 23Bc – grüne Pfeile). Es ist daher anzunehmen, dass die starke Kontraktion des mittleren Teils einen Flüssigkeitsaustritt erschwert, der von Kontraktionen des

proximalen Teils hervorgerufen würde. Der Ausfluss wird daraufhin durch ausgeprägte Kontraktionen im distalen Abschnitt kompensiert.

Anhand der Plot-Profile konnten die absoluten Durchmesser der proximalen und distalen Colonabschnitte bestimmt werden. Der Durchmesser des proximalen Colons unterschied sich nicht zwischen WT ($0,32 \pm 0,02$ cm), GCKO ($0,33 \pm 0,02$ cm) und ICC-GCKO ($0,36 \pm 0,01$ cm; Abbildung 24A). Interessanterweise war das proximale Colon von SMC-GCKO ($0,44 \pm 0,01$ cm) im Vergleich zu den anderen Genotypen signifikant erweitert. Im distalen Abschnitt zeigte lediglich GCKO-Colon einen stark verringerten Durchmesser (GCKO: $0,16 \pm 0,01$ cm; WT: $0,22 \pm 0,02$ cm; siehe Abbildung 24B). Die Anwesenheit von L-NAME führte zu einer signifikanten Vergrößerung des proximalen Colon-Durchmessers in WT ($0,39 \pm 0,02$ cm), ICC-GCKO ($0,33 \pm 0,02$ cm) und SMC-GCKO ($0,49 \pm 0,01$ cm (Abbildung 24C). Im distalen Abschnitt verringerte sich dagegen der Colondurchmesser in WT ($0,19 \pm 0,01$ cm) und SMC-GCKO ($0,22 \pm 0,01$ cm) und ICC-GCKO ($0,22 \pm 0,01$ cm; Abbildung 24D). Der Durchmesser von GCKO-Colon änderte sich nicht durch L-NAME. Diese Analysen der Plot-Profile zeigen, dass eine koordinierte Regulation des Durchmessers während der LDC für einen effizienten Flüssigkeitsaustritt erforderlich ist. In diese Regulation scheinen sowohl die NO-GC in SMC als auch in ICC involviert zu sein. Die Ergebnisse des SMC-GCKO lassen zudem eine übergeordnete Rolle der NO-GC in SMC bei der Synchronisation und damit der Effektivität der Kontraktionen vermuten.

4.2.2.4. Effekt von TTX und Hexamethonium auf LDC

Zur Evaluation des neuronalen Einflusses auf die LDC wurden TTX und der neuronale nikotinische Acetylcholin-Rezeptor-Antagonist Hexamethonium verwendet. In der Anwesenheit von TTX oder Hexamethonium waren die LDC vollständig unterdrückt (Abbildung 25). Durch den mangelnden Ausstoß der Flüssigkeit, zeigte sich der proximale Teil des Colons aufgrund des Volumens stark erweitert. Es waren zwar weiterhin Ausflusstropfen vorhanden, die jedoch erst nach einer gewissen Zeit in regelmäßigen Abständen von $85,1 \pm 1,6$ s auftraten. Die Menge des Ausflusses entsprach dem Durchflussvolumen von $30 \mu\text{l min}^{-1}$. Dies lässt vermuten, dass die Ausflusstropfen lediglich eine Folge des passiven Durchflusses sind und nicht durch eine aktive Kontraktion hervorgerufen wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl der spannungsabhängige Na^+ -Kanal-Blocker TTX und der Ganglienblocker Hexamethonium zu einer Unterdrückung der LDC führen. Damit zeigen sie den neuronalen Ursprung der LDC.

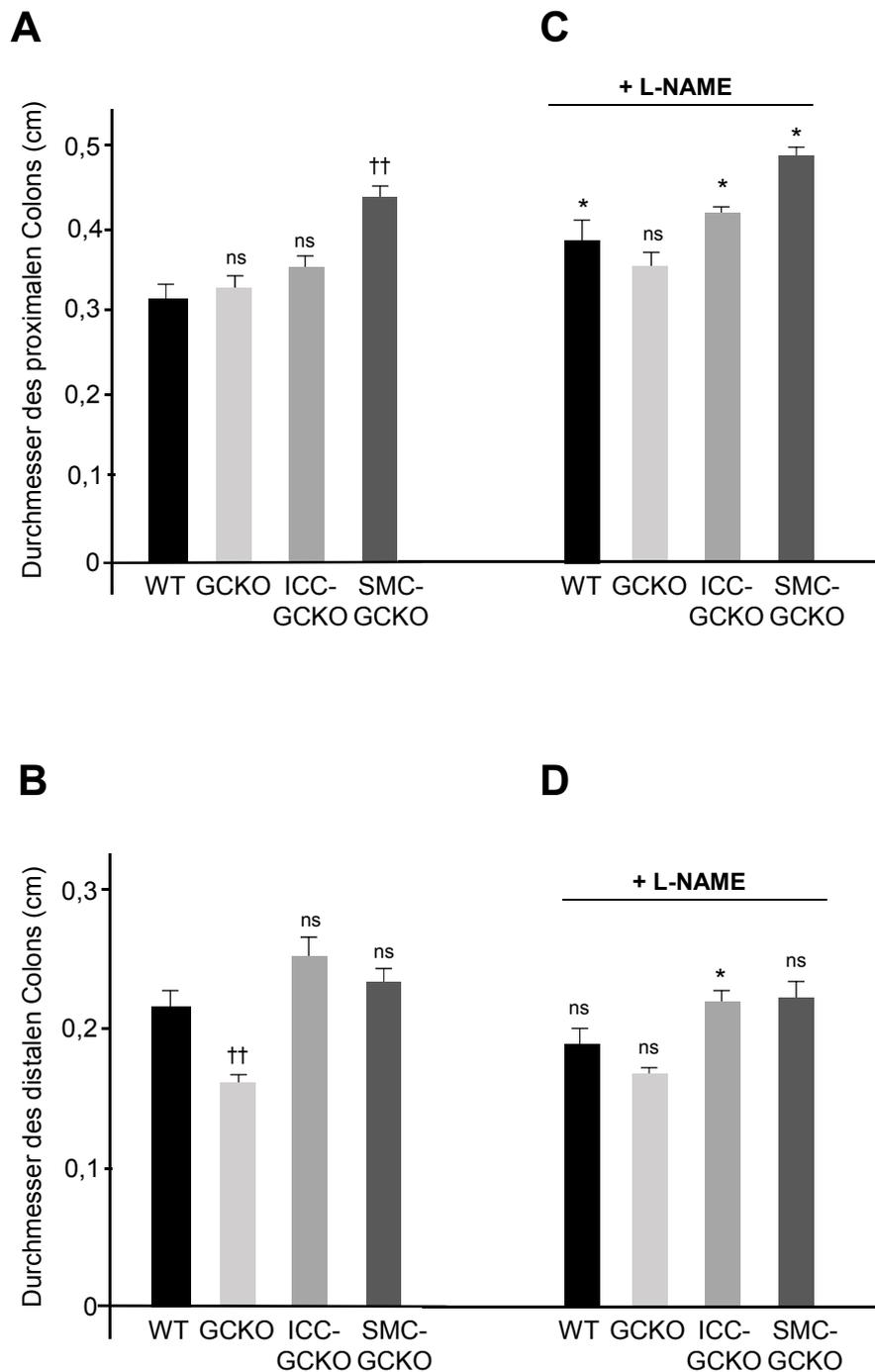


Abbildung 24: Statistische Analyse des Durchmessers

Statistische Analyse des absoluten Durchmessers anhand der Plot-Profile (siehe Abbildung 22 und 23) von WT-, GCKO-, SMC-GCKO- und ICC-GCKO-Colon. Dargestellt sind Durchmesser von proximalem sowie distalem Colon unter Kontrollbedingungen (A/B) sowie in der Anwesenheit von 200 μ M L-NAME (C/D). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von n = 6 pro Genotyp (ns = nicht signifikant; †=P<0,05; ††=P<0,01 Knockout-Mauslinien verglichen mit WT; *=P<0,05; **=P<0,01 in Anwesenheit von L-NAME verglichen mit Kontrollbedingungen).

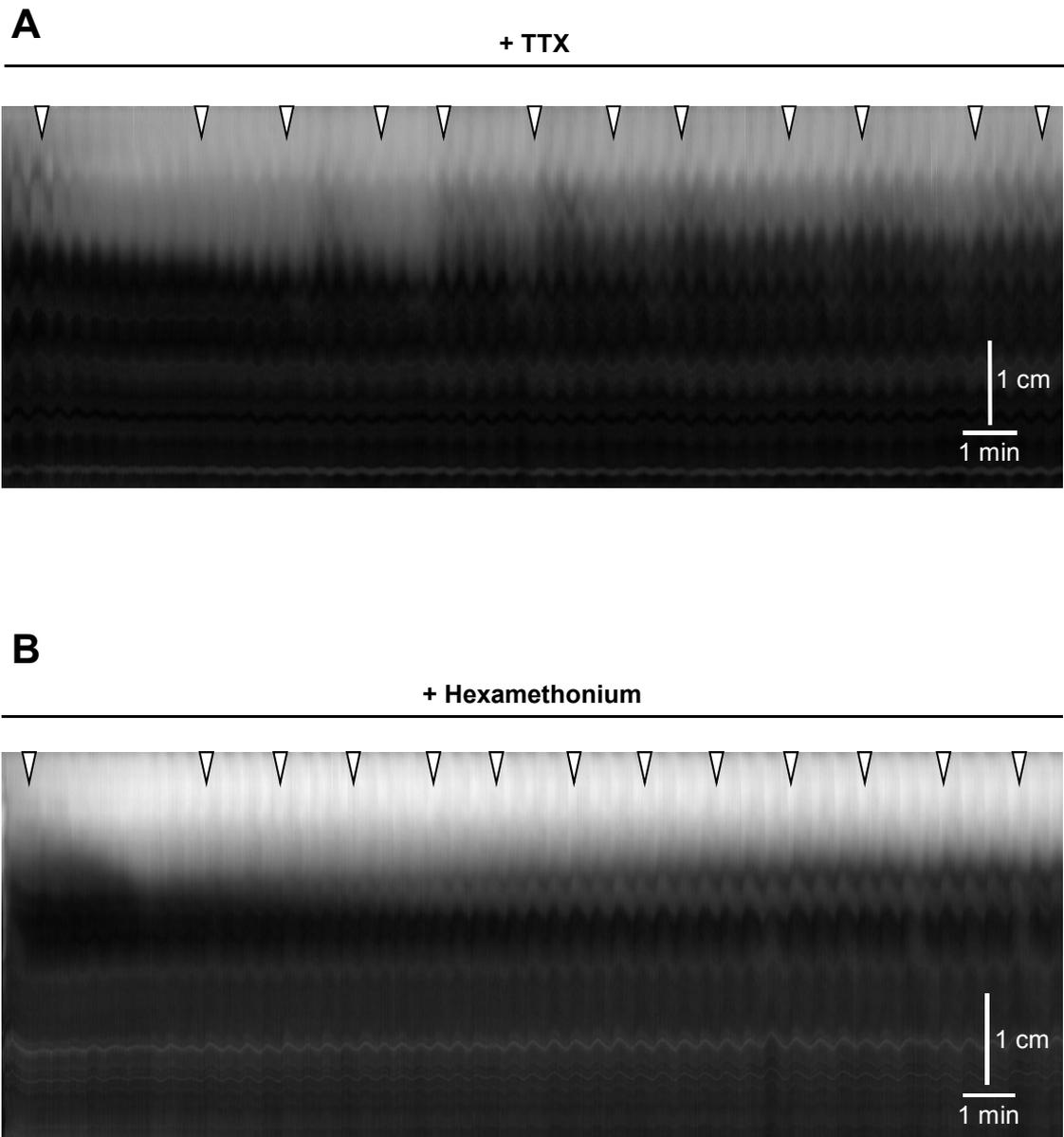


Abbildung 25: Effekt von TTX und Hexamethonium auf LDC

Repräsentative Kontraktionsmusterkarten nach der Zugabe von 1 μM TTX (A) und 100 μM Hexamethonium (B) am Beispiel von GCKO-Colon. Weiße Pfeilspitzen markieren den Zeitpunkt der Ausflusstropfen.

4.3. Mukosale Veränderungen im Colon von SMC-GCKO

4.3.1. Makroskopische Analyse der Mukosa

Bei den intensiven Untersuchungen der SMC-GCKO-Mauslinie fiel auf, dass Tiere dieser Linie mit zunehmendem Alter stark proliferierende Bereiche innerhalb der Mukosa des proximalen Colons aufwiesen. Daraufhin wurde eine Vielzahl von Mäusen in Hinblick auf diesen Phänotyp untersucht. Hierfür wurde Colon entlang des Mesenteriums geöffnet und die Mukosastruktur zunächst makroskopisch analysiert. Abbildung 26 zeigt die Mukosastruktur der verschiedenen Genotypen. Die Mukosa von proximalem Colon heterozygoter Kontrolltiere wies die charakteristische fischgrätenartige Struktur auf. Diese Struktur war bedingt durch Auffaltungen der Mukosa und Submukosa zur Vergrößerung der Resorptionsfläche. Im mittleren Colon waren diese Auffaltungen auf vereinzelte Längsfalten reduziert und die Mukosa erschien leicht transparent. Im Gegensatz dazu war die Mukosastruktur von SMC-GCKO-Colon 5 Monate nach Tamoxifen-Behandlung deutlich verändert. Eine Vielzahl der Mukosafalten war verdickt und einzelne Falten schienen zu einer großen Falte fusioniert zu sein. Auch der mittlere Abschnitt des Colons zeigte Verdickungen entlang der Längsfalten, welche durch eine milchig trübe Farbe gekennzeichnet waren. Im Gegensatz dazu, traten in nicht-induziertem SMC-GCKO-Colon keine Veränderungen der Mukosa auf. Des Weiteren wurden SMC-GCKO-Tiere analysiert, die vor ca. 5 Jahren zur Züchterhaltung in eine ausgelagerte Tierhaltung separiert wurden (SMC-GCKO*). Hiermit sollte überprüft werden, ob eine in dieser Zeit durch Inzucht entstandene Mutation in der SMC-GCKO-Linie aufgetreten war. In diesen Tieren resultierte die Induktion des Knockouts mit Tamoxifen nach 5 Monaten ebenfalls zu einer veränderten Mukosastruktur. Die statistische Analyse ergab, dass keine der heterozygoten Kontrolltiere sowie nicht-induzierten SMC-GCKO-Tiere mukosale Entartungen entwickelten (Abbildung 27). 77 % der Tamoxifen-induzierten SMC-GCKO-Tiere zeigten dagegen eine Entartung der Mukosa. Die Tiere, die aus der separaten Tierhaltung untersucht wurden, wiesen zu 100 % ein verändertes Mukosawachstum auf.

Des Weiteren wurde eine Analyse des Gewichts durchgeführt. Alle analysierten Mäuse waren durchschnittlich 7 Monate alt. Induzierte SMC-GCKO-Tiere zeigten ein signifikant verringertes Gewicht (SMC-GCKO: $26,4 \pm 0,5$ g; SMC-GCKO*: $25,4 \pm 1,3$ g) im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren ($32,4 \pm 0,7$ g) bzw. nicht-induzierten SMC-GCKO-Tieren ($32,2 \pm 3,9$ g). Auffällig war zudem ein vermehrtes Auftreten eines Prolapses in Verbindung mit starker Diarrhö in induzierten SMC-GCKO-Tieren.

Diese Ergebnisse lassen eine Korrelation der glattmuskelspezifischen NO-GC-Deletion mit einer Entartung der Mukosa vermuten. Dies führt wiederum zu

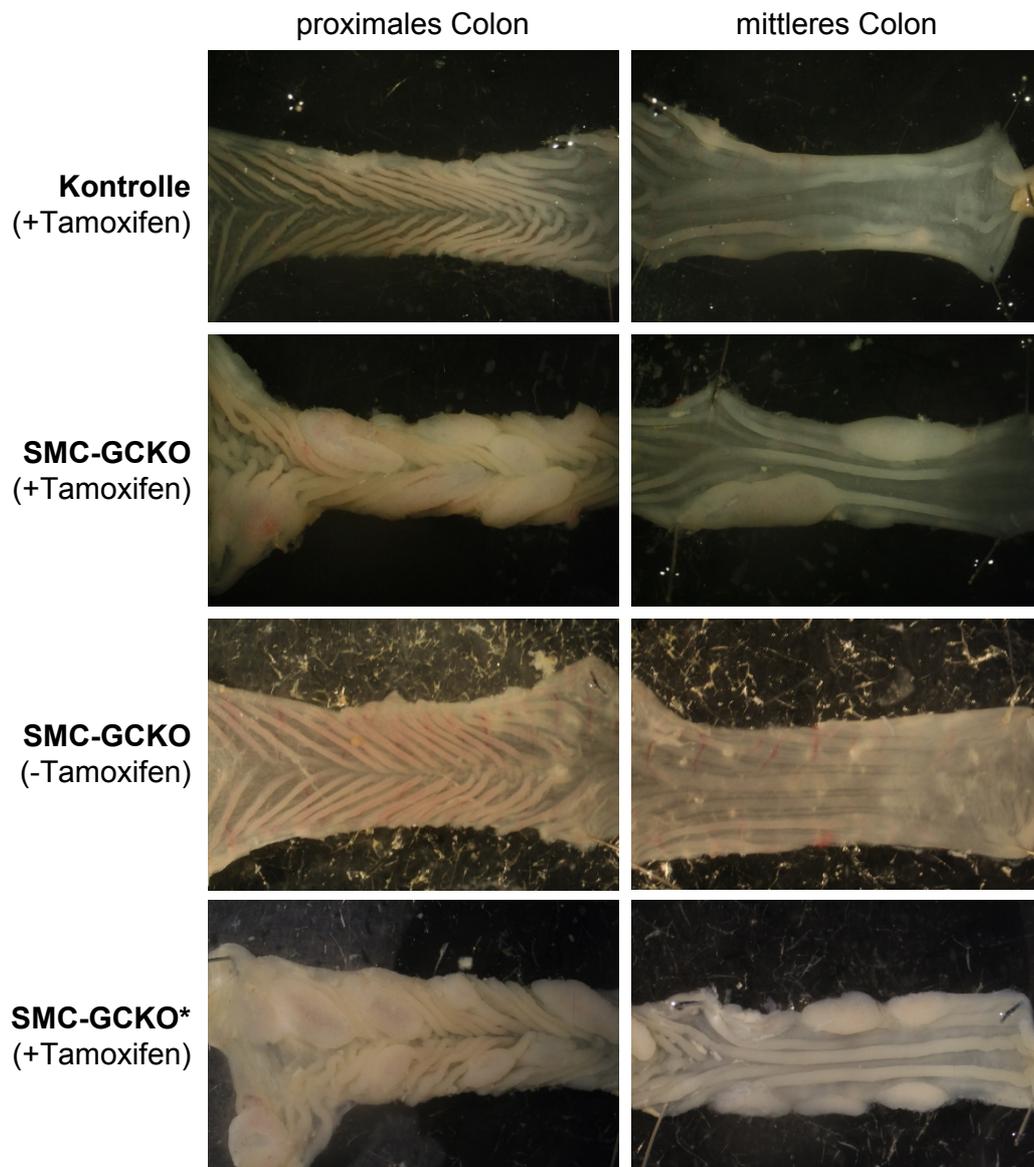


Abbildung 26: Mukosale Entartungen in Colon von SMC-GCKO-Mäusen

Repräsentative Abbildungen von proximalem (linke Bildreihe) und mittlerem (rechte Bildreihe) Colon von heterozygoten Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren. Die SMC-GCKO-Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt: a) mit Tamoxifen-Behandlung, b) ohne Tamoxifen-Behandlung und c) SMC-GCKO-Tiere aus separierter Tierhaltung mit Tamoxifen-Behandlung (SMC-GCKO*).

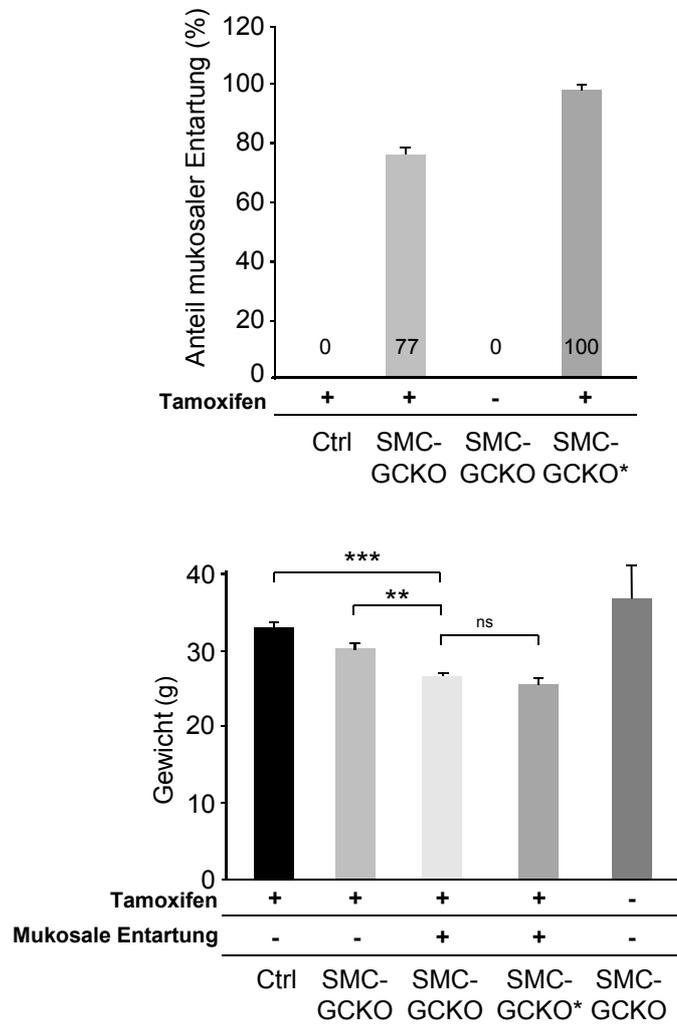


Abbildung 27: Statistische Analyse der mukosalen Entartungen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = Anzahl der analysierten Tiere. Ctrl = heterozygote Kontrolltiere; Ctrl: n = 37; SMC-GCKO (+Tamoxifen): n = 39; SMC-GCKO*: n = 5; SMC-GCKO (-Tamoxifen): n = 8; ns = nicht signifikant, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$

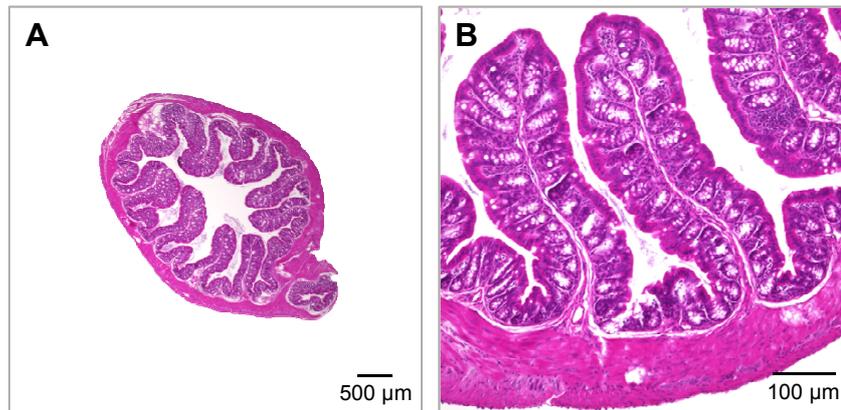
einem stark belasteten Phänotyp, der durch ein verringertes Gewicht, Prolaps und starke Diarrhö charakterisiert ist.

4.3.2. Histologische Analyse der Mukosa

Zur detaillierten Analyse der mukosalen Veränderungen wurden histologische Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Abbildung 28). In heterozygoten Kontrolltieren wies die Mukosa eine übliche Struktur auf: Es waren eine Vielzahl an Mukosaauffaltungen vorhanden, die Mukosa war von definierten Krypten durchsetzt und die Epithelzellen bildeten eine glatte Oberfläche aus (siehe Abbildung 28A/B). In induzierten SMC-GCKO-Tieren dagegen war die Anzahl der Mukosaauffaltungen verringert und einige der Falten waren stark vergrößert (siehe Abbildung 28C – Stern). Diese hyperproliferierenden Bereiche wiesen zudem eine stark veränderte Kriptenstruktur auf (siehe Abbildung 28D/F – gestrichelte Ovale): Das Lumen der Krypten war zum Teil stark vergrößert und einige Krypten verzweigten sich mehrfach. Die Lamina propria war stark ausgedehnt und zeigte vermehrt eingewanderte Immunzellen (siehe Abbildung 28E – Pfeil). Zudem wies das Epithel in besonders stark veränderten Bereichen eine gezackte Oberfläche sowie an einigen Stellen Durchbrüche auf (siehe Abbildung 28E – Pfeilspitze). Basierend auf diesen histologischen Aspekten liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den mukosalen Veränderungen um tubulovillöse Adenome handelt.

Um die Adenome besser charakterisieren zu können, wurden des Weiteren immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Zunächst wurden Antikörper gegen das Protein Ki67 verwendet, das spezifisch während der Interphase im Zellkern exprimiert wird und somit als Marker für sich teilende Zellen dient. In Kontrolltieren waren Ki67-positive Zellen in den unteren zwei Drittel der Krypte zu finden (Abbildung 29). Dies ist durch die Lokalisierung der Stammzellen vor allem im Kryptengrund begründet. Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte sich in gesunden Mukosafalten von SMC-GCKO-Tieren, wo die Ki67-positiven Zellen ebenfalls in den unteren zwei Drittel der Krypte vorzufinden waren. In den Adenomen war die Expression von Ki67 jedoch stark vermehrt und wies zudem ein diffuses Verteilungsmuster auf (siehe Abbildung 29). Des Weiteren war die Expression der NO-GC in den Adenomen stark vermindert. Bereichen mit einer nahezu normalen NO-GC-Expression wiesen eine verringerte Ki67-Expression auf, wohingegen Bereiche ohne NO-GC-Expression ein diffuses Ki67-Expressionsmuster aufwiesen (siehe Abbildung 29 – gestrichelte Ovale). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Fortschreiten der Entartung mit einer verminderten NO-GC-Expression und gleichzeitig vermehrten Ki67-Expression (und damit einer erhöhten Zellteilungsrate) einhergeht.

Kontrolle
(+Tamoxifen)



SMC-GCKO
(+Tamoxifen)

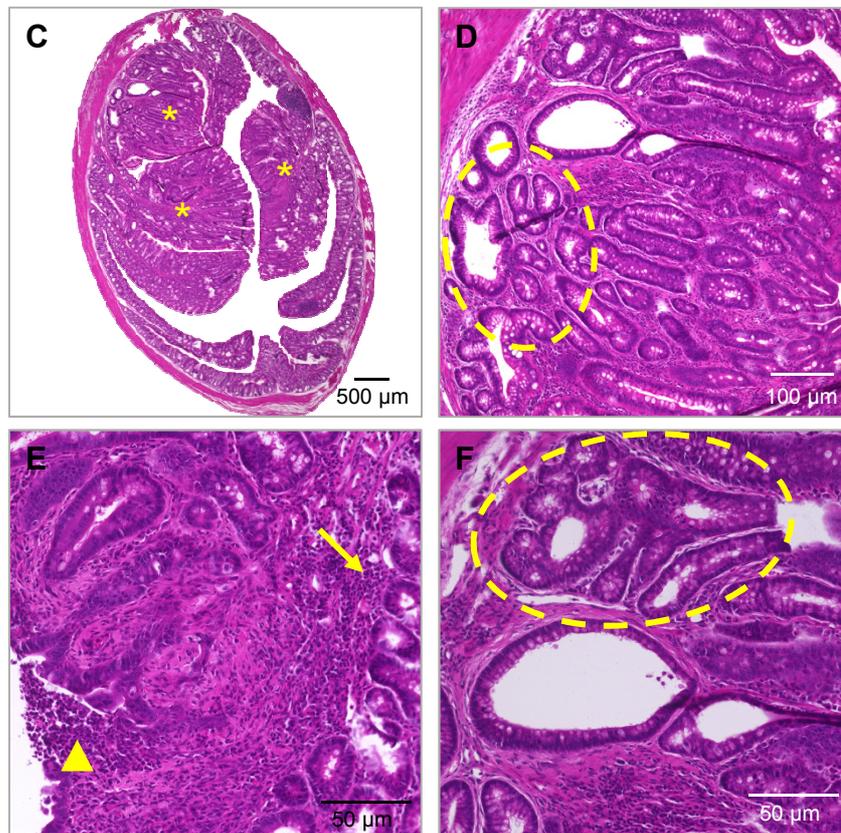
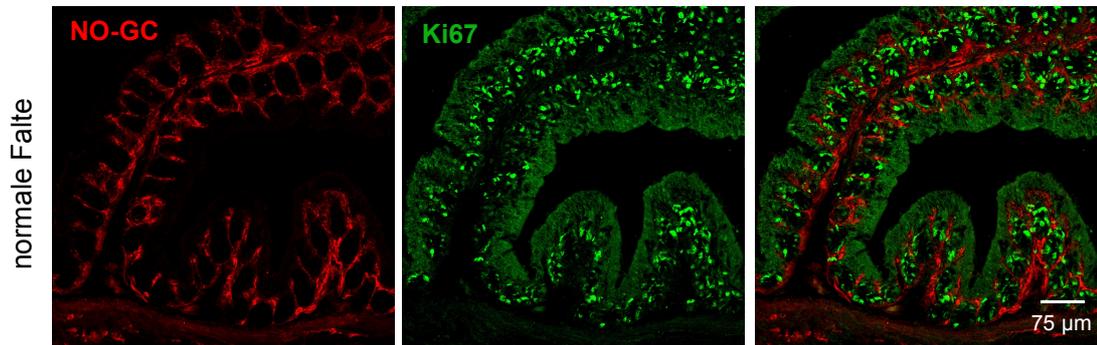


Abbildung 28: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Colon-Querschnitten von Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren

Tiere wurden mit Tamoxifen behandelt und 5 Monate nach Behandlung analysiert. In Kontrolltieren (A/B) sind die üblichen Strukturen der Mukosa zu erkennen. Im SMC-GCKO-Colon (C-F) markieren Sternchen die entarteten Mukosafalten, gestrichelte ovale Bereiche mit degradierter Kryptenstruktur, Pfeile infiltrierte Immunzellen sowie Pfeilspitze eine Ruptur des Epithels.

Kontrolle



SMC-GCKO

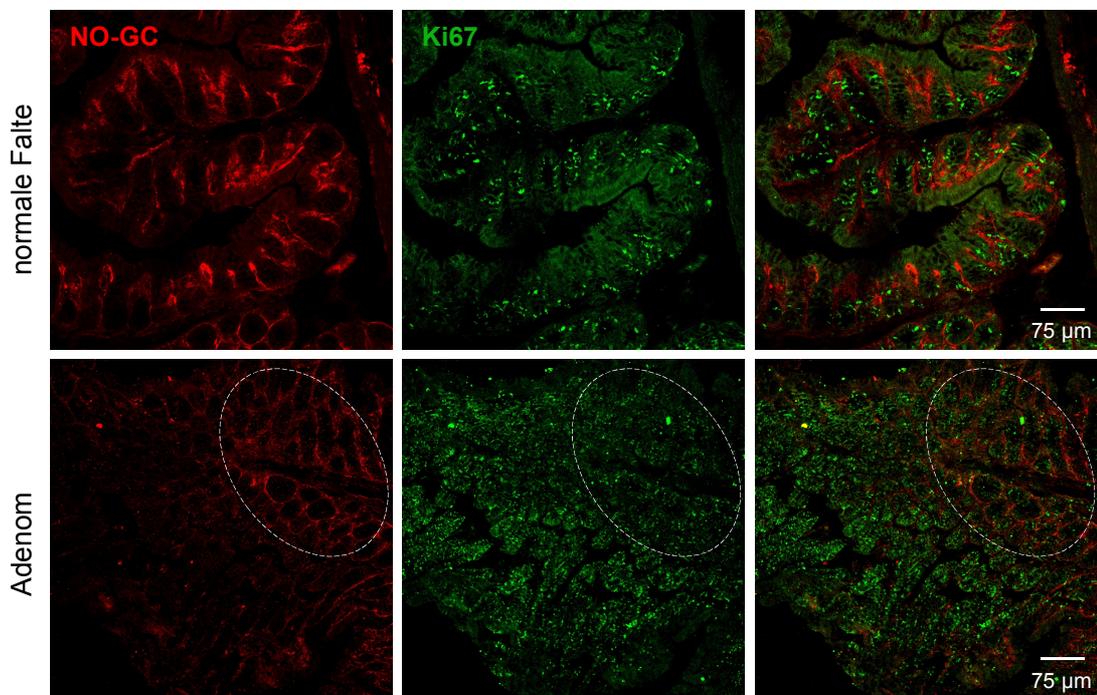


Abbildung 29: Proliferationsanalyse der Mukosa

Immunohistochemische Färbung gegen NO-GC (rot) und Ki67 (grün) von proximalem Colon von SMC-GCKO- und Kontrolltieren. Von SMC-GCKO-Colon wurde jeweils eine stark vergrößerte Falte (Adenom) sowie eine äußerlich unveränderte Falte analysiert, von den Kontrolltieren eine unveränderte Falte. Gestrichelte Ovale markieren Bereiche innerhalb einer verdickten Falte mit nahezu normaler NO-GC-Expression.

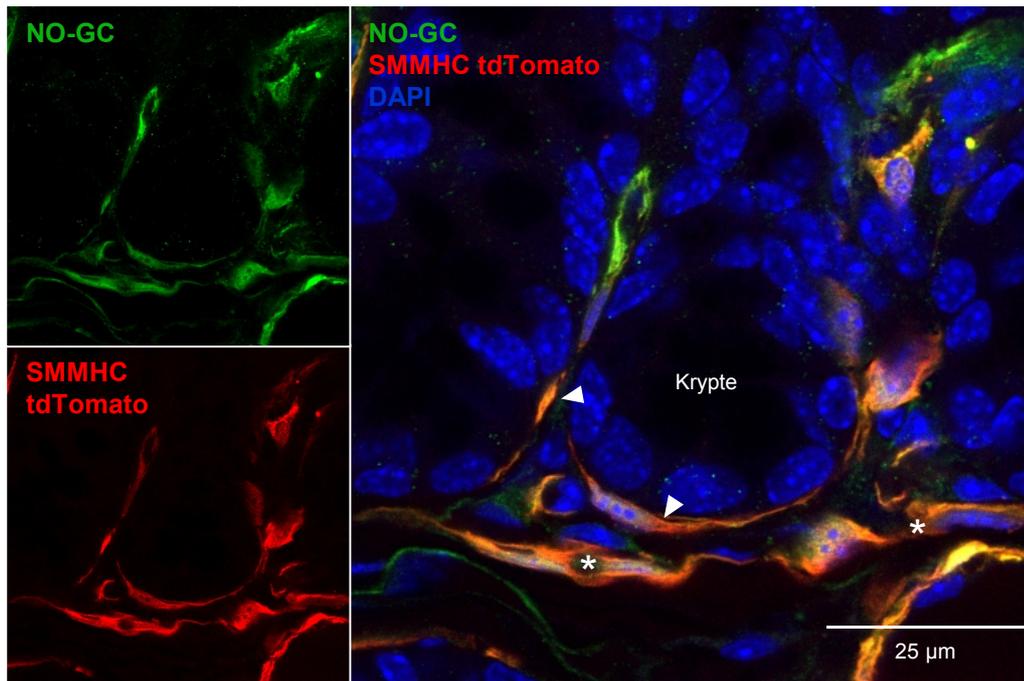
Da nur die SMC-spezifische Deletion der NO-GC zu Adenomen führte, folgten Analysen der Kryptenstruktur auf zellulärer Ebene. Zur Identifizierung der Zellen, mit einer aktiven Cre-Rekombinase in SMC-GCKO-Mäusen wurde eine Reportermaus eingesetzt. Diese exprimiert den Fluoreszenzfarbstoff tdTomato unter der Kontrolle des SMMHC-Promoters. Zur simultanen Überprüfung einer potentiellen NO-GC-Expression in tdTomato-positiven Zellen wurden zusätzlich Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit der NO-GC eingesetzt (Abbildung 30). In heterozygoten Kontrolltieren zeigte sich eine Doppelfärbung in den SMC der Lamina muscularis mucosae, aber auch in kryptennahen Zellen. Im Gegensatz dazu konnte in SMC-GCKO-Tieren keine Doppelfärbung in Zellen der Lamina muscularis mucosae (siehe Abbildung 30 – Stern) sowie in einem Teil der kryptennahen tdTomato-positiven Zellen (siehe Abbildung 30 – Pfeile) detektiert werden. In einem Großteil der kryptennahen tdTomato-positiven Zellen schien die NO-GC jedoch weiterhin exprimiert zu werden (siehe Abbildung 30 – Pfeilspitzen). Diese Ergebnisse zeigen in Colon von Kontrolltieren eine NO-GC-Expression sowohl in der Lamina muscularis mucosae als auch in kryptennahen Zellen, deren Identität nicht eindeutig bestimmt werden kann. In SMC-GCKO-Colon konnte kein NO-GC-Signal in den Zellen der Lamina muscularis mucosae detektiert werden.

4.3.3. Genanalyse der Mukosafalten von WT und SMC-GCKO

Um Hinweise auf potentiell involvierte Gene zu erhalten, die in den Mechanismus der Adenomentwicklung involviert sind, wurde eine Genanalyse durchgeführt. Hierfür wurde mRNA aus Mukosafalten von heterozygoten Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren isoliert und eine Sequenzierung der exprimierten mRNA durchgeführt. Diese führte zu dem Ergebnis, dass 1514 Gene differentiell exprimiert wurden (false discovery rate $< 0,05$; \log_2 fold change ≥ 1 bzw. ≤ -1). Mithilfe des Datensatzes wurde zunächst eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, welche eine hohe Varianz der exprimierten Gene zwischen SMC-GCKO-Tieren und heterozygoten Kontrolltieren (79 % Varianz) aufzeigte (siehe Abbildung 31A). Die Varianz innerhalb der Kontrolltiere betrug lediglich 6 %. Die mRNA-Profile der verschiedenen SMC-GCKO-Tiere variierten jedoch erheblich, sodass kein klares SMC-GCKO-Genmuster erstellt werden konnte. GSEA-Analysen zeigten dennoch eine große Beeinflussung an Genen, die vor allem in die Entstehung von Colonkarzinomen oder der epithelialen-mesenchymalen-Transition involviert sind (Abbildung 31B und C).

Die Beteiligung von potentiellen NO-abhängigen Faktoren bei der Entstehung von Adenomen ist bislang unzureichend erforscht. Galamb *et al.* (2012) postulierten die Beteiligung von 11 Genen, welche als Diskriminatoren für den Übergang von Dysplasie

Kontrolle



SMC-GCKO

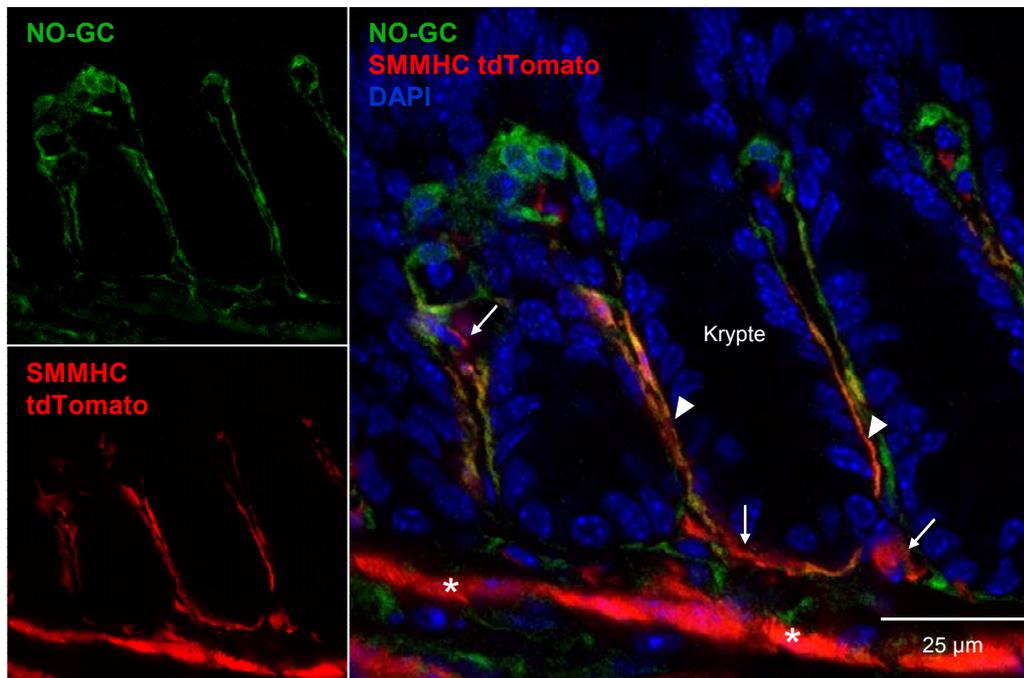


Abbildung 30: Cre-Aktivität unter dem SMMHC-Promotor

Immunohistochemische Analysen von Reportermaus-Colon, die das fluoreszierende Protein tdTomato unter Regulation des SMMHC-Promotors exprimieren (rot), mit gleichzeitiger Verwendung von Antikörpern gegen NO-GC (grün). Sternchen markieren Zellen der Lamina muscularis mucosae, Pfeilspitzen und Pfeile kryptennahe Myofibroblasten.

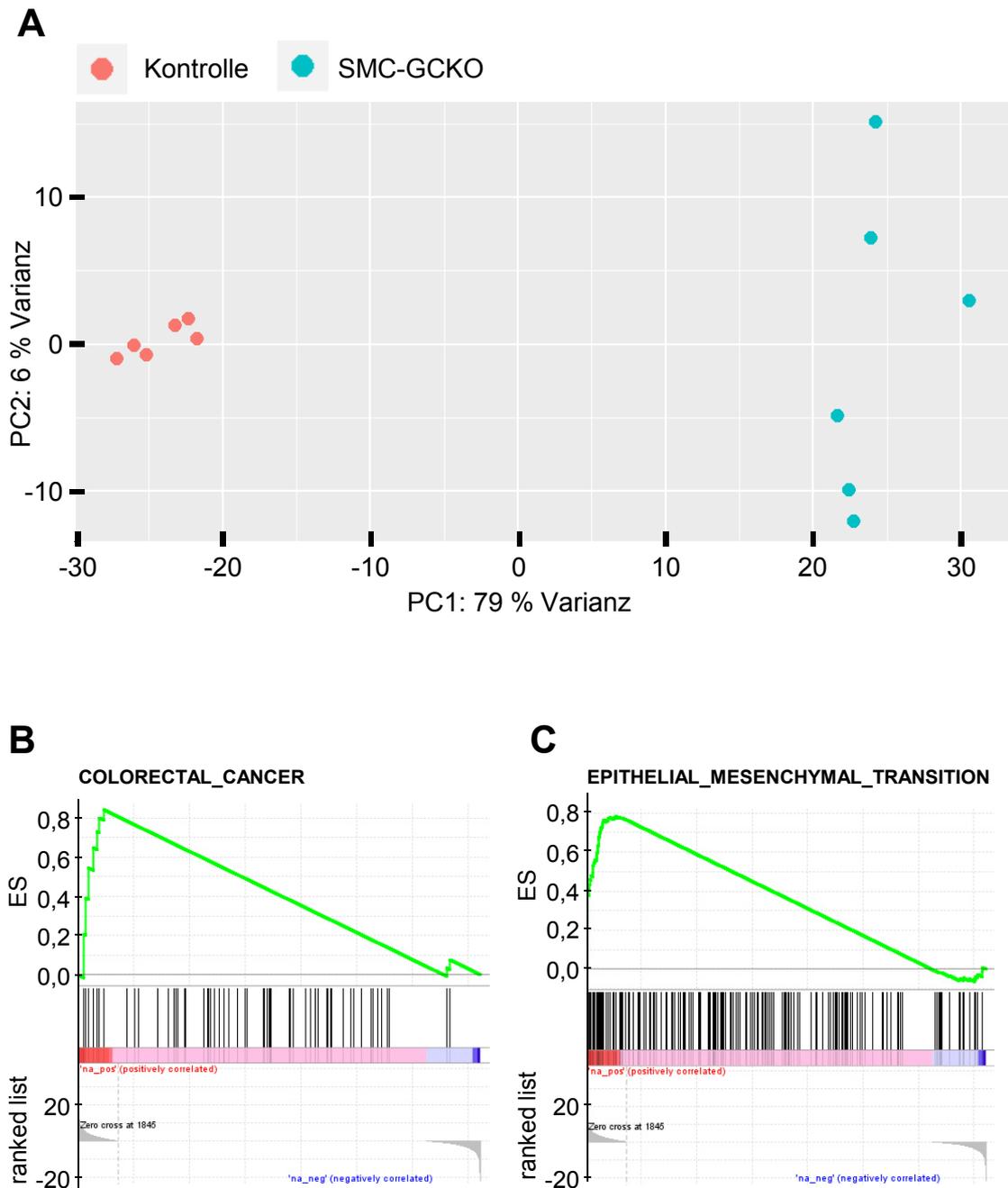


Abbildung 31: mRNA-Expressionsanalyse

(A) Hauptkomponentenanalyse der mRNA-Sequenzierungsergebnisse von WT-Mukosa sowie vergrößerten SMC-GCKO-Mukosafalten. (B)/(C) GSEA-Analysen unter Verwendung der KEGG-Bibliothek (B) sowie der HALLMARK-Bibliothek (C) des Datensatzes zeigten verstärkte Veränderungen von Genen, welche in die Entstehung von colorectalem Karzinom sowie in die Epithel-Mesenchym-Transition involviert sind. ES = enrichment score

zu Karzinom eine entscheidende Rolle spielen. Sieben dieser Gene waren in der Genexpressionsanalyse unter den am stärksten differentiell exprimierten Genen vorhanden: MMP3 (log2FoldChange: 7,56), CXCL1 (log2FoldChange: 7,07), CXCL2 (log2FoldChange: 7,36), IL1b (log2FoldChange: 6,22), IL1rn (log2FoldChange: 2,35), Chil3 (log2FoldChange: 6,03) und Grem1 (log2FoldChange: 2,61). Croner *et al.* (2005) postulierten weitere Gene, welche bei der Entwicklung von Colonkarzinomen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen und in SMC-GCKO-Tieren differentiell exprimiert wurden. Hierzu zählen unter anderem MMP7 (log2FoldChange: 3,97) sowie Serpine1 (log2FoldChange: 3,21).

4.3.4. Expression von Gremlin

Der Faktor Gremlin1 (Grem1) erschien wegen seiner Expression am Grund der Krypte besonders vielversprechend. Gremlin1 ist ein BMP-Antagonist, der am Kryptengrund zur Aufrechterhaltung des BMP/Wnt-Gradienten und somit zum Erhalt der Stammzellnische beiträgt. Gremlin1 wird von Zellen der Lamina muscularis mucosae sowie kryptennahen Myofibroblasten exprimiert und sezerniert (Kosinski *et al.*, 2007). Bei diesen Zellen könnte es sich potentiell, um die gleichen Zellen handeln, in denen auch die Cre-Rekombinase in SMC-GCKO-Tieren aktiv ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass die NO-GC in Wechselwirkung mit der Bildung bzw. Sekretion von Gremlin1 steht und dadurch die Stammzellnische beeinflusst.

Basierend auf den Ergebnissen der Genanalyse und der Datenlage aus der Literatur wurde die Gremlin1-Expression im Detail analysiert. Dazu wurde zunächst mittels Immunhistochemie die Proteinverteilung von Gremlin1 in Colon-Querschnitten untersucht. In Colon von Kontrolltieren konnte keine Expression von Gremlin1 festgestellt werden (Abbildung 32). Im Vergleich dazu wiesen die Adenome von SMC-GCKO eine starke Expression von Gremlin1 in der Lamina propria sowie im Bereich der glatten Muskulatur auf (siehe Abbildung 32). Interessanterweise konnte auch in makroskopisch unveränderten Mukosafalten der Adenom-belasteten Tiere eine leichte Gremlinexpression nachgewiesen werden. Hier beschränkte sich die Expression auf die Lamina propria.

Da es sich bei Gremlin1 um ein sezerniertes Protein handelt, konnten mit dieser Methode keine Rückschlüsse auf die Lokalisation Gremlin1-exprimierender Zellen gezogen werden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Expression der Gremlin1-mRNA mittels In-situ-Hybridisierung untersucht. Hierfür wurde Colon-Gewebe von heterozygoten Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren 5 Monate bzw. 12 Monate nach Tamoxifeninjektion verwendet. In Kontrolltieren konnte die Gremlin-mRNA vor allem in

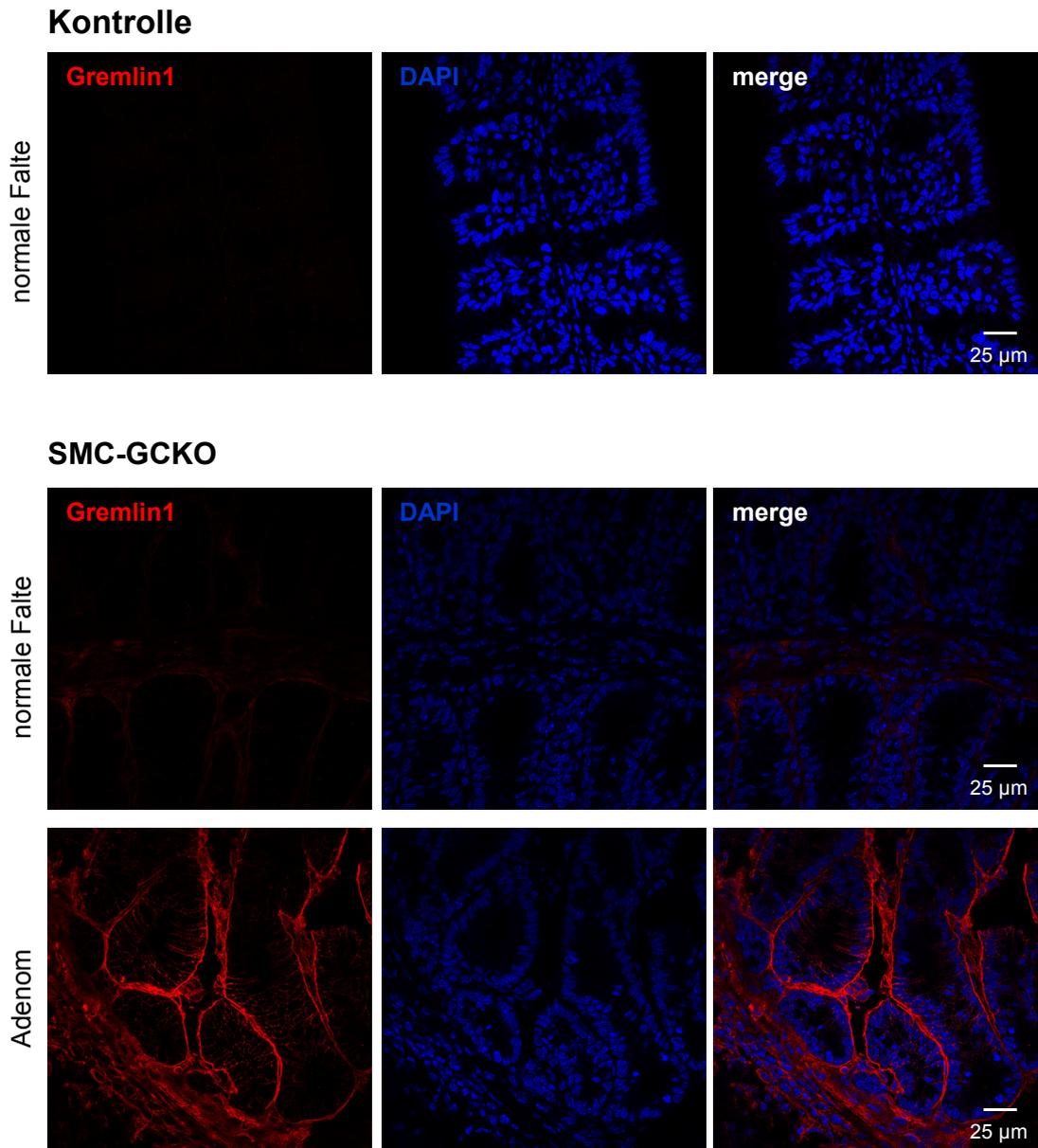
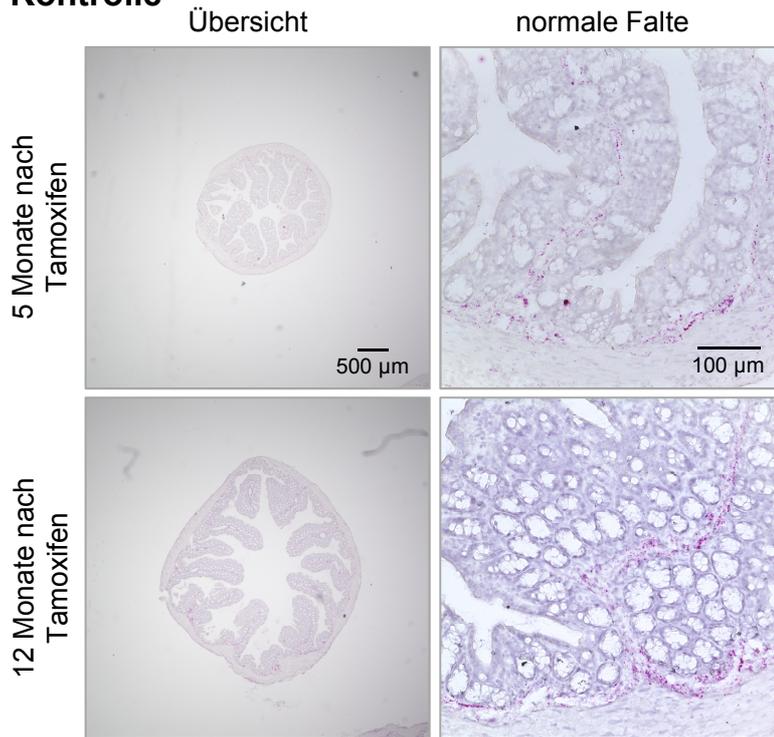


Abbildung 32: Gremlin1-Expression in Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren
 Immunohistochemische Färbung mit Antikörper gegen Gremlin1 (rot) von proximalem Colon von Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren.

Zellen der Lamina muscularis mucosae nachgewiesen werden (Abbildung 33). Der Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster. Im Vergleich dazu zeigte SMC-GCKO-Colon 5 Monate nach der Injektion von Tamoxifen eine enorm verstärkte Expression von Gremlin1 (siehe Abbildung 33). Vor allem im Bereich der Adenome wurde die Gremlin1-mRNA in großen Mengen exprimiert. In diesen Bereichen war die Expression nicht auf die Zellen der Lamina muscularis mucosae konzentriert, sondern streute in die glatte Muskelschicht sowie in die oberen Bereiche des Adenoms. 12 Monate nach Tamoxifen-Behandlung wiesen Adenome ein undefiniertes Gremlin1-Expressionsmuster auf, welches in große Teile der glatten Muskelschicht streute. Interessanterweise zeigten bereits gesunde Falten in SMC-GCKO-Colon eine verstärkte Gremlin1-Expression. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bereits in makroskopisch unveränderten Mukosafalten eine Störung Faktoren innerhalb der Stammzellnische vorliegt.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass Gremlin1-exprimierende Zellen vor allem in der Lamina muscularis mucosae lokalisiert sind, die Menge an exprimiertem Gremlin1 unter Normalbedingungen jedoch so gering ist, dass sie mittels Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden kann. Erst die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion der NO-GC führt zu einer verstärkten mRNA-Expression von Gremlin1 und folglich zu einer verstärkten Sekretion.

Kontrolle



SMC-GCKO

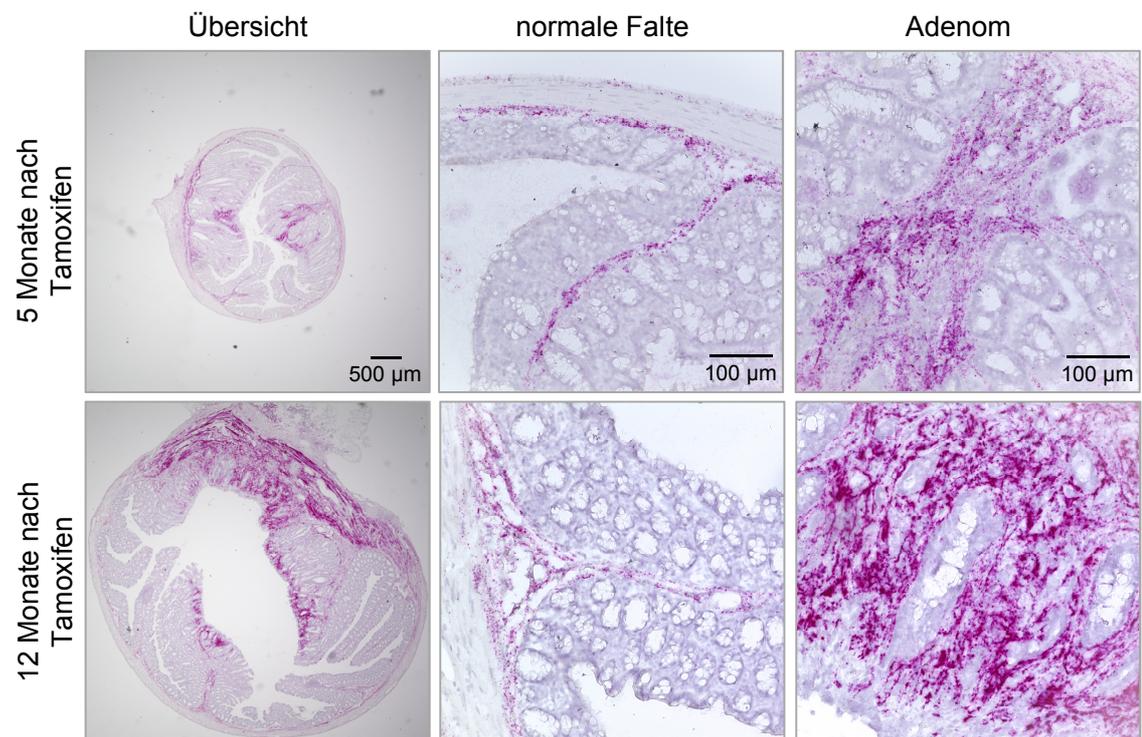


Abbildung 33: In-situ-Hybridisierung gegen Gremlin1 von WT- und SMC-GCKO-Colon

In-situ-Hybridisierung an Colon-Querschnitten von Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren unter Verwendung von Sonden gegen die Gremlin1-mRNA (rote Punkte). Tiere wurden 5 Monate bzw. 12 Monate nach Tamoxifeninduktion analysiert. Abgebildet ist eine gesunde Falte (WT-Colon und SMC-GCKO-Colon) sowie eine stark vergrößerte Falte (SMC-GCKO).

5. Diskussion

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) ist ein zentrales Enzym der inhibitorischen Neurotransmission. Die Aktivierung der NO-GC führt zur Bildung von cGMP und damit zur Aktivierung der cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), wodurch unter anderem eine Relaxation der glatten Muskulatur vermittelt wird. Im Gastrointestinaltrakt wird die NO-GC in den glatten Muskelzellen sowie in interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), Fibroblasten-ähnlichen Zellen (FLC) sowie in verschiedenen bislang unbekanntenen Zellen innerhalb der Mukosa exprimiert. Damit ist die NO-GC/cGMP-Signalkaskade in eine Vielzahl von Regulationsprozessen innerhalb des Gastrointestinaltrakts involviert. Die genaue Funktion der NO-GC in den jeweiligen Zellpopulationen ist noch nicht detailliert bekannt. Zur Aufklärung der Funktion wurden in dieser Arbeitsgruppe Knockout-Mauslinien gezüchtet, welche eine Deletion der NO-GC entweder global (GCKO) oder spezifisch in SMC (SMC-GCKO), ICC (ICC-GCKO) bzw. in beiden Zelltypen aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden nachfolgende Fragestellungen untersucht, die im Folgenden im Detail diskutiert werden sollen:

- (1) Verteilung der NO-GC Expression im Colon
- (2) Beteiligung der NO-GC an der Regulation der gastrointestinalen Motilität
- (3) Potentielle Beteiligung der NO-GC an der Adenomentwicklung

5.1. Verteilung der NO-GC Expression im Colon

Die NO-GC ist ein Dimer, das sich aus einer α - und β -Untereinheit zusammensetzt. Da zwei α -Untereinheiten existieren, können zwei verschiedenen Isoformen gebildet werden ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$). Die genaue Lokalisation der Isoformen im Colon ist jedoch nicht detailliert bekannt, weshalb immunhistochemische Färbungen sowie In-situ-Hybridisierungen durchgeführt wurden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die β_1 -Untereinheit besonders stark im Bereich des myenterischen Plexus sowie in einzelnen Zellen innerhalb der glatten Muskelschicht exprimiert wird. Bei diesen Zellen handelt es sich um cKit⁺-ICC sowie PDGFR α ⁺-Zellen (Iino *et al.*, 2008; Groneberg *et al.*, 2011; Voussen *et al.*, 2017). In der Submukosa und Mukosa wird die β_1 -Untereinheit in Gefäßen sowie in Zellen der Lamina propria exprimiert (siehe Abbildung 7). Die Identifizierung der Zellen in der Lamina propria ist bislang noch nicht gelungen. Bekannt ist lediglich, dass die Zellen am oberen Rand der Lamina propria den Rezeptor PDGFR α exprimieren (Kurahashi *et al.*, 2012). Die α_2 -Untereinheit wurde hauptsächlich im Bereich des myenterischen Plexus, vereinzelt auch im Bereich der glatten Muskelschicht detektiert, wohingegen die α_1 -Untereinheit nahezu ubiquitär exprimiert wurde. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Daten aus der Literatur: So wird der $\alpha_2\beta_1$ -Isoform vor

allem eine Beteiligung an der synaptische Transmission zugeschrieben (Garthwaite, 2008), was deren Expression vor allem innerhalb des myenterischen Plexus vermuten lässt. Die α_2 -Untereinheit wird unter anderem in neuronalen Ausläufern exprimiert, was deren vereinzelte Expression in der glatten Muskulatur erklärt. Geringe Mengen der α_2 -Untereinheit wurden aber auch in vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen (Mergia *et al.*, 2006). Das $\alpha_1\beta_1$ -Dimer dagegen wird ubiquitär exprimiert (Mergia *et al.*, 2003), was eindeutig durch die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung bestätigt wird. Diese zeigten eine Expression der α_1 -Untereinheit in Zellen der glatten Muskulatur. Da die β_1 -Untereinheit den einzigen Dimerisierungspartner der α_1 -Untereinheit darstellt, kann auf eine entsprechende Expression der β_1 -Untereinheit in den gleichen Zellen geschlossen werden. Dies liefert wiederum indirekt den Nachweis, dass die NO-GC in Zellen der glatten Muskulatur exprimiert wird, obwohl dies anhand der immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen die β_1 -Untereinheit nicht gezeigt werden konnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass beide NO-GC-Isoformen im Colon der Maus exprimiert werden. Während die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform ubiquitär exprimiert wird, ist die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform hauptsächlich im Bereich des myenterischen Plexus vorzufinden.

5.2. Beteiligung der NO-GC an der Regulation der gastrointestinalen Motilität

Es ist bekannt, dass Stickstoffoxid (NO) ein wichtiger modulatorischer Neurotransmitter im Gastrointestinaltrakt ist. Es existieren bereits viele Studien, die die nitrogenen Regulationsmechanismen der gastrointestinalen Motilität untersucht haben. Hierzu wurden vor allem pharmakologische Inhibitoren sowohl für die NOS (z.B. L-NA oder L-NAME) als auch für die NO-GC (z.B. ODQ) eingesetzt (Keef *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1998b; Gonzalez & Sarna, 2001; Powell & Bywater, 2001; Takahashi *et al.*, 2005; Alberti *et al.*, 2007; Heredia *et al.*, 2010; Okuno *et al.*, 2011; Lies *et al.*, 2015; Voussen *et al.*, 2017). Neben den pharmakologischen Studien wurden auch Knockout-Mausmodelle verwendet (Dickson *et al.*, 2010; Spencer, 2013). Diese Studien wurden mit nNOS-Knockout-Mäusen durchgeführt, lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Während Dickson *et al.* (2010) in nNOS-Knockout-Mäusen eine erhöhte Frequenz der Kontraktionen des ‚colonic migrating motor complex‘ (CMMC) im Vergleich mit wildtypischen Kontrollmäusen beschrieben, konnte Spencer (2013) keinen Effekt des nNOS-Knockouts auf die CMMC feststellen. Diese Widersprüche könnten jedoch in der Wahl des Knockout-Mausmodelles liegen, da die Mauslinie, welche ursprünglich von Huang *et al.* (1993) generiert wurde, noch über eine aktive Spleißvariante der nNOS verfügt (Eliasson *et al.*, 1997). Da diese Spleißvariante vor allem im Gastrointestinaltrakt

exprimiert wird (Saur *et al.*, 2002), stellt dieses Knockout-Mausmodell für die gastrointestinale Motilitätsforschung kein geeignetes Mausmodell dar. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Knockout-Mauslinien mit Deletion der NO-GC verwendet. In diesen Mäusen waren alle beobachteten NO-vermittelten Effekte nicht mehr vorhanden (Friebe *et al.*, 2007; Groneberg *et al.*, 2010). Dieses Knockout-Modell bietet demnach einen neuen Ansatz zur Analyse der nitrogenen Regulation der gastrointestinalen Motilität. Die spezifischen Kontraktionsmuster des Colons wurden in dieser Arbeit in zweierlei Hinsicht in globalen und zellspezifischen Knockout-Mäusen analysiert: Einerseits wurden kleine Colonringe mittels Myographiestudien (Abschnitt 5.2.1.) untersucht, andererseits wurden Kontraktionsmusterkarten (Abschnitt 5.2.2.) zur Analyse der Kontraktionen entlang des gesamten Colons herangezogen.

Wie schon seit langem bekannt, steht die glatte Muskelschicht des Colons unter stetigem inhibitorischen Einfluss, welcher hauptsächlich durch NO vermittelt wird (Gillespie *et al.*, 1989; Keef *et al.*, 1997; Dickson *et al.*, 2010). Dementsprechend führte der spezifische NO-GC-Inhibitor ODQ zu einer Erhöhung des Muskeltonus in Colonringen (siehe Abbildung 16), was auf eine basale Ausschüttung von NO rückschließen lässt. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung der NO-GC durch einen NO-Donor in WT- und ICC-GCKO-Colon zu einer Verminderung des Muskeltonus (siehe Abbildung 15). Colon von GCKO-, SMC-GCKO- und SMC/ICC-GCKO-Tieren zeigten dagegen weder bei der NO-Gabe noch bei ODQ-Hemmung eine Veränderung des Muskeltonus. Dies weist darauf hin, dass die NO-GC spezifisch in SMC die NO-abhängige Regulation des Muskeltonus vermittelt.

Des Weiteren wurden die Kontraktionsmusterkarten zum Vergleich der absoluten Durchmesser herangezogen. Hier wurde anhand von Plot-Profilen der Durchmesser von proximalem und distalem Colon ausgewertet. Nach der Applikation von L-NAME zeigten bis auf GCKO alle Genotypen einen leicht verringerten Durchmesser des distalen Colons. Wider Erwarten führte L-NAME jedoch zu einer Vergrößerung des Durchmessers von proximalem Colon. Diese Ergebnisse scheinen zunächst den Schlussfolgerungen der Myographiestudien zu widersprechen, die eine Verringerung des proximalen Colondurchmessers vermuten lassen. Die starke Vergrößerung des Durchmessers des proximalen Colons schien in diesem Fall vielmehr Folge der experimentellen Bedingungen als ein NO-vermittelter Effekt zu sein, da aufgrund der distalen Kontraktion die stetig nachströmende Flüssigkeit im proximalen Colon gestaut wurde. Zudem sollte beim Vergleich der absoluten Durchmesserwerte beachtet werden, dass die GCKO-Tiere, bedingt durch ihren starken gastrointestinalen Phänotyp, in einem geringeren Alter verwendet wurden als die zellspezifischen Knockout-Tiere.

5.2.1. Kontraktionsanalyse anhand der Myographiestudien

Mithilfe der Myographie-Studien konnten in proximalem Colon drei verschiedene Kontraktionstypen gemessen werden (siehe Abbildung 9A): Kleine, hochfrequente Ripples (a), mittlere Kontraktionen (b) sowie große Kontraktionen (c). Da die Ripples, die mittleren und großen Kontraktionen auf verschiedene Weise durch die NO-GC moduliert werden, sollen die einzelnen Kontraktionstypen im Folgenden separat diskutiert werden.

(a) Ripples

Hochfrequente Kontraktionen wurden in allen Colonpräparationen aller Genotypen gemessen. Im Gegensatz zu anderen Kontraktionstypen des Colons haben die Ripples keine propulsive Aufgabe, sondern dienen vielmehr der Durchmischung des Darminhaltes (Chen *et al.*, 2013). Frequenz und Dauer der Ripples unterschieden sich nicht zwischen den Genotypen. Auch die Applikation von TTX hatte keinen Einfluss auf die Ripples, was deren myogenen Ursprung impliziert. Die Schrittmacherpotentiale zur Entstehung dieser Kontraktionen werden von ICC-SMP generiert (Yoneda *et al.*, 2004). Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte keine NO-GC-Expression in ICC-SMP nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10).

Die Ergebnisse der Myographiestudien lassen demnach eine NO-unabhängige Regulation der Ripples vermuten, was durch ein Fehlen der NO-GC in ICC-SMP erklärt werden kann.

(b) Mittlere Kontraktionen

In WT-Colon traten die mittleren Kontraktionen diskontinuierlich zwischen den großen Kontraktionen auf. Im Gegensatz dazu zeigte GCKO-Colon sehr ausgeprägte und konstant auftretende mittlere Kontraktionen. Inhibition der NO-GC durch ODQ führte in WT-Colon zu Kontraktionen, wie sie in GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen gemessen wurden. Diese Daten zeigen, dass basal ausgeschüttetes NO und die daraus resultierende Aktivierung der NO-GC die mittleren Kontraktionen hemmt. In Anwesenheit von TTX konnten die mittleren Kontraktionen weiterhin gemessen werden, jedoch hatte die Applikation von TTX in allen Genotypen eine Verlängerung der Dauer der Kontraktionen zur Folge (siehe Abbildung 12-14; Tabelle 2). Diese Ergebnisse zeigen den myogenen Ursprung der mittleren Kontraktionen, welche neben NO vermutlich noch von weiteren inhibitorischen Neurotransmittern moduliert werden.

Als mögliches Entstehungszentrum der mittleren Kontraktionen kommen die Schrittmacherzellen des proximalen Colons in Frage (Yoneda *et al.*, 2004). Die Schrittmacheraktivität der ICC-MY äußert sich in oszillierenden Membranpotentialschwankungen, welche an die SMC weitergeleitet werden (Takeda *et al.*, 2008; Blair *et al.*, 2014). Ca^{2+} -Messungen zeigten, dass diese Aktivität zwischen

einzelnen CMMC vermindert ist (Bayguinov *et al.*, 2010). Diese Inhibition wird durch die permanente Aktivierung inhibitorischer Nerven und der daraus resultierenden NO-Freisetzung vermittelt. Dementsprechend wird die elektrische Aktivität der ICC-MY durch TTX verstärkt (Bayguinov *et al.*, 2010).

Diese Erkenntnisse können zur Erklärung des Kontraktionsmusters in WT-Colon herangezogen werden: Hier ist das diskontinuierliche Auftreten der mittleren Kontraktionen unter Kontrollbedingungen zwischen den CMMC vermutlich Folge einer permanenten Inhibition der elektrischen Aktivität innerhalb der ICC-MY. Demnach führt die Inhibition des NO/cGMP-Signalweges durch ODQ, L-NAME oder TTX zu einer Unterbindung des nitrergen Einflusses und somit zu einem kontinuierlichen Auftreten der mittleren Kontraktionen (siehe Abbildung 9, 11 und 14). Dies zeigt erneut die zentrale Rolle von NO als Neurotransmitter bei der Modulation und Koordination der mittleren Kontraktionen.

Die Ergebnisse der Evaluierung von zellspezifischen Knockout-Tiere lassen einen komplexen Regulationsmechanismus vermuten: Überraschenderweise zeigten Colon von ICC-GCKO- und SMC-GCKO-Tieren ein WT-Colon-ähnliches Kontraktionsmuster. Erst die gleichzeitige Deletion der NO-GC in beiden Zelltypen führte zu dem charakteristischen Kontraktionsmuster, welches in GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen gemessen wurde. Dies könnte durch eine parallele NO-GC-Aktivität in SMC und ICC erklärt werden, die die mittleren Kontraktionen moduliert: Die NO-GC in SMC beeinflusst die mittleren Kontraktionen wahrscheinlich vorwiegend über die Regulation des Muskeltonus, während die NO-GC in ICC mit der Schrittmacheraktivität interagiert. In bereits publizierten Studien der Arbeitsgruppe an der longitudinalen Muskelschicht konnte die NO-GC in ICC als essentieller Modulator der spontanen Kontraktionen identifiziert werden (Lies *et al.*, 2015). Hier führte bereits die spezifische Deletion der NO-GC in ICC zu einer verlängerten Dauer der spontanen Kontraktionen mit gleichzeitiger Verringerung der Frequenz. Diese Veränderungen waren ebenfalls in GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen sowie in WT- und SMC-GCKO-Colon in der Anwesenheit von ODQ, L-NAME oder TTX zu beobachten (Lies *et al.*, 2015).

Die spontanen Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht, die in dieser Arbeit betrachtet werden, scheinen jedoch wesentlich komplexer reguliert zu sein. Eine mögliche physiologische Begründung hierfür könnte die Relevanz des Muskeltonus beider Muskelschichten sein. Im Gegensatz zur longitudinalen Muskelschicht spielt der Muskeltonus eine essentielle Rolle in der zirkulären Muskelschicht: Hier sind tonische Kontraktionen besonders wichtig, um die Stärke der propulsiven Kontraktion zu definieren. Im Gegensatz dazu wird in der longitudinalen Muskelschicht keine tonische

Kontraktion generiert. Die Kontraktionen der longitudinalen Muskelschicht, die eine Verkürzung der Darmlänge zur Folge haben, unterstützen vielmehr die Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht (Smith & Robertson, 1998).

Frequenz und Dauer der spontanen Kontraktionen beider Muskelschichten waren interessanterweise nahezu identisch (Tabelle 6; Lies *et al.*, 2015). Die leichten Abweichungen der Werte zwischen longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht unter Kontrollbedingungen und nach der Applikation von ODQ sind vermutlich durch die unterschiedlichen Präparationstechniken bedingt. Des Weiteren erschwerte das Auftreten der Ripples und großen Kontraktionen in der zirkulären Muskelschicht die Analyse der Frequenz, da die mittleren Kontraktionen von diesen zeitweilig unterbrochen wurden. Lediglich nach Applikation von TTX konnte die Frequenz der mittleren Kontraktionen ungehindert bestimmt werden. In Anwesenheit von TTX ist die Frequenz sowohl zwischen WT- und GCKO-Colon als auch longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht identisch (Abbildung 34).

In der zirkulären Muskelschicht bilden die Ripples einen Grundrhythmus aus, der auch während des Auftretens der mittleren Kontraktionen erhalten bleibt. Das Fehlen dieses Rhythmus in der longitudinalen Muskelschicht kann durch die große räumliche Distanz der longitudinalen Muskelschicht zu den ICC-SMP, den Schrittmacherzellen der Ripples, erklärt werden.

Die identische Ausprägung der mittleren Kontraktionen in beiden Muskelschichten weist dagegen auf einen gemeinsamen Schrittmacher hin. Das hierfür in Frage kommende zweite Schrittmacherzentrum des Gastrointestinaltrakts, das durch die ICC-MY gebildet wird, verfügt dabei über eine ideale Lokalisation für die Innervation beider Muskelschichten (Smith *et al.*, 1987a; Lee *et al.*, 2009; Bayguinov *et al.*, 2010). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die longitudinale und die zirkuläre Muskelschicht zwar nicht direkt miteinander verbunden sind, die ICC-MY jedoch als Vermittler zwischen diesen beiden Schichten fungieren (Liu *et al.*, 1998; Spencer *et al.*, 2007).

(c) Große Kontraktionen

Vorangegangene Studien anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Colonpräparationen eine bestimmte Länge nicht unterschreiten dürfen, um *in vitro* CMMC generieren zu können (Lyster *et al.*, 1993; Spencer *et al.*, 2005; Hibberd *et al.*, 2017). Erst kürzlich zeigten Costa *et al.* (2017), dass eine Verkürzung der funktionalen Colonegmente von Meerschweinchen in einer unregelmäßigen Motoraktivität resultiert. Dennoch wurden in der vorliegenden Arbeit Myographiestudien an Colonringen mit einer Länge von lediglich 2,5 mm durchgeführt. Die Messungen zeigten, wie bereits erwähnt, drei verschiedene Kontraktionstypen. Die großen Kontraktionen traten in WT-Colon

Tabelle 6: Vergleich der Kontraktionstypen von longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht in WT- und GCKO-Mäusen

		longitudinal		zirkulär	
Kontraktionstypen		mittlere Kontraktionen		<ul style="list-style-type: none"> • Ripples • mittlere Kontraktionen • große Kontraktionen 	
		WT	GCKO	WT	GCKO
Frequenz	Kontrolle	4,6 ± 0,4	1,9 ± 0,1	3,3 ± 0,3	2,0 ± 0,1
	ODQ	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,5 ± 0,3	1,7 ± 0,2
	TTX	3,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,9 ± 0,1
Dauer	Kontrolle	8,8 ± 0,7	18,9 ± 1,2	4,7 ± 0,3	12,7 ± 1,6
	ODQ	18,3 ± 1,5	16,7 ± 1,6	11,0 ± 1,3	13,0 ± 2,1
	TTX	11,6 ± 1,5	14,1 ± 1,6	15,1 ± 2,0	16,1 ± 1,2

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Tieren.

Daten der longitudinalen Muskelschicht sind aus Lies, Beck et al. (2015) entnommen.

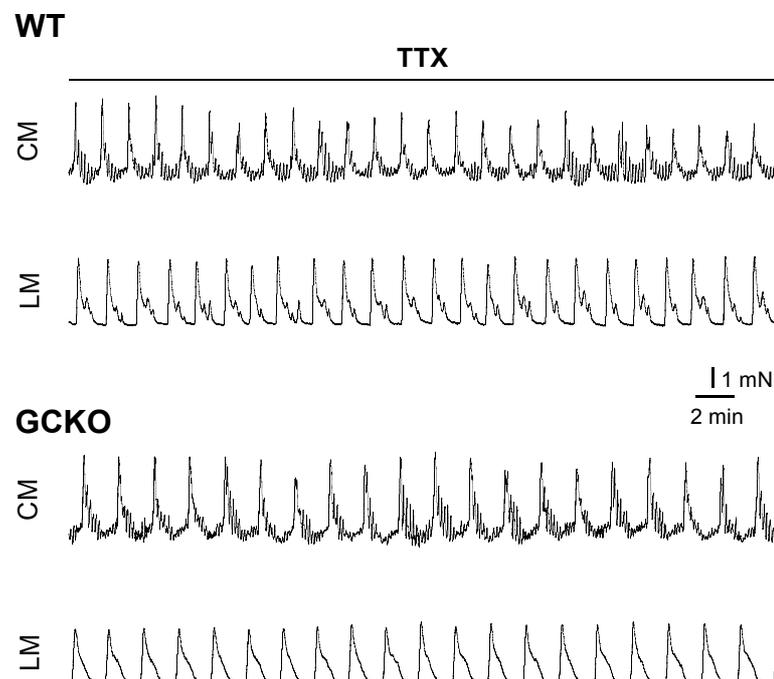


Abbildung 34: Spontane Kontraktionen in zirkulärer und longitudinaler Muskelschicht

Dargestellt sind repräsentative Spuren der Myographiemessungen von zirkulärer (CM) und longitudinaler (LM) Muskelschicht von proximalem Colon von WT und GCKO in Anwesenheit von 1 µM TTX. Daten der longitudinalen Muskelschicht aus Lies, Beck et al. (2015).

sporadisch mit einer Dauer von ca. 40 s auf. Sowohl die pharmakologische Inhibition als auch die genetische Inaktivierung der NO-GC führten zu regelmäßig auftretenden großen Kontraktionen mit erhöhter Frequenz. Die Frequenz der großen Kontraktionen stimmte mit den bereits publizierten Daten der CMMC überein (Sarna, 1985; Bywater *et al.*, 1989; Fida *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den Ripples und mittleren Kontraktionen wurden die großen Kontraktionen durch TTX oder Hexamethonium unterdrückt. Dies ist ebenfalls für CMMC in langen Colonpräparaten beschrieben (Bywater *et al.*, 1989). Aus diesem Grund werden die hier gemessenen großen Kontraktionen der Colonringe trotz der geringen Präparatgröße im Folgenden als Äquivalent der Kontraktionen des CMMC im gesamten Colon angesehen.

Die Myographiestudien mit Colonringen zeigten, dass die Ausführung der großen Kontraktionen NO-unabhängig erfolgt, da die Form und Dauer der Kontraktionen in allen Genotypen identisch war (siehe Tabelle 3). Allerdings schien die Frequenz NO-GC-abhängig moduliert zu sein: GCKO-Colon zeigte eine erhöhte Frequenz der großen Kontraktionen im Vergleich zu WT-Colon. In Anwesenheit von ODQ glich die Frequenz der großen Kontraktionen in WT-Colon der von GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen. Die Analyse der zellspezifischen Knockout-Tiere lieferte nach der Zugabe von ODQ dagegen keine eindeutigen Ergebnisse: Während das Kontraktionsmuster von ICC-GCKO-Colon mit dem von WT-Colon identisch war, blieb das sporadische Kontraktionsmuster von SMC-GCKO-Colon in Anwesenheit von ODQ erhalten. Eine Erklärung hierfür konnte bislang noch nicht gefunden werden. Dennoch kann aus den Ergebnissen von SMC/ICC-GCKO geschlossen werden, dass die NO-GC sowohl in SMC als auch in ICC die Frequenz reguliert. In diesen Tieren war die Frequenz der großen Kontraktionen bereits unter Kontrollbedingungen erhöht und ODQ führte nicht zu einer weiteren Erhöhung. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese von Dickson *et al.* (2010), die eine NO-vermittelte Hyperpolarisation der glatten Muskulatur zur Regulation der CMMC-Frequenz annehmen.

5.2.2. Kontraktionsanalyse anhand der Kontraktionsmusterkarten

Wie bereits erläutert, werden die großen Kontraktionen im Gegensatz zu den mittleren Kontraktionen und Ripples als Äquivalent der propulsiven Kontraktionen (‘long distance contractions’ = LDC) des CMMC betrachtet, welche sich entlang der gesamten Länge des Colons fortpflanzen. Dieser Aspekt konnte jedoch anhand der Myographiestudien nicht analysiert werden, da hier lediglich die Kraftänderungen eines kleinen Colonabschnitts gemessen wurde. Aus diesem Grund wurden ‘whole colon’-Präparationen durchgeführt und die LDC mithilfe von Kontraktionsmusterkarten näher charakterisiert.

Die Entstehung der CMMC ist bislang noch unklar. Generell wird in der Literatur über eine gleichzeitige Ausschüttung von exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern diskutiert. Eine Theorie vermutet eine aktive Aufhebung der tonischen Aktivität inhibitorischer Nerven als entscheidend für die Generierung von CMMC (Bywater *et al.*, 1989; Spencer, 2001; Bayguinov *et al.*, 2010). Die zweite Theorie postuliert dagegen die kontrollierte Ausschüttung von Acetylcholin und Tachykininen aus exzitatorischen Motorneuronen als Initiatoren der CMMC (Brierley *et al.*, 2001). Die nitric oxide Signaltransduktion spielt in jedem Fall eine entscheidende Rolle bei der Generation und Modulation der CMMC. Jedoch ist speziell die Beteiligung der einzelnen NO-GC-exprimierenden Zellen bislang noch nicht detailliert bekannt. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten zwei NO-vermittelte Effekte auf die LDC:

Erstens führte die verminderte NO-Synthese zu einer Erhöhung der Frequenz der LDC, was auch schon die Myographiestudien der Colonringe gezeigt haben (a). Zweitens ist die Synchronisation der Kontraktionen entlang des Colons verändert, was mit einer beeinträchtigten Effektivität der Kontraktionen einhergeht (b). Diese beiden Aspekte sollen im Folgenden detailliert diskutiert werden.

(a) Frequenz

Die Frequenz der LDC war in GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu WT-, ICC-GCKO- und SMC-GCKO-Colon erhöht (siehe Abbildung 18). In diesen drei Genotypen führte der nNOS-Inhibitor L-NAME zu einer Erhöhung der Frequenz, welche dann identisch mit der von GCKO-Colon war. Damit zeigt sich, dass basales NO die Frequenz der LDC drosselt. Des Weiteren implizieren diese Ergebnisse, dass die inhibitorische Wirkung auf die Generierung der LDC nicht allein durch die NO-GC in ICC oder SMC vermittelt wird. Vielmehr liegt dem Regulationsmechanismus vermutlich ein synergetischer Effekt der NO-GC beider Zelltypen zu Grunde. In den SMC scheint NO über Regulation des Muskeltonus die Frequenz der LDC mitzubestimmen. Im Gegensatz dazu werden über die NO-GC in ICC vermutlich mehrere Parameter moduliert: Die NO-GC in ICC-IM sorgt dafür, dass die glatte Muskulatur des Colons in einem hyperpolarisierten Zustand gehalten wird (Dickson *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Außerdem scheint die NO-GC die Schrittmacheraktivität der ICC-MY zu beeinflussen. Dies ist von besonderem Interesse, da Erkenntnisse anderer Studien die Generation der CMMC nicht, wie bislang vermutet, als spezifisches neuronales Ereignis ansehen, sondern eine Beteiligung des ICC-Netzwerks an den Regulationsmechanismus vermuten (Lee *et al.*, 2009; Dickson *et al.*, 2010). In ICC-MY führt NO zu einer Inhibition der elektrischen Aktivität, welche in der Anwesenheit von L-NAME aufgehoben wird (Bayguinov *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Eine verstärkte Aktivität der ICC-MY in Kombination mit der erhöhten Erregbarkeit der SMC könnte eine Erklärung für eine

Erhöhung der Frequenz der LDC in GCKO-Colon bzw. in Anwesenheit von Inhibitoren des NO/cGMP-Signalweges sein. Die Analyse eines SMC/ICC-GCKO würde Aufschluss darüber geben, ob eine Deletion der NO-GC in beiden Zellen zu einer Frequenzzunahme führt oder ob noch andere Zelltypen an der Regulation beteiligt sind.

(b) Effektivität

Unsere Studien zeigten außerdem eine NO-abhängige Regulation der Effektivität der propulsiven Kontraktionen. In WT- und ICC-GCKO-Colon hatte jede Kontraktion einen Ausfluss zur Folge (siehe Abbildung 18). Colon von GCKO-, SMC-GCKO-Mäusen wiesen jedoch erhebliche Beeinträchtigungen der Effektivität auf. Dies äußerte sich in einer großen Anzahl von Kontraktionen, die keinen Ausfluss zur Folge hatten.

Bei genauer Betrachtung der einzelnen LDC konnte eine veränderte Form der Kontraktionen festgestellt werden: Das Colon kontrahierte nahezu synchron entlang des gesamten Colons, wobei allerdings keine gerichtete fortlaufende Kontraktion zu erkennen war (siehe Abbildung 17B). In Anwesenheit von L-NAME wurde dieses Muster auch in ICC-GCKO- und WT-Colon beobachtet (siehe Abbildung 20 und 21). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die verminderte Effektivität eine Folge mangelnder Synchronisation der Kontraktionen entlang des Colons ist und NO bei diesem Mechanismus eine wichtige Rolle spielt.

Einen besonders auffälligen Phänotyp zeigte Colon von SMC-GCKO-Tieren: Während der Großteil der Kontraktionen keinen Ausfluss verursachte, gab es einige sehr effektive Kontraktionen, die eine große Menge von Flüssigkeit austrieben (siehe Abbildung 19). Im Gegensatz dazu waren diese hocheffizienten Kontraktionen in GCKO-Colon nicht vorhanden. Dies lässt zwar eine übergeordnete Funktion der NO-GC in SMC für die Synchronisation der Kontraktionen entlang des Colons vermuten, impliziert jedoch gleichzeitig eine untergeordnete Beteiligung der NO-GC in anderen Zelltypen. Wie bereits erwähnt, scheint das ICC-Netzwerk eine wichtige Rolle bei der Modulation der CMMC zu spielen (Lee *et al.*, 2009; Dickson *et al.*, 2010). Die ICC-MY sind im Colon nur gelegentlich untereinander bzw. mit den SMC der zirkulären und longitudinalen Muskelschicht verbunden (Lee *et al.*, 2009). Dies hat zur Folge, dass innerhalb des ICC-Netzwerks keine direkte Synchronisation des elektrischen Signals stattfindet und deshalb lediglich vereinzelt SMC der longitudinalen und zirkulären Muskelschicht erregt werden (Smith *et al.*, 1987a; Keef *et al.*, 1997; Rae *et al.*, 1998). Erst die Summation der von den ICC-MY ausgehenden Signale in den SMC führt zu einer Synchronisation der elektrischen Signale und damit zu einer koordinierten Kontraktion der glatten Muskelschicht (Smith *et al.*, 1987a, b; Keef *et al.*, 1997). Die elektrische Aktivität der ICC-MY scheint jedoch vor allem durch sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Neurone koordiniert zu werden. Ca²⁺-Messungen in Colon von Kaninchen zeigten, dass

die Aktivierung inhibitorischer Neurone ein synchrones, verringertes Ca^{2+} -Signal innerhalb des ICC-MY-Netzwerks zur Folge hat (Lee 2009). Eine Aktivierung der exzitatorischen Neurone dagegen führt zu einer synchronen, intrazellulären Ca^{2+} -Welle innerhalb des ICC-MY-Netzwerkes, das an die SMC der longitudinalen und zirkulären Muskelschicht weitergegeben wird (Lee *et al.*, 2009).

Dies ermöglicht die Schlussfolgerung, dass eine Synchronisation des elektrischen Signals der ICC-MY einerseits durch neuronalen Einfluss vermittelt wird, andererseits innerhalb der SMC stattfindet. Gleichzeitig kann auf eine übergeordnete Funktion der SMC innerhalb des Synchronisationsmechanismus geschlossen werden. Da die NO-abhängigen Modulationsmechanismen in ICC-MY und ICC-IM in SMC-GCKO-Colon nicht beeinträchtigt sind, können in diesem Genotyp gelegentlich hocheffektive Kontraktionen entstehen. Auch an dieser Stelle wäre interessant, ob SMC/ICC-GCKO-Colon unter Kontrollbedingungen das gleiche Kontraktionsmuster aufweist, wie es in GCKO-Colon zu beobachten ist. Dies würde die Beteiligung der NO-GC in beiden Zelltypen an der Synchronisation der Kontraktionen aufweisen.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen am gesamten Colon, dass die Beteiligung von NO bei der Generierung und Modulation der LDC nicht nur auf die Regulation der Relaxationsphase beschränkt ist, sondern einem komplexen Regulationsmechanismus folgt: Die Modulation der Frequenz ist bedingt durch die NO-GC in SMC und ICC, wohingegen die Synchronisation und die damit einhergehende Effektivität der Kontraktionen vornehmlich durch die NO-GC innerhalb der SMC reguliert wird. Die NO-GC in den ICC übernimmt hierbei eine untergeordnete Rolle.

5.2.3. Schlussfolgerung – NO-GC-vermittelte Modulation der Colonmotilität

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Aufschluss über die komplexe Modulation der spontanen Kontraktionen durch die NO-GC innerhalb der ICC und SMC. Einerseits scheint die NO-GC in den Zellen der glatten Muskulatur über die Regulation des Tonus die mittleren sowie die großen Kontraktionen zu beeinflussen, andererseits kann der NO-GC in ICC eine Interaktion mit der Schrittmacheraktivität zugeschrieben werden. Ein sichtbarer Effekt kann jedoch nur bei gleichzeitiger Deletion der NO-GC in ICC und SMC detektiert werden, was auf eine kompensatorische Wirkung der NO-GC im jeweils anderen Zelltyp hinweist. Des Weiteren scheint die NO-GC in den SMC eine entscheidende Rolle bei der Synchronisation der LDC zu spielen. Die Frequenz der LDC wird dagegen über einen komplexen Mechanismus reguliert, in den sowohl die NO-GC in SMC als auch ICC involviert sind.

5.3. Potentielle Beteiligung der NO-GC an der Adenomentwicklung

Das Colonkarzinom zählt derzeit zu einer der häufigsten Krebserkrankungen (Siegel *et al.*, 2017). Als Vorstufe werden Polypen angesehen, welche die ersten Folgen einer Entgleisung des komplex regulierten Gleichgewichtes der mukosalen Zellerneuerung darstellen (Fearon & Vogelstein, 1990). Hierbei sind eine Vielzahl von Regulationsmechanismen beteiligt, die jedoch zum Teil noch nicht detailliert erforscht sind. Vor allem die Rolle von NO in Hinblick auf die Adenom- bzw. Karzinomentwicklung ist derzeit sehr unklar.

In der in dieser Arbeit verwendeten SMC-GCKO-Mauslinie wurde bei den beschriebenen Untersuchungen zufällig die Entwicklung von Verdickungen der Mukosa festgestellt. Bei diesen Tieren wird die Cre-induzierte Deletion des Exon 10 unter der Kontrolle des SMMHC-Promotors aktiviert. Allerdings werden tumorigene Entartungen häufig in genetisch manipulierten Mäusen vorgefunden. Daher bestand zunächst die Frage, ob dieser Phänotyp tatsächlich der Deletion der NO-GC zugeordnet werden kann. Ein Beispiel aus der Literatur stellt die Studie von Sasaki *et al.* (2000) dar, welche eine Korrelation der Deletion des PI3K-Gens mit der Entstehung von colorectalen Tumoren postuliert. Die Ergebnisse wurden jedoch einige Jahre später widerrufen (Sasaki *et al.*, 2003). Um auszuschließen, dass es sich bei dem Phänotyp in der hier verwendeten Mauslinie ebenfalls um einen sekundären Effekt handelt, wurden zunächst unterschiedliche Mausgruppen analysiert. Die Tatsache, dass Tiere der SMC-GCKO-Mauslinie, welche nicht mit Tamoxifen behandelt wurden, keine Adenome entwickelten, lassen darauf schließen, dass es sich mit großer Sicherheit um einen Tamoxifen-abhängigen Effekt handelt. Da jedoch heterozygote Kontrolltiere, die ebenfalls mit Tamoxifen induziert wurden keine Adenome entwickelten, kann Tamoxifen als direkte Ursache der Adenomentwicklung ausgeschlossen werden. Als dritte Kontrollgruppe wurden SMC-GCKO-Tiere analysiert, welche vor Jahren zur Züchterhaltung ausgelagert wurden. Anhand dieser Tiere sollte ausgeschlossen werden, dass eine sekundär entstandene Mutation die Adenombildung bedingt. Alle diese Tiere entwickelten nach Tamoxifen-Behandlung Adenome. Basierend auf diesen Analysen wird daher von einem spezifischen Effekt der NO-GC-Deletion in Bezug auf die Adenomentwicklung ausgegangen. Verwunderlich war lediglich, dass in GCKO-Tieren zu keinem Zeitpunkt Colon-Adenome vorgefunden wurden. Da es sich bei diesen Tieren jedoch nicht um eine mit Tamoxifen induzierte Knockout-Linie handelt, besteht die Möglichkeit, dass die fehlenden NO-abhängigen Effekte während der Entwicklung kompensiert werden.

Bislang gibt es in der Literatur wenige Hinweise auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen dem NO-GC/cGMP-Signalweg und einer Adenomentwicklung. Es wurde

lediglich die Beteiligung der Guanylyl-Cyclase C (GC-C) in der Tumorentwicklung näher untersucht (Notterman *et al.*, 2001; Glebov *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2012; Blomain *et al.*, 2016). Dabei wird der GC-C eine wichtige Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Homöostase mit gleichzeitiger Beeinflussung der Myofibroblastenaktivität zugeschrieben (Gibbons *et al.*, 2013). Eine potentielle Beteiligung der NO-GC wurde lediglich von Li *et al.* (2015) postuliert, die eine gesteigerte PDE-Expression und damit eine verminderte cGMP-Konzentration in der Zelle mit einer wachstumsstimulierenden Wirkung auf die Tumorzellen in Verbindung brachten. In dieser Studie werden sowohl die NO-GC als auch die GC-C als potentielle Quellen der cGMP-Synthese in Betracht gezogen. Eine Erhöhung der cGMP-Konzentration durch die Inhibition der PDE führte wiederum zu einem verminderten Tumorwachstum (Li *et al.*, 2015).

Bedingt durch die lückenhafte Datenlage wurde eine Genexpressionsanalyse auf mRNA-Basis in Kontrolltieren und SMC-GCKO-Tieren durchgeführt, um potentielle Effektoren zu identifizieren. Bedauerlicherweise lieferte die Genexpressionsanalyse kein einheitliches Expressionsmuster zwischen den SMC-GCKO-Mäuse. Dies könnte darin begründet sein, dass in SMC-GCKO-Tieren, verschiedene Entartungsstufen der Adenome verglichen wurden. Der Grad der Entartung geht vermutlich mit einer unkoordinierten Aktivierung einer Vielzahl an Genen einher. Dieses Problem könnte eventuell vermindert werden, indem die Genanalyse mit mRNA von makroskopisch unveränderten Mukosafalten von SMC-GCKO-Tieren wiederholt würde. Weiterhin ist anzumerken, dass lediglich 6 Tiere analysiert wurden und dies für die Identifizierung potentiell veränderter Effektoren eine sehr geringe Probenanzahl darstellt. Dennoch lieferte die Genanalyse vielversprechende Effektorandidaten zur Entwicklung möglicher Hypothesen zur NO-GC-bedingten Adenomentwicklung. Von besonderem Interesse war die Tatsache, dass der BMP-Antagonist Gremlin1 in den Adenomen hochreguliert war (log2FoldChange: 2,61). Eine verstärkte Expression von Gremlin1 konnte bislang auch in humanen Colonkarzinomen festgestellt werden (Namkoong *et al.*, 2006; Kosinski *et al.*, 2007). Gremlin ist vor allem im Kryptengrund stark exprimiert und wirkt dort als Inhibitor von BMP. BMP wiederum ist direkt für die Differenzierung epithelialer Zellen verantwortlich. Gremlin1 wird von Zellen der Lamina muscularis mucosae sowie kryptennahen Myofibroblasten exprimiert und sezerniert (Kosinski *et al.*, 2007). In diesen Zellen ließen die Daten der Reportermäuse eine aktive Cre-Rekombinase vermuten. Somit könnte die NO-GC in Myofibroblasten sowie in Zellen der Lamina muscularis mucosae die Bildung bzw. Sekretion von Gremlin1 beeinflussen. Damit wäre die NO-GC ein wichtiger Regulator innerhalb der Stammzellnische, der die differenzierenden Einflüsse von BMP unterbindet. Basierend auf unseren Beobachtungen würde eine Deletion der NO-GC zu einer verstärkten Bildung bzw. Sekretion von Gremlin führen,

was eine verminderte BMP-Aktivität zur Folge hätte. Die Rolle von BMP bei der Bildung von Adenomen bzw. colorectalen Karzinomen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Im Einklang mit unserer Hypothese zeigte Reynolds *et al.* (2014), dass eine verminderte BMP-Aktivität die Wahrscheinlichkeit der Adenom-zu-Karzinom-Transition verstärkt. Dem gegenüber beschrieben Lorente-Trigos *et al.* (2010) jedoch, dass eine Erhöhung der BMP-Aktivität die Ausbildung von colorectalen Tumoren fördert.

Kürzlich konnte Gremlin1 als wichtiger Marker für osteochondrale Stammzellen des Knochenmarks sowie retikuläre Stammzellen im Darm nachgewiesen werden (Worthley *et al.*, 2015). In dieser Studie wurden Mäuse verwendet, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Gremlin1-Promoters exprimiert (Grem1-CreER^{T2}-Maus). Durch die Generierung von Reporter-mäusen konnten Zellen mit aktivem Gremlin-Promotor in Myofibroblasten der periepithelialen-mesenchymalen-Achse identifiziert werden. Diese Mauslinie wird für weitere Studien zur Verfügung gestellt werden. In diesen Tieren soll analog zu den übrigen in dieser Arbeit verwendeten zellspezifischen Knockout-Tieren die NO-GC spezifisch in Grem1-exprimierenden Zellen ausgeschnitten werden. Nach der aufgestellten Hypothese würden diese Tiere, analog zu den SMC-GCKO-Tieren, ebenfalls starke Adenome entwickeln. Diese weiterführenden Versuche würden eindeutig zeigen, dass die NO-GC in Myofibroblasten sowie Zellen der Lamina muscularis mucosae in den Regulationsmechanismus der Epithelerneuerung involviert ist.

6. Zusammenfassung

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) ist ein zentrales Enzym der NO/cGMP-Signalkaskade, das über die Aktivierung von NO zur Bildung des second messengers cGMP führt. Die NO-GC setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, sodass zwei Isoformen des Enzyms gebildet werden können ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$). Da die genaue Verteilung der beiden Isoformen im Colon nicht bekannt ist, wurde diese im ersten Teil dieser Arbeit charakterisiert. Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung zeigten die Expression beider Isoformen sowohl in der glatten Muskelschicht als auch in der Submukosa und Lamina propria. Dabei war die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform ubiquitär, die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform dagegen hauptsächlich im Bereich des myenterischen Plexus vorzufinden.

In der glatten Muskelschicht des Colons ist die NO-GC in glatten Muskelzellen (SMC), interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) sowie Fibroblasten-ähnliche Zellen (FLC) exprimiert und hauptsächlich in die Modulation der gastrointestinalen Motilität involviert. Zur spezifischen Charakterisierung der Funktion der NO-GC in den einzelnen Zelltypen wurden Knockout-Mäuse generiert, denen die NO-GC global (GCKO) oder spezifisch in SMC (SMC-GCKO), ICC (ICC-GCKO) oder beiden Zelltypen (SMC/ICC-GCKO) fehlt. Anhand dieser Mausmodelle sollten im zweiten Teil dieser Arbeit die modulatorischen Effekte der NO-GC auf die spontanen Kontraktionen des Colons bestimmt werden. Zur Charakterisierung der spontanen Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht wurden Myographiestudien mit 2,5 mm langen Colonringen durchgeführt. Hierbei konnten drei verschiedene Kontraktionen gemessen werden: Kleine, hochfrequente Ripples, mittlere Kontraktionen und große Kontraktionen. Die detaillierte Analyse der einzelnen Kontraktionen zeigte einerseits eine NO-unabhängige Regulation der Ripples, andererseits eine NO-abhängige Modulation der mittleren und großen Kontraktionen über die NO-GC in SMC und ICC. Die NO-GC in SMC beeinflusst die Kontraktionen vermutlich vor allem über die Regulation des Muskeltonus der zirkulären Muskelschicht. Die NO-GC in ICC dagegen modifiziert die spontanen Kontraktionen möglicherweise über eine Veränderung der Schrittmacheraktivität. Allerdings führt erst ein Funktionsverlust des NO/cGMP-Signalweges in beiden Zelltypen zu einem sichtbar veränderten Kontraktionsmuster, das dem von globalen Knockout-Tieren glich. Dies weist auf eine kompensatorische Wirkung der NO-GC im jeweils anderen Zelltyp hin. Zur Analyse der propulsiven Kontraktionen entlang des gesamten Colons wurden Videoaufnahmen der Darmbewegungen in Kontraktionsmusterkarten transformiert. Zudem wurde der Darm durchspült und die Ausflusstropfen aufgezeichnet, um die Effektivität der Kontraktionen beurteilen zu können. Hierbei zeigte sich, dass eine Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges eine verminderte Effektivität der

Kontraktionen zur Folge hat und vermutlich durch eine beeinträchtigte Synchronisation der Kontraktionen erklärt werden kann. In diesem Regulationsmechanismus konnte vor allem der NO-GC in SMC eine übergeordnete Rolle zugewiesen werden.

Der dritte Teil der Arbeit thematisierte den Befund, dass SMC-GCKO-Tiere ca. 5 Monate nach Tamoxifen-Behandlung Entartungen der Mukosa entwickelten. Diese Entartung war lediglich in Tamoxifen-induzierten Knockout-Tieren vorzufinden. Histologische Analysen identifizierten die Entartungen als tubulovillöses Adenom. Die Genexpressionsanalyse von Mukosafalten von SMC-GCKO- und heterozygoten Kontrolltieren zeigte eine Vielzahl von Genen, welche spezifisch bei colorectalem Karzinom differenziell exprimiert sind. Einer dieser Faktoren war der BMP-Antagonist Gremlin1. Dieser Faktor erschien von besonderem Interesse, da er in Zellen der Lamina muscularis mucosae und kryptennahen Myofibroblasten exprimiert wird. Immunhistochemische Analysen ließen vermuten, dass diese Zellen sowohl die NO-GC als auch die Cre-Rekombinase unter dem SMMHC-Promotor exprimieren. Diese Arbeit liefert demnach Hinweise darauf, dass die NO-GC einen wichtigen Regulator innerhalb der Stammzellnische bildet. Die Deletion der NO-GC führt vermutlich zu einer verstärkten Bildung bzw. Sekretion von Gremlin1, was die Homöostase der mukosalen Erneuerung stört und somit zur Entwicklung von Adenomen führt.

7. Summary

The NO/cGMP signalling cascade is involved in many physiological processes. NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) is a key enzyme of this cascade, which is activated by NO and leads to the generation of the second messenger cGMP. As NO-GC is comprised of two subunits two different isoforms exist ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$). However, the detailed distribution of the two isoforms in the colon is not known. Therefore, in the first part of this thesis, immunohistochemical staining and in situ hybridization was performed. The results showed NO-GC expression in the smooth muscle layer as well as in the submucosa and the lamina propria. Whereas the $\alpha_1\beta_1$ isoform is expressed ubiquitously, expression of the $\alpha_2\beta_1$ isoform is concentrated on the myenteric plexus.

In the smooth muscle layer, NO-GC expression has been shown specifically in smooth muscle cells (SMC), interstitial cells of Cajal (ICC) and fibroblast-like cells (FLC). The function has been mainly associated with modulation of gastrointestinal motility. To specify the role of NO-GC on colonic motility in each cell type, mice lacking NO-GC globally (GCKO) or specifically in SMC (SMC-GCKO), ICC (ICC-GCKO) or in both

(SMC/ICC-GCKO) were used. First, organ bath studies were performed using small proximal colon rings of 2,5 mm size. These measurements showed three different contractions: small, high frequency ripples, intermediate contractions and large contractions. For each contraction type, NO dependence was analyzed: Ripples are regulated in a NO-independent manner. In contrast, intermediate and large contractions are modulated by NO via a mechanism involving both ICC and SMC: NO-GC in SMC most likely modulates contractions by setting muscle tone, whereas NO-GC in ICC interacts with the pacemaker activity.

Moreover, contractions along the whole colon were analyzed using spatiotemporal maps. These measurements revealed NO-GC to be related to the efficiency of propulsive long distance contractions (LDC). Impaired NO-GC signalling (e.g. in SMC-GCKO, GCKO mice or in the presence of NOS inhibitor L-NAME) resulted in altered appearance of LDC. Some of these LDC did not produce outflow. Thus, our results indicate a prominent role of NO-GC in SMC to synchronize contractions along the colon to result in effective propulsion.

The third part of the study focused on the potential involvement of NO-GC in adenoma development. This hypothesis was set up based on the observation that colon of SMC-GCKO mice showed mucosal swellings five months after tamoxifen treatment. Histological analysis assumed the mucosal swellings as tubulovillous adenoma. Subsequent gene expression analysis of mucosal folds of SMC-GCKO and heterozygous control mice identified a variety of differentially expressed genes, among them the BMP antagonist Gremlin1. This factor is potentially influenced by NO-GC as it is expressed by cells of the lamina muscularis mucosae and myofibroblasts closely located to the colonic crypts. Immunohistochemical analysis of tdTomato reporter mice assumed the same cells to express NO-GC under control conditions and active Cre recombinase in SMC-GCKO colon. Thus, this work hypothesizes NO-GC to be involved in the regulation of mucosal renewal. Deletion of NO-GC likely increases Gremlin1 generation and/or secretion, leading to altered mucosal renewal and finally resulting in adenoma development.

8. Literaturverzeichnis

- Aaij C & Borst P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**, 192-200.
- Alberti E, Mikkelsen HB, Wang XY, Diaz M, Larsen JO, Huizinga JD & Jimenez M. (2007). Pacemaker activity and inhibitory neurotransmission in the colon of Ws/Ws mutant rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1499-1510.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P & Toro L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* **273**, 32950-32956.
- Anderson CB, Neufeld KL & White RL. (2002). Subcellular distribution of Wnt pathway proteins in normal and neoplastic colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8683-8688.
- 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.
- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW & Michel T. (1995). Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **270**, 14582-14586.
- Barker N & Clevers H. (2010). Lineage tracing in the intestinal epithelium. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Chapter 5**, Unit5A 4.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ & Clevers H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-1007.
- Bayguinov PO, Hennig GW & Smith TK. (2010). Ca²⁺ imaging of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the murine large intestine. *J Physiol* **588**, 4453-4474.
- 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.
- Bienz M & Clevers H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311-320.
- Blair PJ, Bayguinov Y, Sanders KM & Ward SM. (2012). Relationship between enteric neurons and interstitial cells in the primate gastrointestinal tract. *Neurogastroent Motil* **24**, e437-e449.
- Blair PJ, Rhee PL, Sanders KM & Ward SM. (2014). The significance of interstitial cells in neurogastroenterology. *J Neurogastroenterol Motil* **20**, 294-317.
- Blomain ES, Pattison AM & Waldman SA. (2016). GUCY2C ligand replacement to prevent colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* **17**, 713-718.
- 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.
- Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH & Gingell C. (1996a). Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res* **8**, 47-52.
- Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC & Allen MJ. (1996b). Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol* **78**, 257-261.

- 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.
- Bosman FT, F. C & R.H. H. (2010). WHO classification of tumours of the digestive system. *Lyon: IARC Press* **417 p.**
- Brierley SM, Nichols K, Grasby DJ & Waterman SA. (2001). Neural mechanisms underlying migrating motor complex formation in mouse isolated colon. *Br J Pharmacol* **132**, 507-517.
- Bult H, Boeckxstaens 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. (2005). Phosphodiesterase 5 mechanisms and therapeutic applications. *Am J Cardiol* **96**, 29M-31M.
- 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.
- Bywater RA, Small RC & Taylor GS. (1989). Neurogenic slow depolarizations and rapid oscillations in the membrane potential of circular muscle of mouse colon. *J Physiol* **413**, 505-519.
- Cajal SR. (1889). Nuevas aplicaciones del metodo de coloracion De Golgi. *Gaceta Medica Catalana* **12**, 613-616.
- Cajal SR. (1893). Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *R Soc Biol (Paris)* **5**, 217,223.
- Cajal SR. (1911). Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebrates. Volume 2. . *Paris: Maloine*, 891-942.
- 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 JH, Zhang Q, Yu Y, Li K, Liao H, Jiang L, Hong L, Du X, Hu X, Chen S, Yin S, Gao Q, Yin X, Luo H & Huizinga JD. (2013). Neurogenic and myogenic properties of pan-colonic motor patterns and their spatiotemporal organization in rats. *PLoS One* **8**, e60474.
- Chhatwal VJ, Ngoi SS, Chan ST, Chia YW & Moochhala SM. (1994). Aberrant expression of nitric oxide synthase in human polyps, neoplastic colonic mucosa and surrounding peritumoral normal mucosa. *Carcinogenesis* **15**, 2081-2085.
- Corbin JD, Turko IV, Beasley A & Francis SH. (2000). Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* **267**, 2760-2767.
- Costa M, Wiklendt L, Keightley L, Brookes SJH, Dinning PG & Spencer NJ. (2017). New insights into neurogenic cyclic motor activity in the isolated guinea-pig colon. *Neurogastroenterol Motil.*
- Croner RS, Foertsch T, Brueckl WM, Guenther K, Siebenhaar R, Stremmel C, Matzel KE, Papadopoulos T, Kirchner T, Behrens J, Klein-Hitpass L, Stuerzl M, Hohenberger W & Reingruber B. (2005). Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa. *Int J Colorectal Dis* **20**, 353-362.
- 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.
- Davis H, Irshad S, Bansal M, Rafferty H, Boitsova T, Bardella C, Jaeger E, Lewis A, Freeman-Mills L, Giner FC, Rodenas-Cuadrado P, Mallappa S, Clark S, Thomas H, Jeffery R, Poulsom R, Rodriguez-Justo M, Novelli M, Chetty R, Silver A, Sansom OJ, Greten FR, Wang LM, East JE, Tomlinson I & Leedham SJ. (2015). Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat Med* **21**, 62-70.
- Deguchi A, Thompson WJ & Weinstein IB. (2004). Activation of protein kinase G is sufficient to induce apoptosis and inhibit cell migration in colon cancer cells. *Cancer Res* **64**, 3966-3973.
- 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.
- Dickson EJ, Heredia DJ, McCann CJ, Hennig GW & Smith TK. (2010). The mechanisms underlying the generation of the colonic migrating motor complex in both wild-type and nNOS knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G222-232.
- Dimmeler S & Zeiher AM. (1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* **6**, 964-968.
- 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.
- 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.
- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH & Stasch JP. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 755-768.
- Farrugia G. (2008). Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* **20 Suppl 1**, 54-63.
- Fearon ER & Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.
- 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.
- Fida R, Lyster DJ, Bywater RA & Taylor GS. (1997). Colonic migrating motor complexes (CMMCs) in the isolated mouse colon. *Neurogastroenterol Motil* **9**, 99-107.
- 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, Turko IV & Corbin JD. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **65**, 1-52.
- Francis SH, Woodford TA, Wolfe L & Corbin JD. (1988). Types I alpha and I beta isozymes of cGMP-dependent protein kinase: alternative mRNA splicing may produce different inhibitory domains. *Second Messengers Phosphoproteins* **12**, 301-310.

- 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.
- 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.
- Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisak S, Krenacs T, Toth K, Leiszter K, Kalmar A, Tulassay Z & Molnar B. (2012). Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS One* **7**, e48547.
- 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.
- Garthwaite J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* **27**, 2783-2802.
- Geiselhoringer 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. (1981). Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* **132**, 71-74.
- Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W & Grimminger F. (2002). Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 895-900.
- Gibbons AV, Lin JE, Kim GW, Marszalowicz GP, Li P, Stoecker BA, Blomain ES, Rattan S, Snook AE, Schulz S & Waldman SA. (2013). Intestinal GUCY2C Prevents TGF-beta Secretion Coordinating Desmoplasia and Hyperproliferation in Colorectal Cancer. *Cancer Res* **73**, 6654-6666.
- Gillespie JS, Liu XR & Martin W. (1989). The effects of L-arginine and NG-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* **98**, 1080-1082.
- Glebov OK, Rodriguez LM, Soballe P, DeNobile J, Cliatt J, Nakahara K & Kirsch IR. (2006). Gene expression patterns distinguish colonoscopically isolated human aberrant crypt foci from normal colonic mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 2253-2262.
- Gonzalez A & Sarna SK. (2001). Neural regulation of in vitro giant contractions in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G275-282.
- 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.
- Groneberg D, Konig P, Koesling D & Friebe A. (2011). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is dispensable for nitrgenic signaling and gut motility in mouse intestinal smooth muscle. *Gastroenterology* **140**, 1608-1617.
- Groneberg D, Konig 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, Konig P, Jager 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 Nitroergic Relaxation in Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Knockout Mice. *Gastroenterology*.

- 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.
- Hagger R, Kumar D, Benson M & Grundy A. (2003). Colonic motor activity in slow-transit idiopathic constipation as identified by 24-h pancolonc ambulatory manometry. *Neurogastroenterol Motil* **15**, 515-522.
- Haley JE, Wilcox GL & Chapman PF. (1992). The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* **8**, 211-216.
- Han RN & Stewart DJ. (2006). Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 29-34.
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ & Clevers H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **303**, 1684-1686.
- Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, Van Den Brande JM, Keller JJ, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ & Peppelenbosch MP. (2004). Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* **126**, 111-121.
- Hashitani H, Garcia-Londono AP, Hirst GD & Edwards FR. (2005). Atypical slow waves generated in gastric corpus provide dominant pacemaker activity in guinea pig stomach. *J Physiol* **569**, 459-465.
- 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.
- He CL, Burgart L, Wang L, Pemberton J, Young-Fadok T, Szurszewski J & Farrugia G. (2000). Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow-transit constipation. *Gastroenterology* **118**, 14-21.
- Heath JP. (1996). Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int* **20**, 139-146.
- 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.
- Heredia DJ, Dickson EJ, Bayguinov PO, Hennig GW & Smith TK. (2009). Localized release of serotonin (5-hydroxytryptamine) by a fecal pellet regulates migrating motor complexes in murine colon. *Gastroenterology* **136**, 1328-1338.
- Heredia DJ, Dickson EJ, Bayguinov PO, Hennig GW & Smith TK. (2010). Colonic elongation inhibits pellet propulsion and migrating motor complexes in the murine large bowel. *J Physiol* **588**, 2919-2934.
- Hibberd TJ, Costa M, Travis L, Brookes SJH, Wattchow DA, Feng J, Hu H & Spencer NJ. (2017). Neurogenic and myogenic patterns of electrical activity in isolated intact mouse colon. *Neurogastroenterol Motil*.
- Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T & Mikoshiba K. (2005). Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem* **280**, 11723-11730.
- Horiguchi K & Komuro T. (1998). Ultrastructural characterization of interstitial cells of Cajal in the rat small intestine using control and Ws/Ws mutant rats. *Cell Tissue Res* **293**, 277-284.
- 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.
- Hou Y, Gupta N, Schoenlein P, Wong E, Martindale R, Ganapathy V & Browning D. (2006). An anti-tumor role for cGMP-dependent protein kinase. *Cancer letters* **240**, 60-68.
- 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. (1990). Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol* **67**, 1-7.
- 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. (2009). 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 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.
- Jaeger E, Webb E, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Rowan A, Broderick P, Walther A, Spain S, Pittman A, Kemp Z, Sullivan K, Heinemann K, Lubbe S, Domingo E, Barclay E, Martin L, Gorman M, Chandler I, Vijaykrishnan J, Wood W, Papaemmanuil E, Penegar S, Qureshi M, Consortium C, Farrington S, Tenesa A, Caizer JB, Kerr D, Gray R, Peto J, Dunlop M, Campbell H, Thomas H, Houlston R & Tomlinson I. (2008). Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* **40**, 26-28.
- 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.
- Jin NG, Koh SD & Sanders KM. (2009). Caffeine inhibits nonselective cationic currents in interstitial cells of Cajal from the murine jejunum. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C971-978.
- Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H & Batlle E. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* **17**, 1225-1227.
- Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG & Schutz G. (1997). The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* **11**, 1583-1595.
- 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.
- Karagiannis GS, Berk A, Dimitromanolakis A & Diamandis EP. (2013). Enrichment map profiling of the cancer invasion front suggests regulation of colorectal cancer progression by the bone morphogenetic protein antagonist, gremlin-1. *Mol Oncol* **7**, 826-839.
- Karagiannis GS, Musrap N, Saraon P, Treacy A, Schaeffer DF, Kirsch R, Riddell RH & Diamandis EP. (2015). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin-1 regulates colon cancer progression. *Biol Chem* **396**, 163-183.
- Keef KD, Murray DC, Sanders KM & Smith TK. (1997). Basal release of nitric oxide induces an oscillatory motor pattern in canine colon. *J Physiol* **499** (Pt 3), 773-786.

- Keilbach A, Ruth P & Hofmann F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem* **208**, 467-473.
- Kinzler KW & Vogelstein B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-170.
- Kitamura Y, Yokoyama M, Matsuda H & Shimada M. (1980). Coincidental development of forestomach papilloma and prepyloric ulcer in nontreated mutant mice of W/Wv and Sl/Slid 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 Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 and SK3) immunoreactivity in intestinal smooth muscles of the guinea-pig. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 18-25.
- Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch KD, Mulsch 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.
- Koesling D, Mergia E & Russwurm M. (2016). Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms. *Current Medicinal Chemistry* **23**, 2653-2665.
- Komuro T. (1999). Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech* **47**, 267-285.
- Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, Chan TL, Mifflin RC, Powell DW, Yuen ST, Leung SY & Chen X. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15418-15423.
- Kubes P. (1992). Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol* **262**, G1138-1142.
- Kurahashi M, Nakano Y, Hennig GW, Ward SM & Sanders KM. (2012). Platelet-derived growth factor receptor alpha-positive cells in the tunica muscularis of human colon. *J Cell Mol Med* **16**, 1397-1404.
- 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.
- 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.
- Lee HT, Hennig GW, Park KJ, Bayguinov PO, Ward SM, Sanders KM & Smith TK. (2009). Heterogeneities in ICC Ca²⁺ activity within canine large intestine. *Gastroenterology* **136**, 2226-2236.
- Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D & Shivakrupa R. (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* **23**, 16-43.
- Li N, Lee K, Xi Y, Zhu B, Gary BD, Ramirez-Alcantara V, Gurpinar E, Canzoneri JC, Fajardo A, Sigler S, Piazza JT, Chen X, Andrews J, Thomas M, Lu W, Li Y, Laan DJ, Moyer MP, Russo S, Eberhardt BT, Yet L, Keeton AB, Grizzle WE & Piazza GA. (2015). Phosphodiesterase 10A: a novel target for selective inhibition of colon tumor cell growth and beta-catenin-dependent TCF transcriptional activity. *Oncogene* **34**, 1499-1509.
- Lies B, Beck K, Keppler J, Saur D, Groneberg D & Friebe A. (2015). Nitroergic signalling via interstitial cells of Cajal regulates motor activity in murine colon. *J Physiol* **593**, 4589-4601.
- Lies B, Groneberg D, Gambaryan S & Friebe A. (2013). Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* **170**, 317-327.

- Lin CS, Lau A, Tu R & Lue TF. (2000). Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 628-635.
- Lin JE, Snook AE, Li P, Stoecker BA, Kim GW, Magee MS, Garcia AV, Valentino MA, Hyslop T, Schulz S & Waldman SA. (2012). GUCY2C opposes systemic genotoxic tumorigenesis by regulating AKT-dependent intestinal barrier integrity. *PLoS One* **7**, e31686.
- Lincoln TM & Cornwell TL. (1993). Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb J* **7**, 328-338.
- Lincoln TM, Thompson M & Cornwell TL. (1988). Purification and characterization of two forms of cyclic GMP-dependent protein kinase from bovine aorta. *J Biol Chem* **263**, 17632-17637.
- Liu LWC, Farraway L, Berezin I & Huizinga JD. (1998). Interstitial cells of Cajal: mediators of communication between circular and longitudinal muscle layers of canine colon. *Cell Tissue Res* **294**, 69-79.
- 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-Trigos A, Varnat F, Melotti A & Ruiz i Altaba A. (2010). BMP signaling promotes the growth of primary human colon carcinomas in vivo. *J Mol Cell Biol* **2**, 318-332.
- Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, Jones BA, Howard ML, McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Francis SH, Corbin JD, Beavo JA & Ferguson K. (1998). Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* **216**, 139-147.
- Lyster DJ, Bywater RA & Taylor GS. (1995). Neurogenic control of myoelectric complexes in the mouse isolated colon. *Gastroenterology* **108**, 1371-1378.
- Lyster DJK, Bywater RAR & Taylor GS. (1993). Regulation of the Frequency of Myoelectric Complexes in the Isolated Mouse Colon. *J Gastrointest Motil* **5**, 143-151.
- 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.
- Marletta MA. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927-930.
- Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F & Hofmann F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* **189**, 1255-1264.
- McAllister RM, Hirai T & Musch TI. (1995). Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. *Med Sci Sports Exerc* **27**, 1145-1151.
- 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.
- 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.
- Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, Bischoff E, Feurer A, Gerisch M, Kern A, Knorr A, Lang D, Muentner K, Radtke M, Schirok H, Schlemmer KH, Stahl E, Straub A, Wunder F & Stasch JP. (2009). Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *ChemMedChem* **4**, 853-865.
- Miyazono K, Kamiya Y & Morikawa M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* **147**, 35-51.
- 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.

- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B & Kinzler KW. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**, 1787-1790.
- 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.
- Moser AR, Pitot HC & Dove WF. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322-324.
- Mullis KB & Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- 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.
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U & Murad F. (1993). Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* **316**, 175-180.
- Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha SA, Cho GW, Hur SY, Kim TE & Kim JW. (2006). The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer* **6**, 74.
- Nathan CF & Hibbs JB, Jr. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**, 65-70.
- 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.
- Notterman DA, Alon U, Sierk AJ & Levine AJ. (2001). Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res* **61**, 3124-3130.
- Nusko G, Mansmann U, Partzsch U, Altendorf-Hofmann A, Groitl H, Wittekind C, Ell C & Hahn EG. (1997). Invasive carcinoma in colorectal adenomas: multivariate analysis of patient and adenoma characteristics. *Endoscopy* **29**, 626-631.
- 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.
- Okuno Y, Kondo T, Saeki A, Uchida E, Teraoka H & Kitazawa T. (2011). Colon-specific contractile responses to tetrodotoxin in the isolated mouse gastrointestinal tract. *Auton Autacoid Pharmacol* **31**, 21-30.
- 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.
- 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.
- Piazza GA, Xu SM, Klein-Szanto A, Ahnen DJ, Li H, Liu L, David M, Pamukcu R & Thompson WJ. (2000). Overexpression of cGMP phosphodiesterase (cG PDE) in colonic neoplasias compared to normal mucosa. *Gastroenterology* **118**, A282-A282.

- Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L & Jimenez M. (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G255-266.
- Powell AE, Wang Y, Li Y, Poulin EJ, Means AL, Washington MK, Higginbotham JN, Juchheim A, Prasad N, Levy SE, Guo Y, Shyr Y, Aronow BJ, Haigis KM, Franklin JL & Coffey RJ. (2012). The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* **149**, 146-158.
- Powell AK & Bywater RA. (2001). Endogenous nitric oxide release modulates the direction and frequency of colonic migrating motor complexes in the isolated mouse colon. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 221-228.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI & West AB. (1999). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**, C183-201.
- Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X & Mifflin RC. (2011). Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol* **73**, 213-237.
- Rae MG, Khoyi MA & Keef KD. (1998). Modulation of cholinergic neuromuscular transmission by nitric oxide in canine colonic circular smooth muscle. *Am J Physiol* **275**, G1324-1332.
- Ramalingam S, Daughtridge GW, Johnston MJ, Gracz AD & Magness ST. (2012). Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**, G10-20.
- Reid MB. (1998). Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* **162**, 401-409.
- Reynolds A, Wharton N, Parris A, Mitchell E, Sobolewski A, Kam C, Bigwood L, El Hadi A, Munsterberg A, Lewis M, Speakman C, Stebbings W, Wharton R, Sargen K, Tighe R, Jamieson C, Hernon J, Kapur S, Oue N, Yasui W & Williams MR. (2014). Canonical Wnt signals combined with suppressed TGFbeta/BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium. *Gut* **63**, 610-621.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S & Polakis P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* **262**, 1731-1734.
- 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 & Koesling D. (2004). NO activation of guanylyl cyclase. *Embo J* **23**, 4443-4450.
- Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F & Koesling D. (2002). Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for the sensitizing effect of YC-1. *J Biol Chem* **277**, 24883-24888.
- 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.
- Sanders KM, Hwang SJ & Ward SM. (2010). Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol* **588**, 4621-4639.
- Sanders KM, Ward SM & Koh SD. (2014). Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiol Rev* **94**, 859-907.
- Sandner P & Stasch JP. (2017). Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence. *Respir Med* **122 Suppl 1**, S1-S9.
- Sarna SK. (1985). Cyclic motor activity; migrating motor complex: 1985. *Gastroenterology* **89**, 894-913.

- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Horie Y, Bachmaier K, Fata JE, Li M, Suzuki A, Bouchard D, Ho A, Redston M, Gallinger S, Khokha R, Mak TW, Hawkins PT, Stephens L, Scherer SW, Tsao M & Penninger JM. (2000). Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature* **406**, 897-902.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Horie Y, Bachmaier K, Fata JE, Li M, Suzuki A, Bouchard D, Ho A, Redston M, Gallinger S, Khokha R, Mak TW, Hawkins PT, Stephens L, Scherer SW, Tsao M & Penninger JM. (2003). Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)K gamma (vol 406, pg 897, 2000). *Nature* **426**, 584-584.
- Saur D, Neuhuber WL, Gengenbach B, Huber A, Schusdziarra V & Allescher HD. (2002). Site-specific gene expression of nNOS variants in distinct functional regions of rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G349-358.
- 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.
- Schindler U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C & Mulsch A. (2006). Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **69**, 1260-1268.
- Schleiffer R, Duranton B, Gosse F, Bergmann C & Raul F. (2000). Nitric oxide synthase inhibition promotes carcinogen-induced preneoplastic changes in the colon of rats. *Nitric Oxide* **4**, 583-589.
- 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 Ibeta. *Nature* **404**, 197-201.
- Schmidt PM, Rothkegel C, Wunder F, Schroder H & Stasch JP. (2005). Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* **513**, 67-74.
- Schmidt PM, Schramm M, Schroder H, Wunder F & Stasch JP. (2004). Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* **279**, 3025-3032.
- 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.
- Schuschke DA, Saari JT & Miller FN. (1995). A role for dietary copper in nitric oxide-mediated vasodilation. *Microcirculation* **2**, 371-376.
- Shailubhai K, Yu HH, Karunanandaa K, Wang JY, Eber SL, Wang Y, Joo NS, Kim HD, Miedema BW, Abbas SZ, Boddupalli SS, Currie MG & Forte LR. (2000). Uroguanylin treatment suppresses polyp formation in the Apc(Min/+) mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *Cancer Res* **60**, 5151-5157.
- Shibuki K & Okada D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* **349**, 326-328.
- Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A & Jemal A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 177-193.
- Sivarao DV, Mashimo H & Goyal RK. (2008). Pyloric sphincter dysfunction in nNOS-/- and W/Wv 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.

- Smith TK, Reed JB & Sanders KM. (1987a). Interaction of two electrical pacemakers in muscularis of canine proximal colon. *Am J Physiol* **252**, C290-299.
- Smith TK, Reed JB & Sanders KM. (1987b). Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *Am J Physiol* **252**, C215-224.
- Smith TK & Robertson WJ. (1998). Synchronous movements of the longitudinal and circular muscle during peristalsis in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol* **506 (Pt 2)**, 563-577.
- Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE & Brown PO. (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14842-14847.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358.
- Spencer NJ. (2001). Control of migrating motor activity in the colon. *Current opinion in pharmacology* **1**, 604-610.
- Spencer NJ. (2013). Characteristics of colonic migrating motor complexes in neuronal NOS (nNOS) knockout mice. *Front Neurosci* **7**, 184.
- Spencer NJ, Bayguinov P, Hennig GW, Park KJ, Lee HT, Sanders KM & Smith TK. (2007). Activation of neural circuitry and Ca²⁺ waves in longitudinal and circular muscle during CMMCs and the consequences of rectal aganglionosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G546-555.
- Spencer NJ, Bywater RA, Holman ME & Taylor GS. (1998a). Inhibitory neurotransmission in the circular muscle layer of mouse colon. *J Auton Nerv Syst* **70**, 10-14.
- Spencer NJ, Bywater RA, Holman ME & Taylor GS. (1998b). Spontaneous and evoked inhibitory junction potentials in the circular muscle layer of mouse colon. *J Auton Nerv Syst* **69**, 115-121.
- Spencer NJ, Bywater RA & Taylor GS. (1998c). Evidence that myoelectric complexes in the isolated mouse colon may not be of myogenic origin. *Neurosci Lett* **250**, 153-156.
- Spencer NJ, Hennig GW, Dickson E & Smith TK. (2005). Synchronization of enteric neuronal firing during the murine colonic MMC. *J Physiol* **564**, 829-847.
- Spencer NJ, Kyloh M, Wattoo DA, Thomas A, Sia TC, Brookes SJ & Nicholas SJ. (2012). Characterization of motor patterns in isolated human colon: are there differences in patients with slow-transit constipation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**, G34-43.
- Stacey P, Rulten S, Dapling A & Phillips SC. (1998). Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 249-254.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroeder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A & Schramm M. (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* **410**, 212-215.
- Stasch JP, Pacher P & Evgenov OV. (2011). Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation* **123**, 2263-2273.
- 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, Schroeder H, Stahl E, Steinke W & Wunder F. (2002). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* **136**, 773-783.
- 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 nitric inhibition in the mouse gastric antrum. *J Physiol* **546**, 751-763.
- Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Hoshino K, Takeda K, Akira S, Watanabe M, Ishii H & Hibi T. (2003). Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the

- development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scandinavian journal of gastroenterology* **38**, 837-844.
- Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Hatori R, Ishige T, Suzuki M, Mochiki E, Morikawa A & Kuwano H. (2005). In vivo recording of colonic motility in conscious rats with deficiency of interstitial cells of Cajal, with special reference to the effects of nitric oxide on colonic motility. *J Gastroenterol* **40**, 1043-1048.
- Takaki M. (2003). Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* **39**, 137-161.
- Takeda Y, Koh SD, Sanders KM & Ward SM. (2008). Differential expression of ionic conductances in interstitial cells of Cajal in the murine gastric antrum. *J Physiol* **586**, 859-873.
- Taxi J. (1969). Morphological and cytochemical studies on the synapses in the autonomic nervous system. *Prog Brain Res* **31**, 5-20.
- Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D & Pamukcu R. (2000). Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* **60**, 3338-3342.
- Thoonen R, Cauwels A, Decaluwe K, Geschka S, Tainsh RE, Delanghe J, Hochepeid T, De Cauwer L, Rogge E, Voet S, Sips P, Karas RH, Bloch KD, Vuylsteke M, Stasch JP, Van de Voorde J, Buys ES & Brouckaert P. (2015). Cardiovascular and pharmacological implications of haem-deficient NO-unresponsive soluble guanylate cyclase knock-in mice. *Nat Commun* **6**, 8482.
- Thunberg 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.
- 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, Griendling 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⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1466-1471.
- van der Flier LG & Clevers H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol* **71**, 241-260.
- van der Flier LG, Haegerbarth A, Stange DE, van de Wetering M & Clevers H. (2009). OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **137**, 15-17.
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Bernex F, Schiffmann SN & Panthier JJ. (2000). Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit(W-lacZ) mice. *Cell Tissue Res* **302**, 155-170.
- 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 Ca²⁺-activated K⁺ 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.

- Voussen B, Beck K, Mauro N, Keppler J & Friebe A. (2017). Comparison of nitrergic signaling in circular and longitudinal smooth muscle of murine ileum. *Neurogastroenterol Motil*.
- Waite KA & Eng C. (2003). From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* **4**, 763-773.
- 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 F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ & Luo Y. (2012). RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* **14**, 22-29.
- Wang Q, Mergia E, Koesling D & Mittmann T. (2017). Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. *Neuroscience* **360**, 180-189.
- Wang X, Huang G, Luo X, Penninger JM & Muallem S. (2004). Role of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) in Ca(2+) oscillations and adaptation of Ca(2+) signaling to reduce excitability of RGS2-/- cells. *J Biol Chem* **279**, 41642-41649.
- Wang XY, Chen JH, Li K, Zhu YF, Wright GW & Huizinga JD. (2014). Discrepancies between c-Kit positive and Ano1 positive ICC-SMP in the WWV and wild-type mouse colon; relationships with motor patterns and calcium transients. *Neurogastroenterol Motil* **26**, 1298-1310.
- 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.
- Wood JD. (1973). Electrical activity of the intestine of mice with hereditary megacolon and absence of enteric ganglion cells. *Am J Dig Dis* **18**, 477-488.
- Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Tailor Y, Rao M, Si Y, Levin D, Schwartz MG, Uygur A, Hayakawa Y, Gross S, Renz BW, Setlik W, Martinez AN, Chen X, Nizami S, Lee HG, Kang HP, Caldwell JM, Asfaha S, Westphalen CB, Graham T, Jin G, Nagar K, Wang H, Kheirbek MA, Kolhe A, Carpenter J, Glaire M, Nair A, Renders S, Manieri N, Muthupalani S, Fox JG, Reichert M, Giraud AS, Schwabe RF, Pradere JP, Walton K, Prakash A, Gumucio D, Rustgi AK, Stappenbeck TS, Friedman RA, Gershon MD, Sims P, Grikscheit T, Lee FY, Karsenty G, Mukherjee S & Wang TC. (2015). Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* **160**, 269-284.
- Yanaka N, Kotera J, Ohtsuka A, Akatsuka H, Imai Y, Michibata H, Fujishige K, Kawai E, Takebayashi S, Okumura K & Omori K. (1998). Expression, structure and chromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene. *Eur J Biochem* **255**, 391-399.
- Yau KW & Baylor DA. (1989). Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* **12**, 289-327.
- Yen TH & Wright NA. (2006). The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Rev* **2**, 203-212.

- Yoneda S, Fukui H & Takaki M. (2004). Pacemaker activity from submucosal interstitial cells of Cajal drives high-frequency and low-amplitude circular muscle contractions in the mouse proximal colon. *Neurogastroenterol Motil* **16**, 621-627.
- Zaccolo M & Movsesian MA. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* **100**, 1569-1578.
- Zhang J & Li L. (2005). BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol* **284**, 1-11.
- Zhang Y, Carmichael SA, Wang XY, Huizinga JD & Paterson WG. (2010). Neurotransmission in lower esophageal sphincter of W/W^v mutant mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G14-24.

9. Eigene Publikationen

Beck K, Friebe A, Voussen B

Nitrgenic signalling via interstitial cells of Cajal and smooth muscle cells influences circular smooth muscle contractility in murine colon [**in revision**]

Voussen B, **Beck K**, Mauro N, Keppler J, Groneberg D & Friebe A (2017).

Comparison of nitrgenic signaling in circular and longitudinal smooth muscle of murine ileum. *Neurogastroenterol Motil.* [**epub ahead of print**]

Lies B, **Beck K**, Keppler J, Saur D, Groneberg D & Friebe A (2015).

Nitrgenic signaling via interstitial cells of Cajal regulates motor activity in murine colon. *JPhysiol* 593,4589–4601

Konferenzbeiträge

Barbara Lies, **Katharina Beck**, Jonas Keppler, Dieter Groneberg, Andreas Friebe

Nitrgenic signaling via interstitial cells of Cajal inhibits rhythmic motor pattern in proximal murine colon

The 1st Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting, 05.-07.09. 2014, Guanzhou, China

Barbara Lies, **Katharina Beck**, Jonas Keppler, Dieter Groneberg, Andreas Friebe

Nitrgenic signaling via interstitial cells of Cajal inhibits rhythmic motor pattern in murine colon

22. DGNM-Jahrestagung, 13.02. – 15.03. 2014, Freising

Katharina Beck, Dieter Groneberg, Andreas Friebe and Barbara Lies

A case of chaos? NO causes arrhythmic motor pattern via interstitial cells of Cajal in the murine colon.

7th International Conference on cGMP, 19. – 21.06.2015, Trier, Deutschland

Katharina Beck, Dieter Groneberg, Andreas Friebe and Barbara Lies

Differential roles of NO-sensitive guanylate cyclase in circular and longitudinal muscle layer of murine proximal colon

23. DGNM-Jahrestagung, 05. - 07.02.2016, Freising

Barbara Voussen-Lies, **Katharina Beck**, Nadine Mauro, Jonas Keppler, Dieter

Groneberg, Andreas Friebe

Diverse effects of nitrgenic signaling in smooth muscle activity of murine ileum

23. DGNM-Jahrestagung 5.-7.02.2016, Freising

Katharina Beck, Dieter Groneberg, Andreas Friebe, Barbara Voussen-Lies

NO signaling in the circular smooth muscle layer of the murine proximal colon.

2nd Federation of Neurogastroenterology & Motility, 26. – 28.08.2016, San Francisco, USA

- Barbara Voussen-Lies, **Katharina Beck**, Nadine Mauro, Jonas Keppler, Dieter Groneberg, Andreas Friebe
Exploring the diverse effects of nitrergic signaling on smooth muscle activity of murine ileum
2nd Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting, 25 – 28.08.2016, San Francisco, USA
- Andreas Friebe, **Katharina Beck**, Sarah Dünnes, Dieter Groneberg, Barbara Lies
Regulation of Smooth Muscle Tone by NO-Sensitive Guanylyl Cyclase
Mechanisms of Vasodilatation 12th International Symposium. 6-9.11.2016, Rochester, Minn., USA
- Katharina Beck**, Barbara Voussen, Alexander Vincent, Sean P. Parsons, Jan D. Huizinga, Andreas Friebe
Modulatory role of NO-GC in ICC on long distance contractions in the murine colon
24. DGNM-Jahrestagung 10.-12.03.2017, Berlin
- Barbara Voussen, **Katharina Beck**, Dieter Groneberg, Andreas Friebe
How does nitrergic signaling in fibroblast-like cells influence motility?
24. DGNM-Jahrestagung 10.-12.03.2017, Berlin
- Katharina Beck**, Barbara Voussen, Alexander Vincent, Sean P. Parsons, Jan D. Huizinga, Andreas Friebe
Modulatory role of cGMP on colonic motility in the mouse
8th International Conference on cGMP, 23. – 25. 06.2017, Bamberg, Deutschland
- Barbara Voussen, **Katharina Beck**, Nadine Mauro, Jonas Keppler, Andreas Friebe
NO/cGMP signaling as important modulator of murine small intestinal motility
8th International Conference on cGMP, 23. – 25. 06.2017, Bamberg, Deutschland
- Annemarie Aue, **Katharina Beck**, Dieter Groneberg, Fabian Schwiering, Barbara Voussen, Andreas Friebe
NO/cGMP signaling in cells 'off the beaten track'
8th International Conference on cGMP, 23. – 25. 06.2017, Bamberg, Deutschland
- Katharina Beck**, Barbara Voussen, Alexander Vincent, Dieter Groneberg, Sean P. Parsons, Jan D. Huizinga, Andreas Friebe
Role of NO-GC on long distance contractions in the murine colon.
ESNM 2017, 24. – 26.08.2017, Cork, Irland
- Barbara Voussen, **Katharina Beck**, Nadine Mauro, Jonas Keppler, Dieter Groneberg, Andreas Friebe
Effects of nitric oxide on small intestinal motility.
ESNM 2017, 24. – 26.08.2017, Cork, Irland

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu allererst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe bedanken, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit durchzuführen. Die stete Bereitschaft zur Diskussion und die konstruktiven Ratschläge waren entscheidend für den Verlauf dieser Arbeit. Vielen Dank für das Vertrauen und die große Unterstützung, die es mir ermöglichten, die wissenschaftliche Arbeitsweise zu erlernen und darauf aufzubauen.

Herr Prof. Dr. Erhard Wischmeyer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Zeit sich meiner Arbeit anzunehmen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Barbara Voußen, die mich während der letzten drei Jahre außerordentlich unterstützt und mir immer hilfsbereit zur Seite gestanden hat. Ihr fachliches Wissen und ihre stetige Bereitschaft zur fachlichen Diskussionen waren für das Fortschreiten der Arbeit sehr wichtig. Besonders ihre lebensfrohe und verständnisvolle Art haben das Arbeiten stets zu einer Freude gemacht. Einige Erfahrungen wurden mir vor allem durch Ihre motivierenden und unterstützenden Ratschläge, ihr Vertrauen und ihre Zuversicht ermöglicht, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Bei der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanke ich mich für die dreijährige finanzielle und ideelle Förderung.

Für die Möglichkeit die 'whole colon'-Motilitätsmessungen zu erlernen sowie für die Bereitstellung des Plugins zur Transformation der Kontraktionsmusterkarten gilt der Dank Prof. Dr. Jan Huizinga und Dr. Sean Parsons (McMaster Universität, Hamilton, Kanada).

Ein großer Dank geht an meine Arbeitskollegen für das positive und angenehme Arbeitsklima sowie für die schöne gemeinsame Zeit. Speziell an Dr. Dieter Groneberg, der durch seine fachliche Expertise und Erfahrungswerte stets eine große Hilfe war. An Bianca Röger und Linda Kehrer für die hervorragende Assistenz, Amelie Reigl für die unterstützenden Arbeiten sowie an Fabian Schwiering und Annemarie Aue. Nicht zu vergessen die übrigen Mitarbeiter des Institutes vor allem Marco Abeßer, Kai Schuh und Benjamin Aßmus.

Ein besonderer Dank geht an Sarah Dünnes, Estefanía Prentki Santos, Katarina Spiranec und Melanie Ullrich, die die Arbeit während der letzten drei Jahre sehr angenehm gestalteten und die Zeit zu einer wunderbaren Erinnerung werden ließen.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Ohne die stete Unterstützung und Motivation durch meine Eltern wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein ganz besonderer Dank geht hierbei an meinen Vater Karl-Heiz Beck, der durch sein technisches Wissen und handwerkliches und Geschick mit der Konstruktion der Apparatur zur Analyse der Kontraktionseffektivität der 'whole colon'-Präparationen beigetragen hat. Danke für die Geduld und Hingabe, die er mir stets entgegengebracht hat. Ich danke euch von ganzem Herzen.