

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Analyse Gewebe-spezifischer Deletionen  
der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I  
in Mäusen**

**Wiebke Wolfsgruber**

**aus**

**Erlangen**

**2003**

---

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann und Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 27.11.2002

Wiebke Wolfsgruber

Dissertation eingereicht am 29.11.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Hofmann  
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 21.01.2003

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die NO/cGMP Signalkaskade	1
1.2 Struktur, Vorkommen und Funktion der cGKI	2
1.2.1 Die Funktion der cGKI im Zentralnervensystem	3
1.2.2 Die Funktion der cGKI in Herzmuskelzellen	7
1.2.3 Die Funktion der cGKI im Magen-Darm-Trakt	7
1.2.4 Die Rolle der cGKI für die Regulation des Gefäßtonus	8
1.3 Konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP-Systems	9
1.4 Atherosklerose	11
1.5 Ziel der Arbeit	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Versuchstiere	15
2.1.1 „Gefloخته“ cGKI ( $cGKI^{L2}$ ) Mäuse	15
2.1.2 Cre Mäuse	15
2.1.3 Apo E-defiziente Mäuse	15
2.1.4 Zuchtschema zur <i>in vivo</i> -Generierung eines cGKI Nullallels	16
2.1.5 Zuchtschema für die Generierung konditional cGKI-defizienter Mäuse	17
2.1.6 Zuchtschema für die Generierung Glattmuskel-spezifischer Tamoxifen-induzierbarer cGKI-defizienter Mäuse auf Apo E-defizientem Hintergrund	18
2.1.7 Haltung und Zucht der Mäuse	18
2.2 Analyse genetisch veränderter Mäuse	19
2.2.1 Genotypisierung der gezüchteten Mäuse mittels PCR	19
2.2.2 Isolierung von DNS-Fragmenten	23
2.2.3 Sequenzanalyse der DNS	23
2.2.4 Präparation und Verabreichung von Tamoxifen	24
2.2.5 Analyse der DNS und RNS aus Mausgewebe	25
2.2.6 Analyse von Proteinen aus Mausgewebe	26
2.2.7 Histologische Färbungen	32
2.2.8 Bestimmung der Effizienz der cGKI Reduktion und des Anteils der proliferierenden VSMCs	36
2.2.9 Vergleich der Muster der Fußabdrücke	36
2.2.10 Untersuchung der motorischen Lernfähigkeit	37
2.2.11 Bestimmung der Magen-Darm-Motilität mittels Röntgenkontrastuntersuchung	37
2.2.12 Bestimmung der Darmpassagezeit	38
2.2.13 Induktion der Bildung atherosklerotischer Plaques durch Fett- und Cholesterin-reiches Futter	39
2.2.14 Bestimmung von Herz-, Nieren und Körpergewicht	40
2.2.15 Bestimmung von Blutfettwerten	40
2.2.16 Analyse der atherosklerotischen Plaques in der Aorta	41

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung „gefloxter“ cGKI Mäuse.....</b>	<b>43</b>
3.1.1	Zucht homozygot „gefloxter“ cGKI Mäuse .....	43
3.1.2	Expression der cGKI in <i>cGKI<sup>L2</sup></i> Mäusen .....	44
<b>3.2</b>	<b>„In vivo-Generierung“ eines cGKI Nullallels durch Cre-vermittelte Exzision des L2 Allels.....</b>	<b>45</b>
3.2.1	Rekombinations- und Expressionsanalyse .....	45
3.2.2	Funktionelle Analyse .....	47
<b>3.3</b>	<b>Gewebe-spezifische cGKI-defiziente Mäuse.....</b>	<b>49</b>
3.3.1	Hippocampus-spezifische cGKI-defiziente Mäuse.....	49
3.3.2	Purkinje Zell-spezifische cGKI-defiziente Mäuse.....	54
3.3.3	Herzmuskel-spezifische cGKI-defiziente Mäuse.....	58
<b>3.4</b>	<b>Gewebe- und Zeit- spezifische cGKI-defiziente Mäuse.....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Glattmuskel-spezifische und Tamoxifen-induzierbare cGKI-defiziente Mäuse.....	61
<b>3.5</b>	<b>Glattmuskel-spezifische Tamoxifen-induzierbare cGKI-defiziente Mäuse auf Apo E-defizientem Hintergrund .....</b>	<b>66</b>
3.5.1	Atherosklerose in Apo E-defizienten Mäusen und Einfluss von Tamoxifen auf die Bildung atherosklerotischer Plaques.....	66
3.5.2	Einfluss der cGKI auf die Bildung atherosklerotischer Plaques .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Konditional cGKI-defiziente Mäuse – Möglichkeiten und Grenzen.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2</b>	<b>Vergleich der cGKI-Expression in verschiedenen konditionalen cGKI-defizienten Mauslinien .....</b>	<b>75</b>
<b>4.3</b>	<b>Funktionelle Analyse der konditional cGKI-defizienten Mäuse .....</b>	<b>76</b>
4.3.1	Die Rolle der cGKI für die Induktion von LTP und LTD.....	77
4.3.2	Die Funktion der cGKI für die Kraftentwicklung im Mausmyocard .....	79
4.3.3	Die Rolle der cGKI für die Relaxation der glatten Muskulatur des Darmes .....	80
4.3.4	Die Rolle der cGKI für die Entwicklung der Atherosklerose .....	81
<b>4.4</b>	<b>Zukunftsperspektive .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>87</b>
<b>6.1</b>	<b>„Targeting“ Strategie.....</b>	<b>87</b>
<b>6.2</b>	<b>Verwendete Cre-Mauslinien .....</b>	<b>88</b>
<b>6.3</b>	<b>Verwendete Oligonukleotide .....</b>	<b>89</b>

---

<b>6.4</b>	<b>Für die Genotypisierung verwendete Oligonukleotide .....</b>	<b>89</b>
<b>6.5</b>	<b>Für die Western Blot Analyse verwendete primäre Antikörper.....</b>	<b>90</b>
<b>6.6</b>	<b>Für immunhistologische Färbungen verwendete primäre Antikörper .....</b>	<b>90</b>
<b>6.7</b>	<b>Verwendete sekundäre Antikörper .....</b>	<b>91</b>
<b>6.8</b>	<b>Einfluß von Tamoxifen auf die Bildung atherosklerotischer Plaques .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>7.1</b>	<b>Zitierte Veröffentlichungen.....</b>	<b>93</b>
<b>7.2</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen.....</b>	<b>99</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Die Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinase I.....	3
Abb. 1.2:	Modell für die Induktion der LTP im Hippocampus.....	5
Abb. 1.3:	Modell für die Induktion von LTD im Kleinhirn.....	6
Abb. 1.4:	Das Cre/loxP-Rekombinationssystem.....	10
Abb. 1.5:	Konventionelle und konditionale Mutagenese in der Maus.....	11
Abb. 2.1:	<i>In vivo</i> -Generierung eines cGKI Nullallels.....	16
Abb. 2.2:	Generierung konditionaler cGKI-defizienter Mäuse.....	17
Abb. 2.3:	Generierung Glattmuskel-spezifischer Tamoxifen-induzierbarer cGKI-defizienter Mäuse auf Apo E-defizientem Hintergrund.....	18
Abb. 2.4:	Schema des Versuchsablaufes.....	39
Abb. 3.1:	Genotypisierung der <i>cGKI<sup>L2</sup></i> Mäuse.....	43
Abb. 3.2:	RT-PCR und Western Blot Analyse der Expression von cGKI in <i>cGKI<sup>L2</sup></i> Mäusen.....	44
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> -Generierung cGKI-defizienter Mäuse... ..	46
Abb. 3.4:	PCR Genotypisierung der Mäuse aus der F1- und F2-Generation.....	47
Abb. 3.5:	Expression des cGKI Proteins in <i>cGKI<sup>L-/L-</sup></i> Mäusen.....	48
Abb. 3.6:	Gewebe-spezifische Mutagenese des cGKI Gens in der Maus.....	49
Abb. 3.7:	PCR Analyse Hippocampus-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse.....	50
Abb. 3.8:	Western Blot Analyse der Hippocampus-spezifischen cGKI-defizienten Mäuse.....	51
Abb. 3.9:	<i>In situ</i> -Hybridisierung und immunhistologische Färbung der Gehirne Hippocampus-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse.....	52
Abb. 3.10:	Messung der Langzeitpotenzierung in Hippocampus-spezifischen cGKI-defizienten Mäusen.....	53
Abb. 3.11:	Expressionsanalyse Purkinje Zell-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse.....	55
Abb. 3.12:	Langzeitdepression in Purkinje Zell-spezifischen cGKI-defizienten Mäusen ..	55
Abb. 3.13:	Analyse der Motorik der Purkinje Zell-spezifischen cGKI-defizienten Mäuse .	57
Abb. 3.14:	Analyse der Adaptation des Vestibulo-Okular-Reflexes in Purkinje Zell-spezifischen cGKI-defizienten Mäusen.....	58
Abb. 3.15:	Western Blot Analyse Herzmuskel-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse.....	59
Abb. 3.16:	Analyse der Kontraktionskraft des Herzens der Herzmuskel-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse.....	60
Abb. 3.17:	Gewebe- und Zeit-spezifische Mutagenese des cGKI Gens in der Maus.....	61
Abb. 3.18:	Rekombinationsanalyse der Glattmuskel-spezifische und Tamoxifen-induzierbaren cGKI-defizienten Mäuse.....	62
Abb. 3.19:	Expressionsanalyse Glattmuskel-spezifischer und Tamoxifen-induzierbarer cGKI-defizienter Mäuse.....	63
Abb. 3.20:	Analyse der gastrointestinalen Motilität der Glattmuskel-spezifischen und Tamoxifen-induzierbaren cGKI-defizienten Mäuse.....	65
Abb. 3.21:	Oil Red O – Färbung der Aortenbögen.....	69
Abb. 3.22:	Analyse der Flächen der atherosklerotischen Läsionen.....	69
Abb. 3.23:	Nachweis von Makrophagen und glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques.....	70
Abb. 3.24:	Immunfärbung von Schnitten der atherosklerotischen Plaques.....	72

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin oder Ampere	CreER <sup>T2</sup>	Tamoxifen-induzierbare Cre Rekombinase mit ER <sup>T2</sup> -LBD
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure	d	Tag
APS	Ammoniumpersulfat, Ammoniumperoxidisulfat	DAB	3,3'-Diaminobenzidin (3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyl-tetrahydrochlorid)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	DAG	Diacylglycerol
BCIP	Dinatrium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat	DEPC	Diethylpyrocarbonat
BK <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -abhängige K <sup>+</sup> -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit	ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5' - triphosphat
bp	Basenpaar	DNS	Desoxyribonukleinsäure
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serum Albumin)	dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
C	Cytosin	DTT	Dithiothreitol
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen	EDRF	endothelialer Relaxationsfaktor ("endothelium-derived relaxing factor")
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration	EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
cDNS	komplementäre DNS	eNOS	endotheliale NO-Synthase (NOS-3)
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat	ER <sup>T2</sup> -LBD	mutierte Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors
cGK(I+II)	cGMP-abhängige Proteinkinase (Typ I+II)	ES Zellen	embryonale Stammzellen
cGKI <sup>cko</sup>	Herzmuskel („cardiomyocyte“) - spezifische cGKI-defiziente Mäuse	G	Guanin
cGKI <sup>hko</sup>	Hippocampus-spezifische cGKI-defiziente Mäuse	Glu	Glutamin
cGKI <sup>pko</sup>	Purkinje Zell-spezifische cGKI-defiziente Mäuse	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
cGKI <sup>smko</sup>	Glattmuskel („smooth muscle“) -spezifische und Tamoxifen-induzierbare cGKI-defiziente Mäuse	gefloxt	<i>loxP</i> -flankiert
CMV	Cytomegalovirus	h	Stunde
CNG	„cyclic nucleotide gated“	HDL	Lipoproteinpartikel mit hoher Dichte („high density lipoprotein“)
Cre	Cre Rekombinase („cyclization recombination“)	IDL	Lipoproteinpartikel mit mittlerer Dichte („intermediate density lipoprotein“)
CREB	„cAMP-response-element-binding protein“	iNOS	induzierbare NO-Synthase (NOS-2)
		i.p.	intraperitoneal

IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
IP <sub>3</sub> R1	IP <sub>3</sub> -Rezeptor Typ1	PDE (V)	Phosphodiesterase (V)
K <sup>+</sup>	Kaliumion	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
kb	Kilobase	RNS	Ribonukleinsäure
kDa	Kilodalton	rpm	Umdrehungen pro Minute
l	Liter	RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
LDL	Lipoproteinpartikel mit geringer Dichte („low density lipoprotein“)	RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
LTD	Langzeitdepression	SDS	Natriumdodecylsulfat
LTP	Langzeitpotenzierung	sec	Sekunde
<i>loxP</i>	DNS-Substrat der Cre Rekombinase („locus of crossing over of P1“)	sGC	lösliche Guanylylzyklase
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion	SM22	Glattmuskel-spezifisches 22 kDa Protein
mGluR1	metabotroper Glutamat Rezeptor Typ1	SM- $\alpha$ -aktin	„smooth muscle- $\alpha$ -actin“
min	Minute	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Na <sup>+</sup>	Natriumion	T	Thymin
NANC	non-adrenerg non-cholinerg	Tam	Tamoxifen
NBT	Nitro-blue-tetrazoliumchlorid (2,2'-Di-p-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenyl] ditetrazolium chlorid)	TBE	Tris/Borat/EDTA
Neo	Neomycinresistenz Gen	TE	Tris/EDTA
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
nNOS	neuronale NO-Synthase (NOS-1)	Tk	Thymidinkinase Gen
NO	Stickstoffmonoxid	Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
NOS	NO-Synthase(n)	U	Einheit oder Uracil
OD	optische Dichte	UV	ultraviolett
OKR	optokinetischer Reflex	V	Volt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	VLDL	Lipoproteinpartikel mit sehr geringer Dichte („very low density lipoprotein“)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	VOR	Vestibulo-Okular-Reflex
PCNA	Proliferationsmarker („proliferating cell nuclear antigen“)	VSMC	vaskuläre glatte Muskelzelle

# 1 Einleitung

## 1.1 Die NO/cGMP Signalkaskade

Ein für viele physiologische Prozesse bedeutender Signalüberträger ist der gasförmige Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO), der in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen gebildet wird. NO wirkt z.B. als Neurotransmitter und ist an der Regulation der Darmperistaltik, des Blutdrucks, der Zelldifferenzierung und Proliferation, der Aktivität der Thrombozyten, der Endothel-Leukozyten-Wechselwirkung und der Immunantwort beteiligt.

NO wird von NO-Synthasen (NOS) gebildet, welche die Oxidation des terminalen Stickstoffs der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin katalysieren (Loscalzo und Welch, 1995; Lloyd-Jones und Bloch, 1996). Es werden drei verschiedene Isoformen der NO-Synthasen unterschieden. Zwei konstitutiv exprimierte,  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Isoformen konnten aus Neuronen (nNOS, NOS-1) und aus Endothelzellen (eNOS, NOS-3) isoliert werden. Eine dritte Isoform wird in vielen Zelltypen, z.B. in Makrophagen, vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen, infolge einer Aktivierung durch Zytokine oder Lipopolysaccharide gebildet und deshalb auch als induzierbare NOS (iNOS, NOS-2) bezeichnet. Die iNOS arbeitet unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und bildet NO über längere Perioden und in größeren Mengen. Das freigesetzte NO diffundiert durch die Zellmembran in die Zielzelle, wo es die lösliche Guanylylzyklase (sGC) durch Bindung an deren Hämgruppe stimuliert. Die sGC katalysiert die Bildung des intrazellulären sekundären Botenstoffs („second Messengers“) zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) (Furchgott und Van-Houtte, 1989). cGMP kann auch durch die membrangebundene partikuläre Guanylylzyklase gebildet werden, welche durch natriuretische Peptide stimuliert wird (Garbers und Lowe, 1994) und wird hauptsächlich durch die Phosphodiesterase V (PDE V) abgebaut.

In eukaryotischen Zellen wurden bisher drei unterschiedliche Klassen von cGMP-Rezeptorproteinen identifiziert: 1) durch zyklische Nukleotide aktivierbare Kationenkanäle („cyclic nucleotide gated cation channels“; CNG Kanäle) (Biel et al., 1999), 2) cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs) (Sonnenburg und Beavo, 1994) und 3) cGMP-abhängige Proteinkinasen.

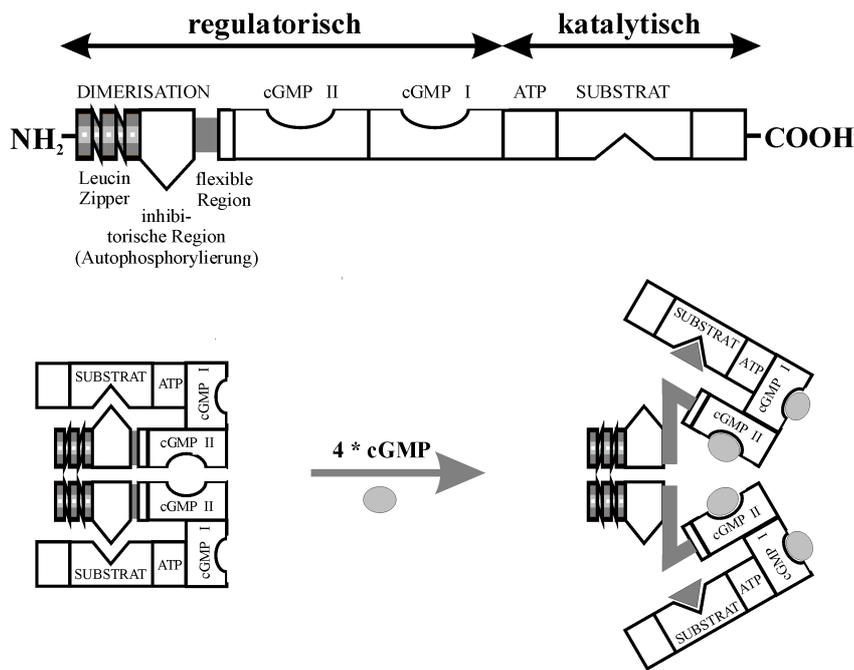
## 1.2 Struktur, Vorkommen und Funktion der cGKI

Ein wichtiger Effektor von cGMP sind die cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK), die zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen gehören, welche die Aminosäuren Serin und Threonin eines Substrates spezifisch phosphorylieren. Im Genom von Vertebraten konnten bisher zwei verschiedene Gene des Enzyms identifiziert werden, die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) und Typ II (cGKII). cGKI und II sind sich strukturell ähnlich, unterscheiden sich aber in ihrer subzellulären Lokalisation, Gewebeverteilung und Funktion (Hofmann et al., 1992).

Die cGKI ist ein lösliches 75-77 kDa Protein, das als Homodimer vorliegt. Durch alternatives Spleißen zweier für den Amino-Terminus kodierenden Exons entstehen zwei Isoformen der cGKI, die cGKI $\alpha$  bzw. cGKI $\beta$ . Die Isoformen unterscheiden sich in den ersten ca. 100 Aminosäuren, welche die Aktivierbarkeit durch cGMP beeinflussen sowie die Dimerisierung und die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen. Das Protein ist aus drei funktionellen Domänen aufgebaut: dem Amino-Terminus, der regulatorischen und der katalytischen Domäne (**Abb. 1.1**). Die regulatorische Domäne enthält zwei Bindungsstellen für cGMP, die katalytische Domäne eine MgATP- und eine Peptidbindungstasche. Sie ist für die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphatrests des ATPs auf ein Serin/Threonin des Substratproteins verantwortlich. In Abwesenheit von cGMP wird die katalytische Domäne der cGKI durch eine autoinhibitorische Domäne, die zwischen der Dimerisierungsdomäne und den cGMP-Bindungsstellen liegt, blockiert. Nach Bindung von 2 Mol cGMP/Mol Enzym an die cGMP-Bindungstaschen findet eine Autophosphorylierung des Thr59 der cGKI $\alpha$ , bzw. des Ser64 und Ser80 der cGKI $\beta$  statt. Es wird eine Konformationsänderung der cGKI induziert, wodurch die Autoinhibition aufgehoben wird. Das Substrat kann mit der Substratbindungsstelle in der katalytischen Domäne interagieren und phosphoryliert werden (Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000).

Die cGKII, deren molekulare Masse 87 kDa beträgt, tritt ebenfalls als Homodimer auf. Sie ist aufgrund einer Myristoylierung des Amino-Terminus membrangebunden und kommt in Gehirn, Knochen, Nieren und intestinaler Mukosa vor (Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000).

Die Aktivität der cGKI wurde erstmals in Zellextrakten aus dem Kleinhirn der Ratte gemessen (Hofmann und Sold, 1972) und konnte seitdem in zahlreichen Geweben von Säugetieren nachgewiesen werden. Die höchsten Mengen an cGKI wurden in Purkinje Zellen des Kleinhirns (Lohmann et al., 1981), in viszeralen und vaskulären



### Abb. 1.1: Die Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinase I

Die cGKI ist aus drei Domänen aufgebaut: Amino-Terminus, regulatorischer und katalytischer Domäne. Das Enzym liegt als Homodimer vor. Durch Bindung von 2 Mol cGMP/Mol Protein wird eine Konformationsänderung induziert, wodurch die Autoinhibition aufgehoben und die Phosphorylierung eines Substrats (Dreieck) ermöglicht wird. Nähere Erläuterungen im Text.

glatten Muskelzellen (Keilbach et al., 1992) und in Thrombozyten (Waldmann et al., 1986) gefunden. Außerdem wird die cGKI auch im Hippocampus (Kleppisch et al., 1999), in Endothelzellen von Blutgefäßen (Draijer et al., 1995), im Herz (Kumar et al., 1999), in Zellen der Nierengefäße (Joyce et al., 1986), in Spinalganglien (Qian et al., 1996), in neuromuskulären Endplatten (Chao et al., 1997) und in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Pryzwansky et al., 1995) exprimiert.

#### 1.2.1 Die Funktion der cGKI im Zentralnervensystem

Es wird angenommen, dass Veränderungen der Stärke der synaptischen Übertragung potentielle Mechanismen für Lernen und Gedächtnis darstellen (Chen und Tonegawa, 1997; Carey und Lisberger, 2002). Zwei wichtige Formen der Veränderungen sind: 1) die aktivitätsabhängige, langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung, die als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet wird und 2) die Verminderung der Stärke der synaptischen Übertragung, die Langzeitdepression (LTD). Hierbei handelt es sich um universelle Phänomene der synaptischen Übertragung, welche *in vivo* und *in vitro* durch Reizung

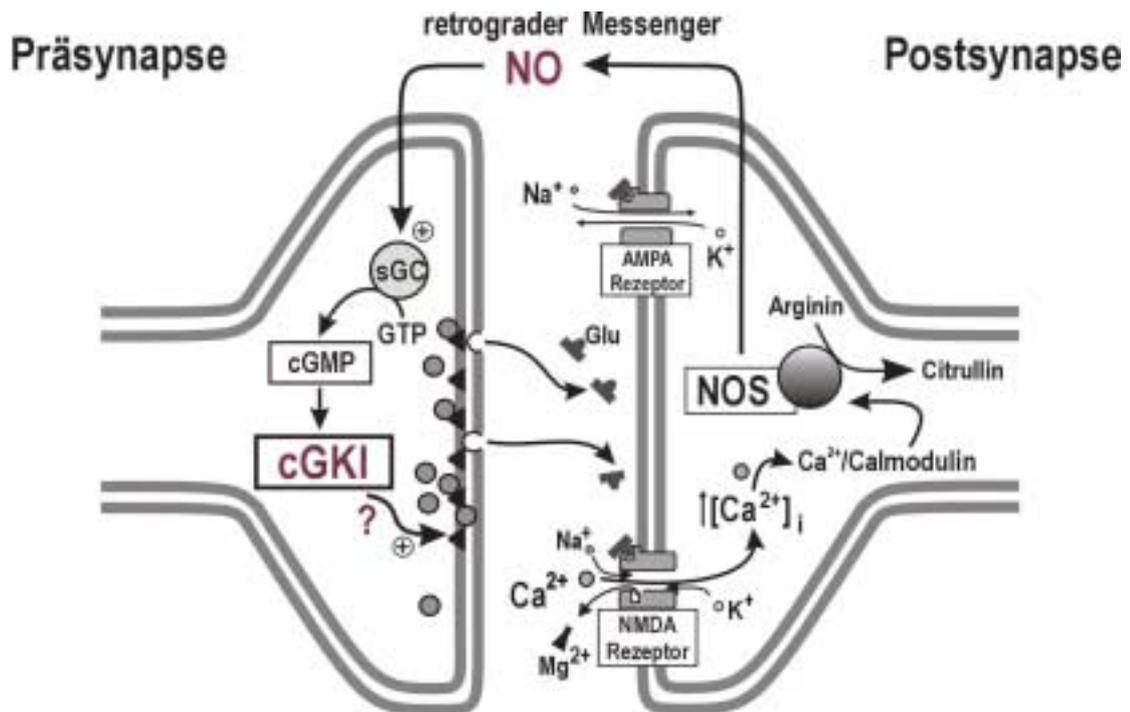
präsynaptischer Fasern induziert werden können. In einer Synapse können sowohl LTP als auch LTD auftreten.

### **cGKI und LTP im Hippocampus**

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass der Hippocampus entscheidend an bestimmten Lern- und Gedächtnisprozessen, z.B. dem „räumlichen Lernen“, beteiligt ist (Zola-Morgan and Squire, 1986; Jarrard, 1993).

Im Hippocampus verlaufen die Axone der Pyramidenzellen der CA3 Region, die sogenannten Schaffer Kollateralen, entlang des Stratum radiatum zum apikalen Dendritenbaum der Pyramidenzellen der CA1 Region. Dort wird LTP durch einen *N*-Methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptor-vermittelten massiven Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in der Postsynapse induziert (**Abb. 1.2**) (Bliss und Collingridge, 1993). Beim Ruhepotential wird die glutamaterge synaptische Übertragung im wesentlichen von  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-Rezeptoren getragen. Erst bei ausreichender Depolarisation der postsynaptischen Membran durch Aktivierung von AMPA-Rezeptoren kommt es zur Aufhebung des spannungsabhängigen  $Mg^{2+}$ -Blocks der NMDA-Rezeptoren und damit zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom. Einige Befunde unterstützen die Hypothese, dass NO und die cGK bei der Induktion der LTP involviert sind (Zhuo et al. 1994; Arancio et al, 1995). Es wird angenommen, dass durch den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige NO-Synthase aktiviert und dadurch vermehrt NO in der Postsynapse freigesetzt wird. NO diffundiert in die Präsynapse und fungiert dort als retrograder Messenger (Huang, 1997). Es stimuliert die sGC, welche daraufhin cGMP bildet. cGMP aktiviert die cGKI, die eine erhöhte präsynaptische Freisetzung des Transmitters Glutamat bewirkt, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch ungeklärt ist (**Abb. 1.2**). Andererseits könnte es auch NO-unabhängige Signalwege zur Induktion von LTP geben (Son et al., 1996).

Gegen die oben aufgestellte Hypothese sprechen allerdings Versuche mit cGK-defizienten Mäusen, die ergaben, dass die hippocampale LTP sowohl in cGKI- als auch in cGKII-defizienten Mäusen normal war (Kleppisch et al., 1999). Das durch die sGC gebildete cGMP könnte auch auf CNG Kanäle, die in den Neuronen der CA1 und CA3 Region zu finden sind, wirken und dadurch die Transmitterfreisetzung steigern (Leinders-Zufall et al., 1995; Bradley et al., 1997). Es ist außerdem bekannt, dass präsynaptische Proteine im Hippocampus nach Einwirkung von NO auf die ADP-Ribosyltransferase ADP-ribosyliert werden (Schuman et al., 1994). NO könnte also auf mehreren Wegen eine Induktion der LTP bewirken.



**Abb. 1.2: Modell für die Induktion der LTP im Hippocampus**

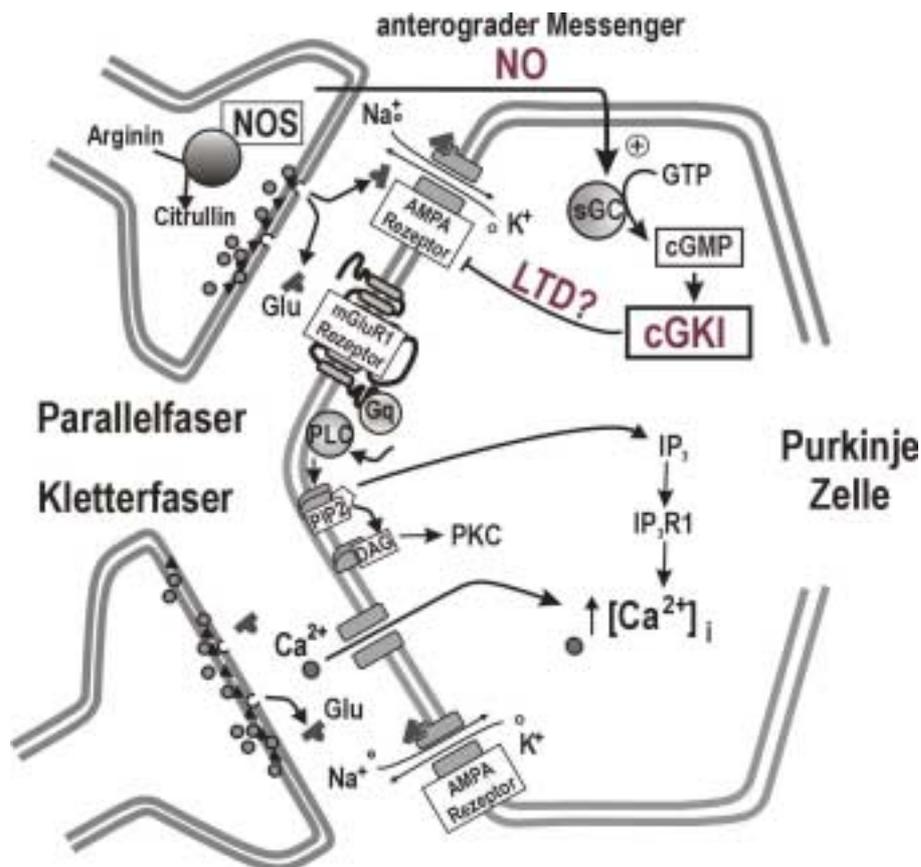
NO wird in der Postsynapse gebildet und wirkt als retrograder Messenger. Es aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC), welche cGMP synthetisiert. Dieses kann verschiedene Proteine stimulieren, z.B. die cGKI. Nähere Erläuterungen im Text.

### cGKI und LTD im Kleinhirn

Mausmutanten mit Defekten des Cerebellums zeigen in verschiedenen Tests schlechtere motorische Koordination und/oder verminderte motorische Lernfähigkeit (Lalonde et al., 1996). Die Induktion von LTD im Kleinhirn stellt möglicherweise einen Mechanismus für cerebelläres Lernen dar. Die Purkinje Zellen sind die einzigen efferenten Neurone des Kleinhirns und scheinen für die Koordination und Erlernung bestimmter motorischer Abläufe als auch für kognitive Fähigkeiten wichtig zu sein (Mauk, 1997).

In der Kleinhirnrinde sind Moosfasern, die ihren Ursprung in verschiedenen Bereichen des Gehirns haben, mit Körnerzellen verschaltet, deren Axone sich in Parallelfasern teilen. Diese wiederum bilden Synapsen mit Purkinje Zellen und inhibitorischen Interneuronen. Kletterfasern der Neurone des Olivenkerns bilden ebenfalls Synapsen mit den Purkinje Zellen, welche als einzige Zellen der Kleinhirnrinde über inhibitorische Synapsen zum Kleinhirnkern projizieren und somit Informationen an andere Regionen des Gehirns weiterleiten. Die Anregung der Purkinje Zellen erfolgt also auf zwei Wegen: durch Parallelfasern aus cerebellären Körnerzellen und durch Kletterfasern vom Olivenkern. Die

Koaktivierung der Purkinje Zelle durch Parallelfasern und Kletterfasern mit moderaten Frequenzen verursacht eine langanhaltende LTD an den Synapsen der Parallelfasern mit den Purkinje Zellen (Ito, 2001) (**Abb. 1.3**). Die glutamaterge synaptische Übertragung erfolgt über AMPA-Rezeptoren oder G-Protein (Gq) -gekoppelte metabotrope Glutamat-Rezeptoren Typ1 (mGluR1). Die Aktivierung der AMPA-Rezeptoren bewirkt eine Depolarisation, wodurch sich spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen und die  $[Ca^{2+}]_i$  kurzzeitig ansteigt. Die Aktivierung der mGluR1-Rezeptoren führt zu einer Stimulation der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) hydrolysiert. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC),  $IP_3$  den  $IP_3$ -Rezeptor Typ1 ( $IP_3R1$ ), wodurch  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Der Kalziumtransient ist notwendig für die Induktion der LTD in Purkinje Zellen (Lev-Ram et al., 1997). NO soll an der LTD-Induktion beteiligt sein (Shibuki und Okada, 1991) und kann die Stimulation durch Parallelfasern ersetzen



**Abb. 1.3: Modell für die Induktion von LTD im Kleinhirn**

Durch gleichzeitige Stimulation der Purkinje Zelle über Synapsen mit Parallel- und Kletterfasern wird in der Purkinje Zelle LTD induziert. NO wird z.B. in der Parallelfaser freigesetzt, diffundiert in die Purkinje Zelle und wirkt dort als anterograder Messenger. Dort stimuliert NO die sGC, welche cGMP synthetisiert und dadurch die cGKI aktivieren könnte. Weitere Erklärungen im Text.

(Lev-Ram et al., 1997). NO wird außerhalb der Purkinje Zellen, z.B. in Körnerzelle, Korbzellen oder Bergman Gliazellen durch die nNOS gebildet und diffundiert in die Purkinje Zelle, wo es die sGC stimuliert. Gebildetes cGMP könnte dort die cGK oder CNG Kanäle aktivieren oder Phosphodiesterasen hemmen.

Das Kleinhirn war das erste Säugetiergewebe, in welchem die Aktivität einer cGMP-abhängigen Kinase nachgewiesen werden konnte (Hofmann und Sold, 1972). Die Purkinje Zellen des Cerebellums enthalten hohe Konzentrationen an cGKI, wobei die Funktion dieser Kinase im Kleinhirn noch unklar ist. Zwei mögliche Substrate der cGKI im Cerebellum sind das G-Substrat (Schlichter et al., 1978; Aswad und Greengard, 1981) oder der IP<sub>3</sub>-Rezeptor Typ1 (IP<sub>3</sub>R1) (Haug et al., 1999).

### **1.2.2 Die Funktion der cGKI in Herzmuskelzellen**

Acetylcholin und der muskarinische Agonist Carbachol wirken am Herzen von Menschen und Nagetieren negativ inotrop. Der molekulare Mechanismus für die Hemmung der kardialen Kontraktionskraft wird allerdings kontrovers diskutiert.

Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Stimulation der eNOS zu einer Erhöhung der cGMP-Konzentration führt, die zu der muskarinischen Kontraktionshemmung beitragen soll (Han et al., 1998). Die cGKI wird in Kardiomyozyten exprimiert (Kumar et al., 1999) und es wird angenommen, dass sie den hemmenden Effekt von cGMP auf L-Typ-Kalziumkanäle (Méry et al., 1991; Sumii et al., 1995) und die Kontraktionskraft des Herzens (Bäumner et al., 1995) vermittelt.

### **1.2.3 Die Funktion der cGKI im Magen-Darm-Trakt**

In der Darmwand sind inhibitorische non-adrenerge und non-cholinerge (NANC) Neurone lokalisiert, die zusammen mit glatten Muskelzellen und interstitiellen Cajalzellen für die peristaltischen Bewegungen des Darmes verantwortlich sind. NANC-Neurone enthalten NOS und NO (Desai et al., 1991; Burns et al., 1996), welches die sGC und damit die cGMP-Synthese stimuliert, was zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führt.

Die Autopsie cGKI-defizienter Mäuse lässt vermuten, dass die cGKI eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der peristaltischen Wellen und bei der Fortbewegung des Nahrungsbreies durch den Magen-Darm-Trakt spielt, denn die

Passagezeit der Nahrung ist in cGKI Knockout Mäusen gegenüber den Kontrolltieren stark verlängert (Pfeifer et al., 1998; eigene Beobachtungen). cGKI-defiziente Mäuse weisen eine starke Dehnung von Magen und Darm und Anzeichen einer Pylorusstenose auf. Experimente mit Muskelstreifen aus Magen und Pylorus haben gezeigt, dass die NO/cGMP-abhängige Relaxation der intestinalen glatten Muskulatur gestört ist (Pfeifer et al., 1998). cGKI Knockout Mäuse sterben im Alter von ungefähr 3 bis 6 Wochen, wahrscheinlich an Unterernährung oder Entzündungen des Peritoneums (Peritonitis) (Pfeifer et al., 1999).

#### **1.2.4 Die Rolle der cGKI für die Regulation des Gefäßtonus**

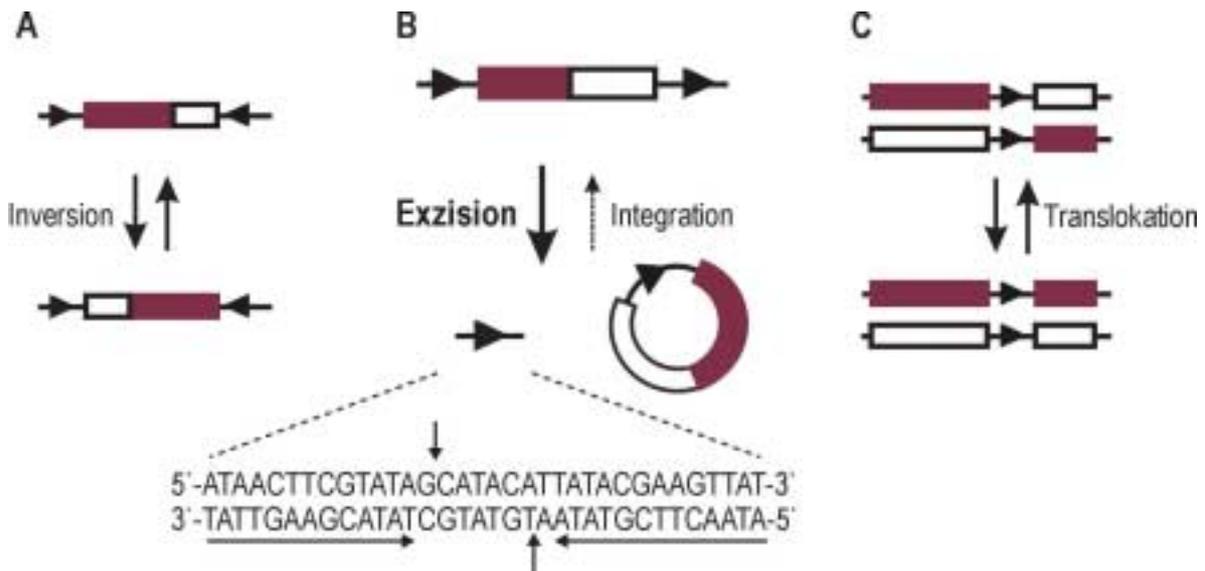
Der Tonus der glatten Muskulatur in Gefäßen und der Blutdruck wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, wie z.B. NO (auch EDRF, „endothelium-derived relaxing factor“; Palmer et al., 1987) und natriuretische Peptide. Beide senken den Muskeltonus, indem sie die sGC oder pGC stimulieren und die cGMP Produktion erhöhen. Durch die Aktivierung der cGKI wird die  $[Ca^{2+}]_i$  in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) vermindert (Pfeifer et al., 1999; Feil et al., 2002), was zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und zu einer Vasodilatation führt. Dabei könnten unter anderem folgende Mechanismen von Bedeutung sein: 1) Durch Phosphorylierung des Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptors ( $IP_3R$ ) (Komalavilas und Lincoln, 1996) oder/und durch die Hemmung der Agonisten-induzierten Generierung von  $IP_3$  kann die Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gehemmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die cGKI die Thrombin-induzierte  $IP_3$ -Synthese und die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem SR hemmt (Ruth et al., 1993) und dass die cGKIβ das  $IP_3R$ -assoziierte cGKI Substrat (IRAG) phosphoryliert (Schlossmann et al., 2000). 2) Eine Hyperpolarisation der Plasmamembran verringert die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Kalziumkanäle, wodurch der Kalziumeinstrom in die Zelle reduziert wird. Kalzium-abhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit ( $BK_{Ca}$ -Kanäle), die entscheidend zum Membranpotential in VSMCs beitragen, werden von der cGKI aktiviert (Taniguchi et al., 1993; Fukao et al., 1999). Eine Phosphorylierung der  $BK_{Ca}$ -Kanäle erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle und bewirkt dadurch eine Hyperpolarisation (Alioua et al., 1998). 3) Die cGK könnte die Dephosphorylierung der Myosin Leichtkette (MLC) durch die Myosin-Phosphatase 1 und damit eine  $Ca^{2+}$ -Desensitivierung bewirken (Somlyo und Somlyo; 2000). Die cGKIα phosphoryliert die regulatorische Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-Phosphatase 1 (Surks et al., 1999).

### 1.3 Konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP-Systems

Durch zufällige Integration von Transgenen oder gezielte Veränderung von Genen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) hat man die Möglichkeit, das Mausgenom zu modifizieren und die Funktion einzelner Gene zu untersuchen (Jaenisch, 1988; Capecchi, 1994). Dadurch wird eine permanente genetische Modifikation in der Keimbahn der Maus erzeugt, die an die Nachkommen weitervererbt wird. Diese Techniken erlauben es unter anderem, ein Gen in allen Zellen des Tieres zu zerstören, was zu einem totalen Verlust der Genfunktion führt (Knockout). Das konventionelle Ausschalten eines Gens bringt allerdings auch einige Nachteile mit sich, da die erzeugten Gendefekte die prä- und postnatale Entwicklung der Mäuse stören können, was häufig zu embryonaler Letalität oder stark reduzierter Lebenserwartung der Mutanten führt. Zudem lassen sich durch die Analyse des Phänotyps der Tiere keine genauen Aussagen über die Gewebe- und Zeit-spezifische Funktion des Gens treffen. Aus diesem Grund wurden diese konventionellen Methoden zur Veränderung von Genen mit einem Rekombinationssystem kombiniert, das auf einem durch Rekombinasen katalysierten Austausch zwischen zwei kurzen DNS-Erkennungssequenzen beruht. Das inzwischen am häufigsten verwendete Rekombinationssystem ist das Cre/loxP-Rekombinationssystem, welches sich, obwohl die Cre Rekombinase mikrobiellen Ursprungs ist, auch in Säugerzellen als sehr effizient erwiesen hat. Es wird dazu benutzt, das Genom von Mäusen über gezielte genetische Veränderungen in ES Zellen oder in Somazellen der Maus zu modifizieren (Rajewsky et al., 1996).

Die Cre Rekombinase („cyclization recombination“) ist ein 38 kDa Protein, das aus dem Bakteriophagen P1 stammt. Das Enzym katalysiert die Rekombination zwischen zwei 34 bp *loxP* („locus of crossing over of P1“) -Erkennungssequenzen, wozu es keinen Kofaktor benötigt. Je nachdem wie die *loxP*-Sequenzen zueinander orientiert und an welchem Ort sie integriert sind, kann durch Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion, Exzision bzw. Integration oder Translokation von DNS erfolgen (**Abb. 1.4**).

Dieses Rekombinationssystem kann für eine Vielzahl an Genommodifikationen genutzt werden, wobei es *in vivo* am häufigsten zur Inaktivierung von Genen durch Cre-vermittelte Exzision *loxP*-flankierter („gefloxter“) Exons eingesetzt wird (Nagy, 2000). Dazu werden *loxP*-Erkennungssequenzen gezielt durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Durch Expression der Cre Rekombinase kann eine Rekombination zwischen den eingefügten *loxP*-Sequenzen bewirkt



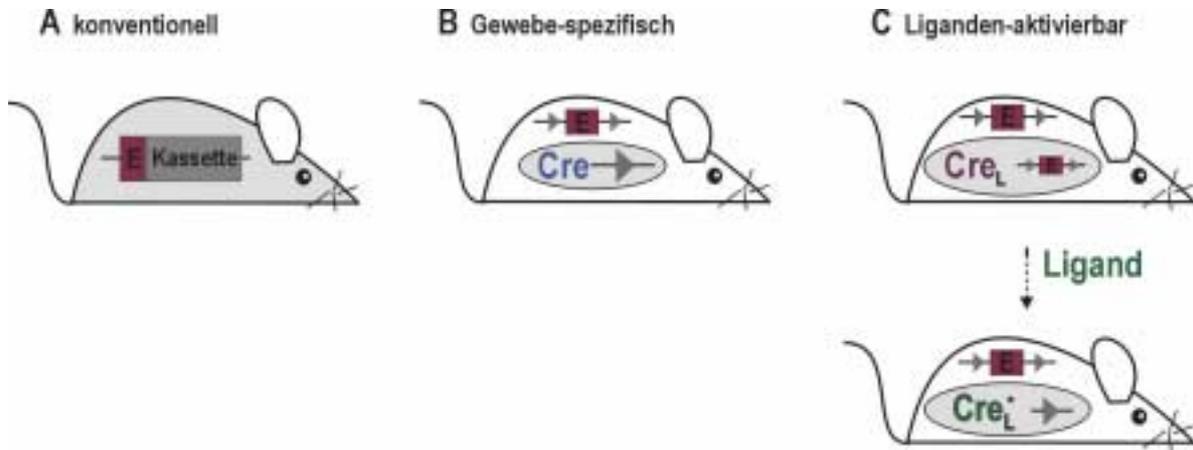
#### Abb. 1.4: Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Das Enzym Cre Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei *loxP*-Erkennungssequenzen (Dreiecke), die aus zwei 13 bp Palindromen (waagerechte Pfeile) und einer asymmetrischen 8 bp „core“ Region aufgebaut sind. Die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Phosphodiesterbindungen, die durch Cre gespalten werden. In Abhängigkeit von der Orientierung der *loxP*-Sequenzen führt Rekombination zu (A) einer Inversion, (B) Exzision oder Integration oder (C) Translokation. Die relative Effizienz der Reaktion wird durch die Dicke der Pfeile symbolisiert.

werden, was zu einem Herausschneiden des „geflochten“ DNS-Segments führt (Abb. 1.4 B). Die Exzision kann sowohl *in vitro* in ES Zellen (Gu et al., 1993) oder befruchteten Eizellen (Araki et al., 1995) durch transiente Cre Expression als auch in Cre-transgenen Mäusen (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992) stattfinden. Wird in Mäusen die Cre Rekombinase in einem frühen Entwicklungsstadium oder in Keimzellen exprimiert, so kann die rekombinierte DNS über die Keimbahn weitergegeben werden („germ line transmission“). Dazu werden sogenannte Cre „deleter“ Mäuse (z.B. CMV-Cre) mit „geflochten“ Mäusen verkreuzt, was zur Exzision der *loxP*-flankierten Gensequenz aus dem Genom von Keimzellen führt. Dadurch können „geflochte“ Markergene entfernt oder Nullmutanten erzeugt werden (Rajewsky et al., 1996).

Eine wichtige Anwendung des Cre/loxP-Systems ist die konditionale somatische Mutagenese in der Maus, d.h. die Zelltyp- oder Gewebe-spezifische (Abb. 1.5 B) und/oder zeitlich steuerbare (Abb. 1.5 C) Erzeugung eines Nullallels (Metzger und Chambon, 2001). Dies lässt sich z.B. durch Gewebe-spezifische Expression der Cre Rekombinase mittels geeigneter Promotoren bzw. durch die Verwendung Liganden-abhängiger Cre Rekombinasen erreichen (Feil et al., 1996; Brocard et

al., 1997). Diese Technologie bietet die Möglichkeit der Generierung geeigneter Tiermodelle für die Erforschung humaner Krankheiten (Nagy, 2000).



**Abb. 1.5: Konventionelle und konditionale Mutagenese in der Maus**

(A) Die Einführung einer Kassetten in das Exon (E) führt zur konventionellen Inaktivierung des Gens. (B) Die Exzision eines *loxP*-flankierten (Dreiecke) Exons (E) in allen Cre-exprimierenden Zellen (graues Oval) erlaubt die Gewebe-spezifische Inaktivierung eines Gens. (C) Modifizierte Cre Rekombinasen (Cre<sub>L</sub>, violett) sind erst in Anwesenheit eines synthetischen Liganden aktiv (Sternchen; grün). Durch die Gewebe-spezifische Expression einer Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinase kann eine örtliche und zeitliche Kontrolle der Rekombination erfolgen.

## 1.4 Atherosklerose

Atherosklerose ist die häufigste Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Schlaganfall und Herzinfarkt und damit die Haupttodesursache in Europa und Nordamerika. Sie ist die wichtigste und häufigste Erkrankung vor allem der größeren Arterien und charakterisiert durch Akkumulation von Fetten und fibröser Elemente in der Gefäßwand. Es sind zahlreiche exogene und endogene Faktoren bekannt, die die Entstehung und Progression der Krankheit fördern (z.B. Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Entzündungen, psychischer Stress, familiäre Belastung, Bewegungsmangel, Geschlecht, Alter) (Ross, 1999; Lusis, 2000). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, World Health Organization) teilt die Erkrankung in drei Stadien ein: 1) frühe Läsionen/Fettstreifen (Stadium I), 2) fortgeschrittene Läsionen/fibröse Plaques (Stadium II) und 3) komplexe Läsionen (Stadium III).

Im Stadium I sind in der Intima der größeren Arterien Fettstreifen nachweisbar. Beim Menschen sind diese in der Aorta schon im Kindesalter zu finden, im Alter von ungefähr 20 Jahren auch in den Koronararterien und ab dem 30. Lebensjahr in

zerebralen Arterien. Aufgrund der unterschiedlichen Dynamik des Blutflusses treten die Läsionen vor allem an Stellen auf, an welchen die Gefäße gebogen sind oder sich verzweigen. Dort ist eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle, wie z.B. LDL, zu beobachten, denn die Endothelzellen besitzen an diesen Stellen eine polygonale Form und liegen nicht so dicht aneinander. Die Endothelzellen in tubulären Gefäßen mit gleichmäßigem und annähernd laminarem Blutfluss weisen eine ellipsoide Form auf und sind in Flussrichtung eng aneinandergereiht. Das primäre Ereignis für die Entstehung der Atherosklerose ist die passive Diffusion und Anhäufung von LDL in der subendothelialen Matrix, einem Proteoglykangerüst. Dort wird LDL durch Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation mit Proteoglykanen modifiziert und später von eingewanderten Makrophagen aufgenommen. Das Lipoprotein HDL kann einen Überschuss an Cholesterol aufnehmen und abtransportieren. HDL hat deshalb einen atheroprotektiven Effekt.

Im Stadium II der Atherosklerose finden Entzündungsreaktionen statt, die durch eine Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten in die Arterienwand charakterisiert sind (Jonasson et al., 1986). Diese Prozesse werden durch oxidiertes LDL ausgelöst, das die darüber liegenden Endothelzellen zur Produktion entzündungsfördernder Mediatoren, z.B. vasoaktive Moleküle, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren anregt (Braun et al., 1999). Die Adhäsionsmoleküle vermitteln den Eintritt der Leukozyten in die Arterienwand, während die Wachstumsfaktoren die Proliferation verschiedener Zellen bewirken. Die Makrophagen entwickeln sich nach Aufnahme des oxidierten LDLs zu Schaumzellen, riesige Zellen mit Fett- und Cholesterolester- gefüllten Kompartimenten, die mit der Zeit absterben. Ihre Überreste bilden im Inneren des Plaques einen nekrotischen Kern („necrotic core“) aus Fetten und Zelltrümmern. T-Zellen und Makrophagen geben Zytokine (z.B.  $\text{IFN}\gamma$ ) und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) ab, welche die Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen und deren Produktion extrazellulärer Gerüstsubstanzen (Matrix) stimulieren. Die Läsionen besitzen dadurch eine dünne fibröse Hülle mit eingestreuten glatten Muskelzellen.

Die sich daraus entwickelnden fortgeschrittenen komplexen Läsionen kennzeichnen das Stadium III der Atherosklerose. Die gegenseitige Aktivierung von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen führt zur Produktion inflammatorischer Zytokine und Matrix-abbauender Proteasen (z.B. Kollagenasen, Gelatinasen). Durch den Abbau der fibrösen Hülle werden die Plaques instabil und

leicht verletzlich. An den Rändern der atherosklerotischen Läsionen kann es zu Rupturen kommen, wodurch die Bildung von Thromben ausgelöst wird.

Bei der Pathogenese spielt die Migration, Proliferation und Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass die NO/cGMP-Signalkaskade für diese Prozesse eine wichtige Rolle spielt (Sarkar und Webb, 1998). Um die Pathogenese der Atherosklerose genauer und besser untersuchen zu können, wurden schon zahlreiche Studien mit verschiedenen Tiermodellen (Hasen, Schweine, Primaten und Nagetiere) durchgeführt. Da Wildtypmäuse gegen Atherosklerose resistent sind, war es notwendig, durch Mutation unterschiedlicher Gene Atherosklerose-entwickelnde Mauslinien zu erzeugen (Breslow, 1996). Mit am häufigsten für genetische und physiologische Studien verwendet werden Mäuse, die Apolipoprotein E (ApoE)-defizient sind, d.h. deren Gen für ApoE zerstört wurde (Zhang et al., 1992, 1994). Durch die Abwesenheit von Apolipoprotein E wird das Lipoproteinprofil verändert und der Fettstoffwechsel („lipoprotein clearance“) gestört. Die Tiere leiden an einer Hypercholesterinämie mit einer starken Erhöhung von VLDL-ähnlichen Partikeln im Blut und entwickeln atherosklerotische Läsionen, die den im menschlichen Organismus beobachteten sehr ähnlich sind (Breslow, 1996).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die Analyse konventioneller cGKI Knockout-Mäuse (Pfeifer et al., 1998) hat bereits interessante Erkenntnisse zur Funktion des cGKI Proteins gebracht. Allerdings sind die Untersuchungsmöglichkeiten durch den multiplen, schwerwiegenden Phänotyp und die verminderte Lebenserwartung (ca. 3-6 Wochen) dieser Tiere stark eingeschränkt. Die genaue Todesursache der Mäuse ist bisher ungeklärt.

Die konditionale Mutagenese in der Maus ist ein neuer Ansatz zur Gewebespezifischen, funktionellen Analyse von Genen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems getestet werden, ob sich *in vivo* durch Cre-vermittelte Exzision des „geflochten“ Exons 10 des cGKI Gens ein keimbahngängiges Nullallel generieren lässt und ob auf diesem Weg cGKI-defiziente Mäuse erzeugt werden können.

Durch Verkreuzen einer Mauslinie mit „gefloxtem“ Exon 10 der cGKI mit verschiedenen Gewebe-spezifischen Cre Mauslinien sollten konditional cGKI-defiziente Mäuse generiert und phänotypisch analysiert werden. Dabei sollten Cre Mauslinien verwendet werden, die Cre in einem Gewebe exprimieren, in welchem die cGKI zu finden ist (z.B. Hippocampus, Purkinje Zellen, Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen). Die Funktion der cGKI sollte dadurch erstmals anhand von Mäusen untersucht werden, welche einen selektiven cGKI Defekt in ausgewählten Geweben oder Zelltypen aufweisen.

Schließlich sollte das konditionale Mausmodell für eine Glattmuskel-spezifische Inaktivierung der cGKI mit einem Mausmodell für Atherosklerose (Apo E-defiziente Mäuse) kombiniert werden, um die Rolle der cGKI für die Progression atherosklerotischer Läsionen untersuchen zu können.

Durch die Generierung Gewebe-spezifischer cGKI Knockout Mäuse sollte es erstmals möglich sein, die Auswirkungen des Fehlens der cGKI auch in adulten Tieren untersuchen zu können. Die konditionale Mutagenese könnte also die Möglichkeit bieten, einige Nachteile der globalen cGKI Knockout Mäuse zu umgehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Der 129/Sv Inzuchtstamm stammte aus dem Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried, (Dr. A. Pfeifer, persönliche Mitteilung), der C57Bl/6 (C57Bl/6N CrI BR) Inzuchtstamm von der Firma Charles River, Sulzfeld.

#### 2.1.1 „Gefloخته“ cGKI ( $cGKI^{L2}$ ) Mäuse

In der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Feil wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine „gefloخته“  $cGKI^{L2}$  Mauslinie hergestellt, in dessen Genom das Exon 10 des cGKI Gens durch zwei gleich orientierte *loxP*-DNS-Sequenzen flankiert ist (L2). Die Mäuse hatten einen reinen 129/Sv genetischen Hintergrund und wurden auf einen C57Bl/6 genetischen Hintergrund rückgekreuzt (N10). Die „Targeting“ Strategie findet sich im Anhang (6.1).

#### 2.1.2 Cre Mäuse

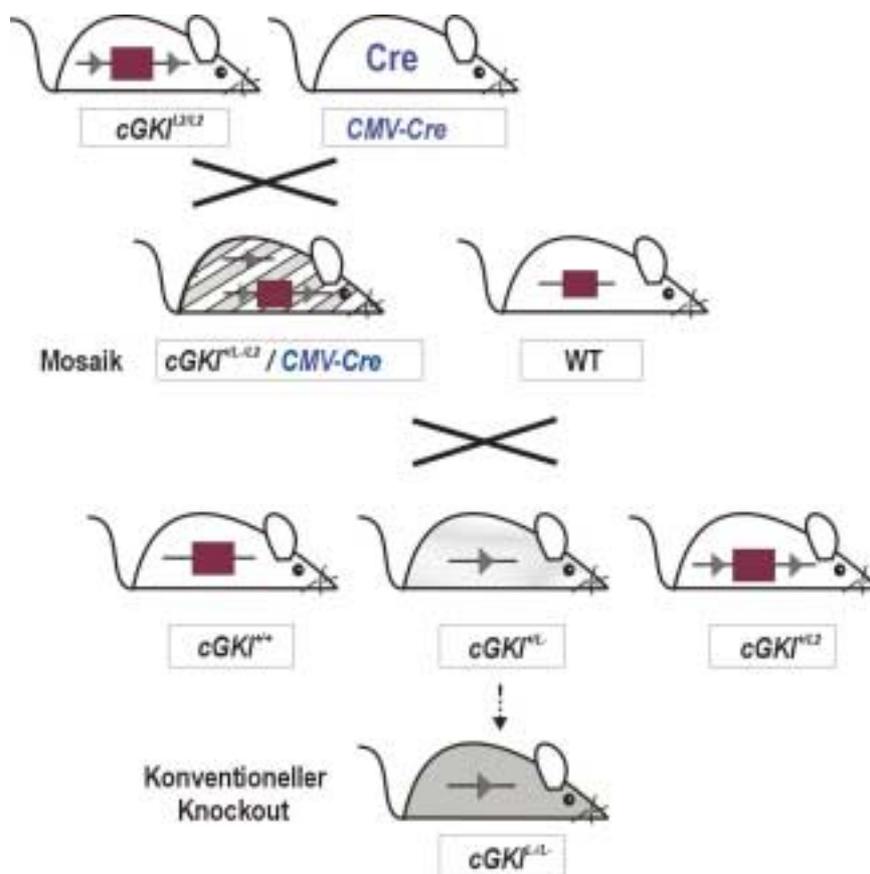
Die verwendeten Cre Mauslinien sind im Anhang in einer Tabelle (6.2) aufgeführt. Die durch Cre-vermittelte Exzision des Exons 10 hergestellten konditional cGKI-defizienten Mäuse hatten einen gemischten genetischen Hintergrund (129/Sv, C57Bl/6).

#### 2.1.3 Apo E-defiziente Mäuse

Die Apo E-defizienten Mäuse ( $Apo E^{-/-}$ ) wurden durch homologe Rekombination von der Arbeitsgruppe um Dr. N. Maeda (University of North Carolina; Chapel Hill, USA) generiert (Zhang et al., 1992) und über das Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Die Tiere hatten einen C57Bl/6 genetischen Hintergrund. Untersuchungen der Plasma-lipoproteine der  $Apo E^{-/-}$ ,  $Apo E^{+/-}$  und Wildtyp Tiere zeigten, dass der Gesamtcholesterinspiegel der Apo E-defizienten Mäuse schon ab einem Alter von sechs Wochen um ungefähr das Vierfache höher liegt im Vergleich zu den Kontrollen (Zhang et al., 1992; Reddick et al., 1994). Die HDL-Konzentration im Plasma ist in Knockout Mäusen leicht reduziert, während die Nicht-HDL-Lipoproteine (LDL, VLDL und IDL) stark erhöht sind.  $Apo E^{-/-}$  Mäuse entwickeln ab einem Alter von drei Monaten progressive vaskuläre Läsionen, die vor allem im Aortenbogen zu finden sind (Reddick et al., 1994; Lusis, 2000) (1.4; **Abb. 3.21**). In acht bis zehn Monate alten Tieren ist eine wesentliche Zunahme der Größe und eine komplexere Struktur der Plaques als zu Beginn der Atherogenese zu

beobachten. Die fortgeschrittenen Läsionen, die einen Großteil der Fläche des Aortenbogens bedecken, bestehen aus Plaques in verschiedenen Stadien, die z.T. ineinander übergehen. Einige der Plaques weisen die Bildung einer fibrösen Hülle („fibrous cap“) auf und besitzen einen zellfreien Kern aus Lipiden und Zelltrümmern („necrotic core“). Durch Fütterung der Versuchstiere mit einer Fett- und Cholesterin-reichen Diät (2.2.13) kann die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen zu einem früheren Zeitpunkt und eine beschleunigte Progression induziert werden (Nakashima et al., 1994; Zhang et al., 1994).

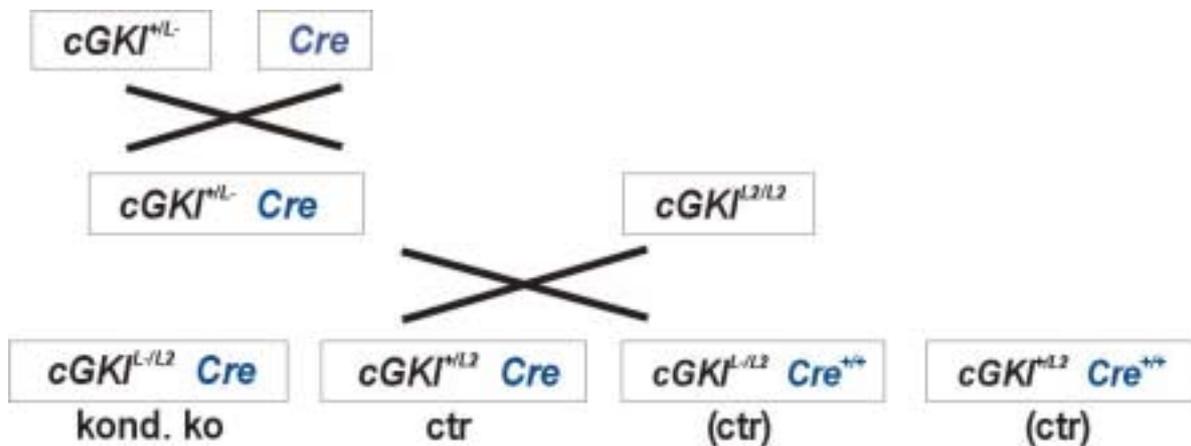
### 2.1.4 Zuchtschema zur *in vivo*-Generierung eines cGKI Nullallels



#### Abb. 2.1: *In vivo*-Generierung eines cGKI Nullallels

Durch Verkreuzen „gefloxter“ cGKI Mäuse mit Cre „deleter“ (CMV-Cre) Mäusen kann in „Mosaik“ Mäusen ein keimbahngängiges cGKI<sup>L3/E2</sup> Allel erzeugt und eine konventionelle Knockout Mauslinie (cGKI<sup>L-/L-</sup>) etabliert werden.

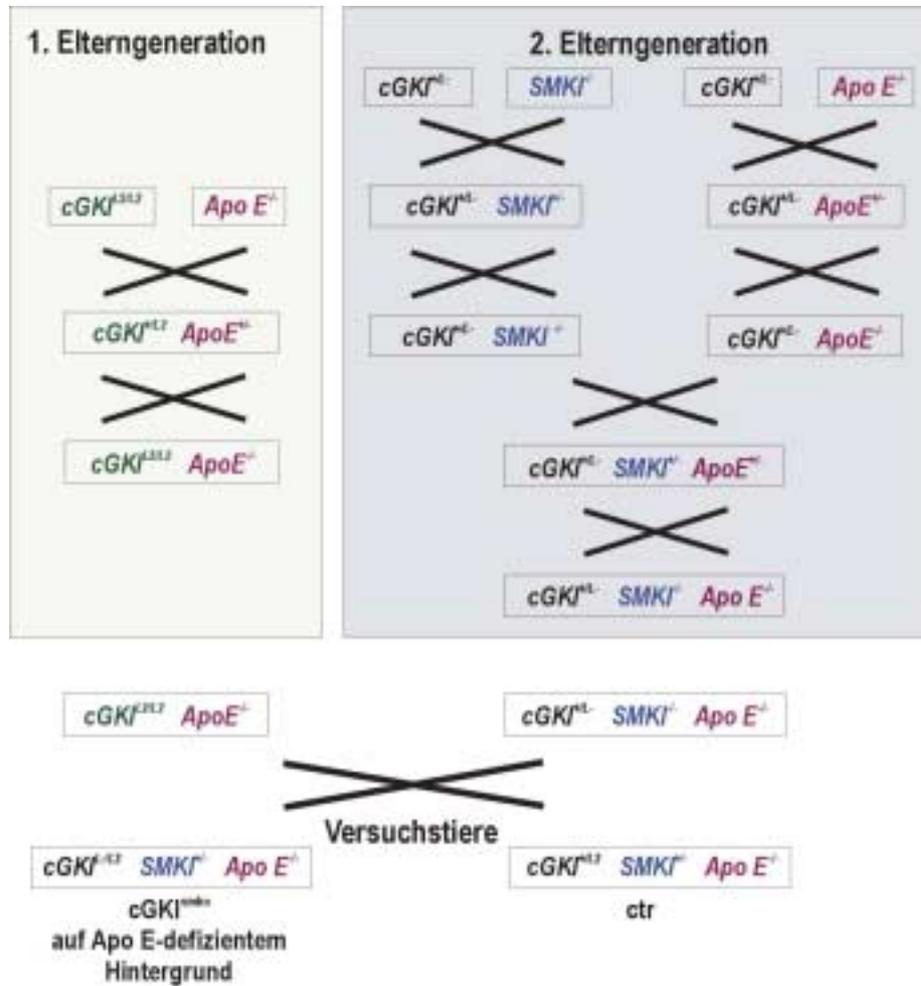
### 2.1.5 Zuchtschema für die Generierung konditional cGKI-defizienter Mäuse



#### Abb. 2.2: Generierung konditionaler cGKI-defizienter Mäuse

Heterozygote Nullmutanten ( $cGKI^{+/-}$ ) wurden zunächst mit Cre-transgenen Tieren verkreuzt. Die aus dieser Verpaarung hervorgegangene Generation ( $cGKI^{+/-}/Cre$ ) wurde, um optimale Ausbeuten an Versuchstieren zu erhalten, mit  $cGKI^{L2/L2}$  Tieren zusammengesetzt. Die in der folgenden Generation hervorkommenden konditionalen Knockout Mäuse exprimieren die Cre Rekombinase Promotor-kontrolliert nur in bestimmten Geweben oder Zelltypen. In Tieren mit dem Genotyp  $cGKI^{L-/L2}/Cre$  findet eine Exzision des „gefloxten“ Allels nur in den Zellen statt, in welchen das Cre Enzym aktiv ist. Dadurch werden diese Zellen zu Knockout ( $cGKI^{L-/L-}$ ) Zellen. In den nicht Cre-exprimierenden Geweben bleibt das  $cGKI^{L2}$  Allel und damit das cGKI Protein erhalten. Als Kontrolltiere wurden nur Mäuse des Genotyps  $cGKI^{+L2}/Cre$  verwendet.

### 2.1.6 Zuchtschema für die Generierung Glattmuskel-spezifischer Tamoxifen-induzierbarer cGKI-defizienter Mäuse auf Apo E-defizientem Hintergrund



**Abb. 2.3: Generierung Glattmuskel-spezifischer Tamoxifen-induzierbarer cGKI-defizienter Mäuse auf Apo E-defizientem Hintergrund**

Verpaarungsschema für die Generierung Glattmuskel-spezifischer Tamoxifen-induzierbarer cGKI Mutanten auf Apo E-defizientem Hintergrund für die Untersuchung der Funktion der cGKI bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose in der Aorta (3.5.2).

### 2.1.7 Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden in einem geeigneten Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München den Anforderungen entsprechend gehalten (bis 5 adulte Tiere in einem Typ II Makrolon Käfig; bis zu 12 adulte Tiere in einem Typ III Makrolon Käfig). Die Tiere wurden *ad libitum* mit einer „Zuchtdiät für Ratten und Mäuse“ (Altromin 1314) gefüttert und mit Trinkwasser versorgt (Wechsel der Wasserflaschen mindestens

einmal pro Woche). Die Späne wurden vor dem Einstreuen autoklaviert und während der Zucht wurde zusätzlich autoklaviertes Nistmaterial („Nestlets“, Emsicon) zur Verfügung gestellt. Zur Zucht wurden zwei Weibchen im gebärfähigen Alter (6-45 Wochen) mit einem Männchen (7 Wochen bis 1½ Jahre alt) zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden im Alter von 7-14 Tagen durch PCR Analyse der DNS aus Schwanzgewebe (2.2.1) genotypisiert, im Alter von 4 Wochen von den Müttern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

## 2.2 Analyse genetisch veränderter Mäuse

### 2.2.1 Genotypisierung der gezüchteten Mäuse mittels PCR

#### 2.2.1.1 DNS-Isolierung aus Mausgewebe

Lösungen:

<b>1 M Tris-Cl</b>		Tris-Base (ICN)		121 g
		H <sub>2</sub> O		ad 1000 ml
	⇒	mit HCl <sub>conc</sub> auf pH 7,4 oder 8,0 einstellen		
<b>0,5 M EDTA, pH 8,0</b>		Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O (Roth)		186,1 g
		H <sub>2</sub> O		ad 1000 ml
	⇒	mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen		
<b>10% SDS</b>		SDS (ICN)		50 g
		H <sub>2</sub> O		ad 500 ml
<b>5 M NaCl</b>	5 M	Natriumchlorid (Roth)		146 g
		H <sub>2</sub> O		ad 500 ml
<b>10x TE-Puffer</b>	0,1 M	Tris-Cl, pH 8,0	(1 M)	50 ml
	10 mM	EDTA, pH 8,0	(0,5 M)	10 ml
		H <sub>2</sub> O		ad 500 ml
	⇒	autoklavieren		
<b>Proteinase K</b>	(Roche)			50 mg/ml TE
	⇒	Lagerung der Aliquots: -20°C		
<b>PCR-Puffer</b>	(Promega)	+ Proteinase K		+ 5 µl/ml PCR-Puffer
		frisch zusetzen		
<b>Lysepuffer</b>	50 mM	Tris-Cl, pH 7,4	(1 M)	25 ml
	5 mM	EDTA	(0,5 M)	5 ml
	1%	SDS	(10%)	50 ml
	0,2 M	NaCl	(5 M)	20 ml
		H <sub>2</sub> O		ad 500 ml
	⇒	+ Proteinase K		+ 5 µl/ml Lysepuffer

**Protokoll:**

- ♦ Zur Genotypisierung 7-14 Tage alter Mäuse wurden ca. 2 mm des Schwanzes über Nacht in 50 µl PCR-Puffer + Proteinase K bei 55°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde 3 min bei 12000xg zentrifugiert, die obere Phase abgehoben und 15 min bei 95°C denaturiert. Danach wurde noch einmal 3 min bei 12000xg zentrifugiert.
- ♦ Zur Analyse der Rekombination in adulten Tieren (2.2.5) wurde die DNS mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu wurden ca. 100 mg Gewebe in 750 µl Lysepuffer über Nacht bei 55°C inkubiert, am folgenden Tag 500 µl Phenol-Chloroform (1:1, Roth) dazupipettiert, geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 12000xg; unter dem Abzug arbeiten!). Dadurch wurden Proteine (z.B. Enzyme) aus der oberen, wässrigen Phase entfernt. Diese wurde in 1 ml Ethanol 99,8% pipettiert (Präzipitation der DNS) und danach zentrifugiert (5 min, 12000xg). Die gefällte DNS wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Je nach Gewebe wurde die DNS in 50-300 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen. Die Isolierung der viszeralen glatten Muskelzellen des Darmes wird in 2.2.6.2 beschrieben.
- ♦ Lagerung der DNS-Lösung: -20°C
- ♦ Zur Quantifizierung wurden Verdünnungen von 1:100 hergestellt (2.2.1.2).
- ♦ Je nach Gewebe konnten 0,5-10 µg DNS pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden.

**2.2.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1,0:

50 µg/ml doppelsträngiger DNS

40 µg/ml einzelsträngiger RNS

33 µg/ml einzelsträngigem Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNS und RNS wurde aus dem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> abgeschätzt. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

**2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ist ein *in vitro*-Amplifikationsverfahren von definierten DNS-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988; Sambrook et al., 1989). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess, der auf der Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten beruht:

- ♦ Denaturierung (denaturation): Aufschmelzen des DNS-Doppelstranges bei 94°C
- ♦ Primeranlagerung (annealing): spezifische Bindung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer an den kodierenden (Forward Primer, f) bzw. den nicht-kodierenden Strang (Reverse Primer, r) bei 45-60°C
- ♦ Polymerisation (elongation): Synthese des fehlenden, komplementären Einzelstranges durch eine hitzestabile DNS-Polymerase bei 72°C

Im Idealfall wird in jedem Zyklus der durch die Oligonukleotide flankierte DNS-Abschnitt verdoppelt, was zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung dieser Sequenz führt (bei  $n$  Zyklen:  $2^{n-1}$ ).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zu folgenden Zwecken durchgeführt:

- ♦ zur Amplifikation von genomischen DNS-Fragmenten aus Mausegewebe (Genotypisierung und Rekombinationsanalyse)
- ♦ zur Expressionsanalyse des cGKI Gens auf RNS-Ebene. Dazu wurde zunächst die RNS enzymatisch durch eine Reverse Transkriptase (RT) in eine cDNS umgeschrieben, die dann durch PCR amplifiziert wurde (RT-PCR, vgl. 2.2.5.4).

### Reagenzien:

**Taq-DNS-Polymerase** (Promega) (5 U/ $\mu$ l)

### Lösungen:

<b>1 M KCl</b>	1 M	KCl (Roth)		74,6 g
		H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml

<b>1 M MgCl<sub>2</sub></b>	1 M	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Roth)		20,3 g
		H <sub>2</sub> O	ad	100 ml

### 10x PCR-Puffer

(mit dNTPs)	500 mM	KCl	(1 M)	2,5 ml
	100 mM	Tris-Cl, pH 8,0	(1 M)	0,5 ml
	15 mM	MgCl <sub>2</sub>	(1 M)	75 $\mu$ l
	je 2 mM	dNTPs <sup>a</sup>	(100 mM)	je 100 $\mu$ l
		H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>		1,525 ml

<sup>a</sup>dATP, dCTP, dGTP, dTTP

### Standard-PCR-Protokoll:

<b>Reaktionsansatz:</b>	DNS (ca. 500 ng genomische DNS)	1,0 $\mu$ l
	Primer A (25 pmol/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
	Primer B (25 pmol/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
	Primer C (25 pmol/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
	10x PCR-Puffer (mit dNTPs)	2,5 $\mu$ l
	Taq-DNS-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	20,5 $\mu$ l

Für die PCR Analyse in Abb. 3.18 A wurde die Menge des Primers RF125 im Ansatz auf 0,065  $\mu$ l / Ansatz reduziert.

<b>Standardbedingungen für die Amplifikation:</b>	bis 1 kb	1 bis 2 kb
(1) initiale Denaturierung	94°C, 5 min	94°C, 5 min
(2) Denaturierung	94°C, 10 sec	94°C, 10 sec
(3) Primeranlagerung	55°C, 30 sec	55°C, 30 sec
(4) Polymerisation	72°C, 30 sec	72°C, 90 sec
(5) finale Polymerisation	72°C, 5 min	72°C, 5 min
Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4):	35	

### 2.2.1.4 Auftrennung von DNS-Fragmenten

Die DNS-Fragmente wurden durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese getrennt (Sambrook et al., 1989). Nukleinsäuren sind negativ geladen und wandern im elektrischen Feld. In einem Agarose-Gel können sie nach Masse aufgetrennt und durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Der DNS-Standard dient dem Größenvergleich der aufgetrennten DNS-Fragmente, die Farbmarker der Kontrolle des Verlaufs der Elektrophorese.

#### Reagenzien:

<b>BPB</b>	50 mg/ml	Bromphenolblau (IBI)		0,15 g
		H <sub>2</sub> O	ad	3 ml
<b>XC</b>	50 mg/ml	Xylencyanol FF (Sigma)		0,15 g
		H <sub>2</sub> O	ad	3 ml
<b>10x TBE</b>	0,5 M	Tris-Base		108 g
		Borsäure (Roth)		55 g
		EDTA		7,2 g
		H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml
<b>Elektrophoresepuffer (1x TBE)</b>		10 x TBE	10 %	in H <sub>2</sub> O
<b>Ethidiumbromid-Stammlsg.</b> (Sigma)		10 mg/ml		wässrig
<b>Auftragspuffer (6x dye)</b>				
	18%	Ficoll Typ 400 (Sigma)		18 g
	0,12 M	EDTA, pH 8,0	(0,5 M)	24 ml
	6x	10x TBE		60 ml
	0,15%	Bromphenolblau	(50 mg/ml)	3 ml
	0,15%	Xylencyanol FF	(50 mg/ml)	3 ml
		H <sub>2</sub> O	ad	100 ml
<b>DNS-Standard</b>		1 kb DNA Ladder (Gibco)		100 µl
		6x PP		0,6 ml
		TE		2,6 ml

#### Protokoll:

- ♦ Agarosegel: 1-2% (g/v) Agarose (Seakem LE, Biozym/BMA) wurden in 1x TBE im Mikrowellenherd aufgeschmolzen. Vor dem Ausgießen bei ca. 60°C in die Gelkammer wurden 2,5 µl/100 ml Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben (finale Konzentration im Gel: 250 ng/ml).

## 2.2.2 Isolierung von DNS-Fragmenten

Um die Sequenz eines DNS-Fragments zu analysieren, wurde dieses mittels PCR amplifiziert und über Agarose-Gelelektrophorese von anderen DNS-Fragmenten getrennt. Zur Isolierung der DNS-Fragmente wurde ein QIAquick Gel Extraction-Kit® (Qiagen) benutzt und nach Vorschrift des Herstellers verfahren.

### Protokoll:

- Es sollte möglichst viel (RT-)PCR-Produkt (d.h. ein möglichst großes Volumen) in möglichst wenigen Agarose-Geltaschen getrennt werden. Die im UV-Licht sichtbaren DNS-enhaltenden Stücke des Agarose-Gels wurden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und 2-3 Stücke (ca. 200 mg) im dreifachen Volumen (600-800 µl) „QG-Puffer“ 10 min bei 50°C aufgelöst.
- 200 µl 100% Isopropanol wurden zugegeben und die Lösungen gemischt.
- Für jede Probe wurde eine „QIAquick spin column“ (Säule) in eine 2 ml „collection tube“ (Auffangröhrchen) gestellt, die Lösung in die Säule gegeben und 1 min (12000xg, RT) zentrifugiert.
- Die Säulen wurden zuerst mit 0,5 ml QG-Puffer, danach mit 0,75 ml „PE-Puffer“ gewaschen (5 min stehen gelassen; zentrifugiert: jeweils 1 min, 12000xg, RT).
- Die DNS war an der Säulenmatrix gebunden und wurde mit 50 µl „EB-Puffer“ (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; vorher mind. 1 min in der Säule lassen) in ein sauberes Eppendorfgefäß eluiert (1 min bei 12000xg, RT zentrifugiert).
- Die Größe und Reinheit des isolierten DNS-Fragments wurde mit Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt.
- Lagerung der gereinigten DNS-Fragmente: -20°C

## 2.2.3 Sequenzanalyse der DNS

Die Sequenzanalyse der DNS wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Dabei wurden DNS-Fragmente mittels „Terminator Cycle Sequencing“ enzymatisch synthetisiert und deren Länge durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die Abfolge der fluoreszenzmarkierten, durch Kapillarelektrophorese aufgetrennten DNS-Fragmente wurden in einem Sequenzierautomat („ABI Prism™ Sequence-Analyzer“, Perkin-Elmer Applied Biosystems) durch einen Laser detektiert. Mittels eines Computerprogramms (Multiscan 100ES, Sony) wurde aus den erhaltenen Daten die DNS-Sequenz der Fragmente errechnet.

### Protokoll des „Terminator Cycle Sequencing“:

- ♦ **Reaktionsansatz:**

DNS (ca. 30-90 ng gereinigtes PCR-Produkt)		3,0 µl
„Terminator Ready Reaction Mix“ <sup>a</sup>		0,25 µl
Primer (0,8 pmol/µl)		0,25 µl
H <sub>2</sub> O	ad	20 µl

<sup>a</sup>enthält „AmpliTaq“ DNS-Polymerase, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 (Perkin-Elmer Applied Biosystems)

- ♦ **Synthese der DNS-Abbruchfragmente:**

- |     |                                            |              |
|-----|--------------------------------------------|--------------|
| (1) | initiale Denaturierung                     | 94°C, 2 min  |
| (2) | Denaturierung                              | 94°C, 30 sec |
| (3) | Primeranlagerung                           | 50°C, 40 sec |
| (4) | Polymerisation                             | 60°C, 4 min  |
|     | Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4): | 25           |

- ♦ Das Sequenzierprodukt wurde mit Centri Sep Spin Columns<sup>®</sup> (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers gereinigt.
- ♦ Die getrocknete DNS wurde in 20 µl Template Suppression Reagent<sup>®</sup> (TSR; Perkin-Elmer Applied Biosystems) suspendiert und vor Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturiert.

## 2.2.4 Präparation und Verabreichung von Tamoxifen

### Reagenzien:

<b>Ölige Tamoxifen-Injektionslösung</b>	Tamoxifen (freie Base) (Sigma)	100 mg
	Ethanol 99,8%	0,5 ml
	Erdnussöl	9,5 ml

### Protokoll:

- ♦ Das Tamoxifen (Sigma T-5648) wurde mit Ethanol 99,8% gut gemischt, danach das Erdnussöl ergänzt und im Ultraschallbad unter Lichtausschluss in ca. 1 min gelöst. Die Lösung wurde vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.
- ♦ Lagerung der Injektionslösung: -20°C; maximal eine Woche
- ♦ Den Mäusen wurde im Alter von 4 und 8 Wochen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen je 100 µl der Stammlösung (1 mg Tamoxifen) oder 100 µl reines Erdnussöl (Vehikel) zur Kontrolle i.p. injiziert. Jeder Maus wurden insgesamt 10 mg Tamoxifen verabreicht (außer den Tieren, welche mit reinem Erdnussöl behandelt wurden).
- ♦ Die Mäuse wurden frühestens 10 Tage nach der letzten Injektion in der Regel durch Genickbruch getötet und analysiert.

## 2.2.5 Analyse der DNS und RNS aus Mausgewebe

### 2.2.5.1 Isolierung von DNS

Die Isolierung von DNS aus Mausgeweben wurde in 2.2.1.1 beschrieben.

### 2.2.5.2 Isolierung von RNS

#### Protokoll:

- Zur Herstellung aller benötigten Lösungen wurde  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  (0,05% Diethylpyrocarbonat (Roth) in  $\text{H}_2\text{O}$ ; über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  geschüttelt, 1 h bei RT inkubiert und autoklaviert) verwendet.
- 50-100 mg Gewebe wurde in 1 ml Trifast peqGold RNAPure<sup>®</sup>,<sup>a</sup> (Peqlab) mit einem UltraTurrax (IKA Werk) homogenisiert, 5 min bei RT stehen gelassen und danach 5 min bei  $1000\times g$  (RT) zentrifugiert.  
(<sup>a</sup>enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat  $\Rightarrow$  unter dem Abzug arbeiten!)
- Zum Überstand wurde 0,2 ml Chloroform gegeben, kräftig geschüttelt, 10 min bei RT stehen gelassen und erneut zentrifugiert (5 min,  $12000\times g$ , RT). Es waren drei getrennte Phasen sichtbar.
- Aus der oberen wässrigen Phase (ca. 0,5 ml) wurde mit 0,5 ml 100% Isopropanol die RNS gefällt (geschüttelt und 5 min bei RT stehen gelassen) und abzentrifugiert (10 min,  $12000\times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ).
- Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 5 min bei  $12000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Die RNS wurde kurz luftgetrocknet und je nach Gewebe in 50-100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  gelöst.
- Lagerung der RNS-Lösungen:  $-80^\circ\text{C}$
- Für die Quantifizierung wurden Verdünnungen von ca. 1:100 hergestellt und vermessen (2.2.1.2). Die RNS wurde auf 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt und für die RT-PCR (2.2.5.4) auf 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt.
- Je nach Gewebe konnten 0,5-10  $\mu\text{g}$  RNS pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden.

### 2.2.5.3 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang zu finden (6.3; 6.4).

### 2.2.5.4 PCR und RT-PCR

Für die Amplifizierung der DNS wurde das Standard-PCR-Protokoll verwendet (2.2.1.3).

#### Reagenzien:

<b>Taq-DNS-Polymerase</b> (5 U/ $\mu\text{l}$ , Promega)	$\Rightarrow$	vor Gebrauch 1+9 in $\text{H}_2\text{O}$ verdünnen
	$\Rightarrow$	0,5 U/ $\mu\text{l}$

**M-MLV-Reverse Transkriptase** (200 U/μl, Invitrogen) ⇒ vor Gebrauch 1+19 in H<sub>2</sub>O verdünnen  
 ⇒ 10 U/μl

### Standard RT-PCR-Protokoll:

- ♦ **Reaktionsansatz:**

RNS	(0,1 μg/μl)	5,0 μl
Primer A	(25 pmol/μl)	0,5 μl
Primer B	(25 pmol/μl)	0,5 μl
10x PCR-Puffer (mit dNTPs)		5,0 μl
H <sub>2</sub> O		34 μl
  
- ♦ **Reverse Transkription:**

(1)	Denaturierung	94°C, 5 min
(2)	Abkühlung	von 94°C auf 50°C in 10 min; 0,07°C / sec
(3)	Zugabe von MMLV-RT (10 U/μl)	5 μl 50°C, 20 min
(4)	Zugabe von Taq-DNS-Polymerase (0,5 U/μl)	5 μl
  
- ♦ **Amplifikation:** (vgl. Standard-PCR-Protokoll, 2.2.1.3)
- ♦ **Auftrennung** der DNS-Fragmente vgl. 2.2.1.4

## 2.2.6 Analyse von Proteinen aus Mausgewebe

### 2.2.6.1 Thrombozytenisolierung aus Mausblut

#### Reagenzien:

**Heparin-Na** (ratiopharm, 25000I.E.) 200 μl/ml Vollblut

#### Protokoll:

- ♦ Mit einer heparinisierten 2 ml Spritze (BD) wurden aus der linken Herzkammer einer direkt zuvor mit Ether betäubten Maus 1-2 ml Vollblut entnommen und zu einer Heparin-Natrium-Lösung gegeben.
- ♦ Danach wurde 15 min bei 200xg zentrifugiert. Erythrozyten und Leukozyten befanden sich im Pellet, die Thrombozyten im Überstand. Der Überstand wurde abgehoben und 5 min bei 3000xg zentrifugiert.
- ♦ Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) eingefroren.
- ♦ Lagerung des Thrombozytenpellets: -80°C
- ♦ Zur Isolierung der Proteine vgl. 2.2.6.3

### 2.2.6.2 Isolierung des glatten Muskelgewebes des Dünndarms

Um die Expression des cGKI Proteins im Darm genauer untersuchen zu können, wurde die glatte Muskulatur vom Dünndarm abgezogen. Dazu wurden 1 cm lange Dünndarmringe auf eine Pasteurpipette aufgezogen und die glatte Muskelschicht mit

einem Skalpell angeritzt, ohne dabei das darunter liegende Gewebe zu verletzen. Mit einer nicht zu spitzen Pinzette konnte danach das glatte Muskelgewebe abgehoben werden und wurde getrennt vom übrig gebliebenen Gewebe eingefroren. Die in der Probe aus „glattem Muskel“ und „Darm ohne glatten Muskel“ enthaltene DNS (2.2.1.1) wurde mittels PCR (2.2.1.3) untersucht.

### 2.2.6.3 Proteinisolierung aus Mausgewebe

#### Reagenzien:

<b>3 M Natriumacetat, pH 5,2</b>		Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O (Roth)	40,8 g
		H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
<b>DTT</b>	0,1 M	1,4-Dithiothreit(ol) (Roth)	0,15 g
	0,001 M	Natriumacetat, pH 5,2 (3 M)	3,3 µl
		H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
<b>PMSF</b>	100 mM	PMSF (Roth)	87 mg
		H <sub>2</sub> O	ad 5 ml
<b>Benzamidin</b>	200 mM	Benzamidin x HCl x H <sub>2</sub> O (Roth)	78,3 mg
		H <sub>2</sub> O	ad 2,5 ml
<b>Leupeptin</b>	2 mg/ml	Leupeptin x ½ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Calbiochem)	2 mg
		50% Ethanol	ad 1 ml
<b>TN-Puffer, pH 8,0</b>	20 mM	Tris-Base	1,21 g
	100 mM	NaCl	2,92 g
		H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

#### + Protease-Inhibitoren:

2,5 mM	DTT	(100 mM)	25 µl/ml TN-Puffer
2,5 mM	EDTA	(500 mM)	5 µl/ml TN-Puffer
2,5 mM	PMSF	(100 mM)	25 µl/ml TN-Puffer
2,5 mM	Benzamidin	(200 mM)	12,5 µl/ml TN-Puffer
1 µg/ml	Leupeptin	(2,0 mg/ml)	0,5 µl/ml TN-Puffer

#### Protokoll:

- Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gewebe wurden nach Zugabe von 1 ml TN-Puffer+Protease-Inhibitoren / 100 mg Gewebe mit einem UltraTurrax-Gerät (IKA Werk) bei ca. 4°C homogenisiert.
- Das Homogenat wurde 10 min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die löslichen Proteine (z.B. cGKI) befanden, wurde abgehoben.
- Lagerung der Proteinlösungen: -80°C
- Für die Quantifizierung wurden Verdünnungen der Proteinlösungen von ca. 0,05 µg/µl Protein (ca. 1:50) hergestellt und vermessen (2.2.6.4).
- Je nach Gewebe konnten 10-100 µg Protein pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden.

### 2.2.6.4 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Blau liegt in saurer Lösung in der braunen Leukoform vor und wird durch Bindung an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen wieder in den ursprünglichen blauen Farbstoff überführt. Durch Messung der Extinktion einer Probenlösung (100 µl Proteinlösung + 1 ml Färbelösung) bei 595 nm lässt sich über eine Eichkurve die Konzentration einer Proteinlösung bestimmen (Bradford, 1976).

#### Reagenzien:

<b>Färbelösung:</b>	Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva)	200 mg
	Ethanol 99,8%	100 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1800 ml
85%	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	200 ml
⇒	die Lösung über Nacht rühren lassen	
⇒	am folgenden Tag so lange filtrieren bis OD <sub>595</sub> konstant bleibt (0,35-0,4 gegen H <sub>2</sub> O)	
⇒	Lagerung: RT, lichtgeschützt	

#### Protokoll:

- ♦ Die Proteinprobe wurde mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von ca. 0,05 µg/µl verdünnt (5 µl+245 µl).
- ♦ 100 µl der Probe wurde in einer Plastikkuvette (1 cm Schichtdicke) mit 1 ml Färbelösung gemischt und 10 min im Dunkeln inkubiert.
- ♦ Die OD<sub>595</sub> wurde bei λ= 595 nm gegen eine Referenzlösung (100 µl H<sub>2</sub>O + 1 ml Färbelösung) gemessen und die Proteinkonzentration über eine Eichgerade (1-10 µg BSA in 100 µl H<sub>2</sub>O) berechnet.

### 2.2.6.5 Western Blot Analyse

Durch die Western Blot Analyse können bestimmte Proteine in Zell- und Gewebeextrakten nachgewiesen werden (Sambrook et al., 1989). Die Proteinproben wurden durch vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt und elektrophoretisch vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert (geblottet). Die Proteine konnten durch spezifische Bindung primärer Antikörper, welche durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper und anschließende Enzymsubstrat-vermittelte Farbreaktion (alkalische Phosphatase-Technik) detektiert wurden, nachgewiesen werden. Eine Aufstellung der verwendeten Antikörper ist im Anhang zu finden (6.5; 6.7). Die gleichmäßige Beladung der Gelspuren wurde mit einer zweiten Immunfärbung mit einem p44/p42 MAP Kinase-Antikörper überprüft.

#### Reagenzien:

<b>4x Tris-Cl / SDS, pH 8,8</b>	1,5 M Tris-Base	91 g
	H <sub>2</sub> O	300 ml
⇒	mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen	
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
0,4%	SDS	2 g

**4x Tris-Cl / SDS, pH 6,8**

0,5 M	Tris-Base		6,05 g
	H <sub>2</sub> O		40 ml
⇒	mit 1 N HCl auf pH 6,8 einstellen		
	H <sub>2</sub> O	ad	100 ml
0,4%	SDS		0,4 g

**6x Probenpuffer (6x PP)**

	4x Tris-Cl / SDS, pH 6,8		7 ml
	Glycerol (Roth)		3,6 ml
10%	SDS		1 g
	DTT		0,93 g
12%	Bromphenolblau		1,2 g
	H <sub>2</sub> O	ad	10 ml

**30% APS**

30%	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (Roth)		30 g
	H <sub>2</sub> O	ad	100 ml
⇒	Lagerung der Aliquots: -20°C		

**Trenngel (9%)**

	Rotiphorese Gel 30 (Roth) <sup>a</sup>		4,5 ml
	4x Tris-Cl / SDS, pH 8,8		3,75 ml
	H <sub>2</sub> O		6,75 ml
	30% APS		25 µl
	TEMED (Roth)		10 µl

**Sammelgel (4%)**

	Rotiphorese Gel 30 <sup>a</sup>		0,65 ml
	4x Tris-Cl / SDS, pH 6,8		1,25 ml
	H <sub>2</sub> O		3,05 ml
	30% APS		12,5 µl
	TEMED		5 µl

<sup>a</sup>30% Acrylamid; 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid**MW-Marker**See-Blue<sup>®</sup> (Invitrogen)**10x SDS-Laufpuffer**

	Tris-Base		15,1 g
	Glycin (Roth)		72,0 g
	SDS		5,0 g
	H <sub>2</sub> O	ad	500 ml

**Anodenlösung I, pH 10,4**

0,3 M	Tris-Base		36,3 g
20%	Methanol, techn.		200 ml
	H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml
⇒	mit HCl auf pH 10,4 einstellen		

**Anodenlösung II, pH 10,4**

20 mM	Tris-Base		3,03 g
20%	Methanol, techn.		200 ml
	H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml
⇒	mit HCl auf pH 10,4 einstellen		

**Kathodenlösung, pH 7,6**

40 mM	$\gamma$ -Aminohexansäure (Roth)	5,2 g
20 mM	Tris-Base	3,03 g
20%	Methanol, techn.	200 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
⇒	mit HCl auf pH 7,6 einstellen	

**10x TBS**

10 mM	Tris-Base	6,05 g
150 mM	NaCl	43,8 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
⇒	mit HCl auf pH 8,2 einstellen	

**Blockierungs-Lösung**

BSA <sup>a</sup> (Roth)	2,5 g
10x TBS	5 ml
Tween 20 (ICN)	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
<sup>a</sup> (Bovines Albumin Fraktion V)	

**TBST**

10x TBS	25 ml
Tween 20	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 250 ml

**Milchpulver-TBST**

Milchpulver (Reformhaus)	5,0 g
10x TBS	50 ml
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**10% Natriumazid**

NaN <sub>3</sub> (Sigma)	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

**Lösung mit primärem Antikörper**

1x TBS, sterilfiltriert	15 ml
BSA (1:200 in H <sub>2</sub> O)	75 $\mu$ l
NaN <sub>3</sub> (10%)	75 $\mu$ l
Primärer Antikörper (Stammlösung)	x $\mu$ l

**Lösung mit sekundärem Antikörper**

Milchpulver-TBST	15 ml
Sekundärer Antikörper	3 $\mu$ l

**NBT (Sigma)**

50 mg/ml	in 70% DMF
⇒ Lagerung:	-20°C; lichtempfindlich

**BCIP (Sigma)**

50 mg/ml	in 50% DMF
⇒ Lagerung:	-20°C; lichtempfindlich

<b>AP-Puffer, pH 9,5</b>	100 mM	Tris-Base	2,4 g
	100 mM	NaCl	1,17 g
	5 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,203 g
		H <sub>2</sub> O	ad 200 ml
	⇒	mit HCl auf pH 9,5 einstellen	
<b>AP-Puffer-Mix</b>		AP-Puffer, pH 9,5	20 ml
		NBT	80 µl
		BCIP	80 µl

**Protokoll:**

- Die Proteinlösungen wurden mit 6x PP (10 µl / 60 µl Probenlösung) und H<sub>2</sub>O verdünnt, so dass sich in 20 µl aufgetragener Probenlösung 20-50 µg Gesamtprotein befanden (je nach Gewebe).
- Zuerst wurde das Trenngel (9%) (mit Ethanol 99,8% überschichtet und 1 h bei RT stehen gelassen ⇒ Polymerisation) und nach Absaugen des Ethanols das Sammelgel (4%) gegossen.
- Vor dem Auftragen wurden die Probenlösungen bei 95°C 5 min denaturiert und zentrifugiert (5 min, 12000xg).
- Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 160 mV durchgeführt und kurz vor Herauslaufen des Markers (Lauffront) beendet.
- Nach der Trennung der Proteine wurden diese auf eine zuvor mit 100% Methanol benetzte, positiv geladene PVDF-Membran (Immobilon-P<sup>®</sup>, Millipore) geblottet. Dazu wurden mit Puffer getränkte Filterpapiere, die Membran und das Trenngel in folgender Reihenfolge zwischen Anoden- und Kathodenplatte luftblasenfrei aufeinandergelegt:

- |       |     |                                     |
|-------|-----|-------------------------------------|
| oben  | (1) | Kathodenplatte                      |
|       | (2) | 9 Filterpapiere / Kathodenpuffer    |
|       | (3) | Trenngel                            |
|       | (4) | Membran (Immobilon-P <sup>®</sup> ) |
|       | (5) | 3 Filterpapiere / Anodenpuffer II   |
|       | (6) | 6 Filterpapiere / Anodenpuffer I    |
| unten | (7) | Anodenplatte.                       |

- Es wurde 50 min bei 50 mA / Gel geblottet, danach Filterpapiere und Trenngel verworfen, die Membran mindestens 60 min bei RT in Blockierungs-Lösung und danach 10 min in 40 ml TBST gewaschen.
- Die Inkubation mit primärem Antikörper wurde bei 4°C über Nacht vorgenommen, der nichtgebundene Antikörper dreimal mit Milchpulver-TBST bei RT entfernt.
- Die Membran wurde 60 min in der Lösung mit sekundärem Antikörper geschüttelt und nichtgebundener Antikörper einmal mit Milchpulver-TBST und zweimal mit TBST abgewaschen.
- Zum Entwickeln wurde die Membran in AP-Puffer-Mix gelegt und so lange geschüttelt, bis die Banden deutlich sichtbar waren (ca. 10 min).

## 2.2.7 Histologische Färbungen

### 2.2.7.1 Anfertigung von Gefrierschnitten des Gehirns

Die entnommenen Gehirne wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und das Gewebe in einem Kryostaten (Leica CM 3000) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  16  $\mu\text{m}$  dick geschnitten. Die Gehirnschnitte wurden auf Polylysin-beschichtete Objektträger (Menzel) aufgebracht und sofort weiterverarbeitet.

#### Reagenzien:

<b>10x PBS</b>		NaCl	40 g
		KCl	1 g
		$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	3,1 g
		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
		$\text{H}_2\text{O}$	ad 500 ml
<b>4% PFA-PBS</b>		Paraformaldehyd (Sigma)	6 g
		10x PBS	15 ml
		$\text{H}_2\text{O}$	ad 500 ml
<b>20x SSC</b>	3 M	NaCl	175,3 g
		$\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	88,2 g
		$\text{H}_2\text{O}$	ad 1000 ml
<b>0,5x SSC</b>		20x SSC	1:40 in $\text{H}_2\text{O}$

#### Protokoll:

- ♦ Die Gefrierschnitte der Mausgehirne (2.2.7.1) wurden 20-30 min Vakuum-getrocknet, 30 min in 4% PFA-PBS bei RT fixiert und 10 min mit 0,5x SSC gewaschen.
- ♦ Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30/60/80/95/100%) dehydratisiert, 5 min an der Luft und 30 min Vakuum-getrocknet.
- ♦ Lagerung:  $-80^{\circ}\text{C}$ ; dicht verschlossen mit Trocknungsmittel

Die *in situ*-Hybridisierung wurde von Sabine Brummer durchgeführt.

### 2.2.7.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

#### Reagenzien:

<b>PBS, pH 7,4</b>	135 mM	NaCl	4 g
	3 mM	KCl	100 mg
	8 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	720 mg
	2 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	120 mg
		$\text{H}_2\text{O}$	ad 500 ml
	⇒	mit HCl auf pH 7,4 einstellen	

<b>Fixierlösung</b>	10%	Formaldehyd (Sigma) (37%)	37 ml
		10x PBS	10 ml
		H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

**Paraffin** Paraplast (Sigma) ⇨ bei 60°C geschmolzen

### Protokoll:

- Die mit Diethylether betäubten Mäuse wurden gewogen, der Brustkorb und die Vena cava geöffnet. Über eine Kanüle in der linken Herzkammer wurde mit Fixierlösung 15 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min perfusionsfixiert (2.2.16.1) (Zhang et al., 1994).
- Herz, Aorta und Nieren wurden für weitere Untersuchungen entnommen und 2 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4°C nachfixiert. Die Gewebe wurden zweimal 60 min mit PBS gewaschen
- Lagerung der Gewebe: 4°C
- Die fixierten und gewaschenen Gewebe wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydratisiert:

50% Ethanol	mind. 60 min
60% Ethanol	mind. 60 min
70% Ethanol	mind. 60 min (Lagerung möglich)
80% Ethanol	mind. 60 min
90% Ethanol	mind. 60 min
95% Ethanol I+II	2x mind. 60 min
99,8% Ethanol I+II+III	3x mind. 60 min
99,8% Ethanol / Roticlear® (Roth) (1:1)	mind. 60 min
100% Roticlear I+II+III	3x mind. 30 min

- Nach der Dehydratisierung wurden die Gewebe dreimal in geschmolzenes Paraffin (60°C) gelegt, danach in frisch geschmolzenem Paraffin eingebettet und bei 4°C erstarren gelassen:

Paraplast I	mind. 60 min
Paraplast II	mind. 60 min
Paraplast III	mind. 60 min

- Mit einem Microtom (Microm HM 335 E) wurden 4-12 µm dicke Schnitte angefertigt, in 37°C warmem Wasser gestreckt und auf polylysierte Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 37°C getrocknet.
- Lagerung der Objektträger: 4°C
- Um die Schnitte histologisch färben zu können, mussten sie entparaffinisiert und rehydratisiert werden:

100% Roticlear	3x 5 min
99,8% Ethanol	2x 5 min
95% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
80% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
60% Ethanol	5 min
PBS	mind. 5 min

### 2.2.7.3 Kernfärbung

#### Reagenzien:

<b>Hoechst-Stammlsg.</b>	Hoechst Nr. 33258 (Sigma)	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
⇒	Lagerung: -20°C; lichtempfindlich	
<b>Einbettmedium</b>	Hoechst-Stammlösung	5 µl
	Glycerol (Roth)	ad 5 ml
		≙ 1 µg/ml
⇒	Lagerung: -20°C; lichtempfindlich	

#### Protokoll:

- Das Einbettmedium wurde auf die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte gegeben und mind. 24 h einwirken gelassen.
- Die Deckgläschen wurden mit klarem Nagellack fixiert.
- Im UV-Licht ( $\lambda = 395$  nm) leuchten die Zellkerne blau. (Zeiss; Filtersatz # 2, Anregungsfilter G 395 (nm); Strahlenteiler 395 nm; Sperrfilter LP 420)

### 2.2.7.4 Immunhistologische Färbungen

Die Anwesenheit und Verteilung bestimmter Proteine im Gewebe wurde durch Immunfärbungen von Gewebeschnitten nachgewiesen. Dazu wurden deparaffinierte und rehydrierte Paraffinschnitte mit primären Antikörpern behandelt. Die Bindung spezifischer Antikörper an die Gewebeproteine wurde durch biotinylierte Sekundärantikörper, Avidin-gekoppelte Enzymkomplexe und anschließende Enzymsubstrat-vermittelte Farbreaktion (ABC-Technik) detektiert (Vectastain Elite/AP/Vector M.O.M.<sup>®</sup>, Vector Laboratories). Eine Aufstellung der verwendeten primären und sekundären Antikörper ist im Anhang zu finden (6.6; 6.7).

#### Reagenzien:

<b>3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS</b>	3%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Merck)	(30%)	10 ml
	30%	Methanol		30 ml
		PBS	ad	100 ml
<b>Serum-PBS</b>	1,5%	Normal Goat Serum (Vector)		150 µl
		PBS	ad	10 ml
<b>Lösung mit primärem Antikörper</b>				
	1,5%	Prim. Antikörper		x µl
		Normal Goat Serum (Vector)		150 µl
		PBS	ad	10 ml

**Lösung mit sekundärem Antikörper**

	1:200	Biotinyl. sek. Antikörper (Vector)	50 µl
	1,5%	Normal Goat Serum (Vector)	150 µl
		PBS	ad 10 ml
<b>ABC-Lösung</b> (Vector)	1:100	Reagenz A (Avidin DH)	100 µl
	1:100	Reagenz B (biotinyliertes Enzym)	100 µl
		PBS	ad 10 ml
	⇒	mind. 30 min vor Gebrauch herstellen und bei RT im Dunkeln den Komplex bilden lassen	
<b>DAB-Stammlösung</b>	0,1%	DAB (Sigma)	40 mg
		PBS	ad 40 ml
	⇒	Lagerung: -20°C; lichtempfindlich	
<b>DAB-PBS</b>	0,05%	DAB-Stammlösung (0,1%)	3 ml
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	2 µl
		PBS	3 ml
<b>Vector Blue<sup>®</sup>-Lösung</b> (Vector)			
	1:50	Lösung 1	200 µl
	1:50	Lösung 2	200 µl
	1:50	Lösung 3	200 µl
	100 mM	Tris-Cl, pH 8,0 (1 M)	1 ml
		H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

**Protokoll:**

- ♦ Die rehydrierten Schnitte (vgl. 2.2.7.2) wurden zur Blockade endogener Peroxidasen 10 min mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS behandelt, danach 5 min mit PBS gewaschen, mit einem ImmEdge-Pen<sup>®</sup> (Vector) umrandet und mindestens 1 h mit 1,5 % Serum-PBS blockiert.
- ♦ Das Serum-PBS wurde abgekippt und die Schnitte mit primärem Antikörper (6.6) 1 h bei RT inkubiert.
- ♦ Die Lösung wurde abgesaugt und dreimal mit Serum-PBS gewaschen.
- ♦ Danach wurde die Lösung mit dem sekundären Antikörper auf die Schnitte pipettiert und 30 min bei RT inkubiert.
- ♦ Die Schnitte wurden einmal mit Serum-PBS und zweimal mit PBS gewaschen, daraufhin mit der ABC-Lösung 30 min im Dunkeln behandelt.
- ♦ Der ungebundene Komplex wurde dreimal mit PBS von den Schnitten gewaschen. Die mit der ABC-AP-Lösung (Enzymkomplex mit einer Alkalischen Phosphatase) inkubierten Schnitte wurden noch einmal 5 min mit einem 100 mM Tris-Puffer, pH 8,0 behandelt.
- ♦ Zur Detektion wurden entweder DAB-PBS ( für das Peroxidase-gekoppelte System) oder Vektor Blue<sup>®</sup> -Lösung (für das Alkalische Phosphatase-gekoppelte System) auf die Schnitte pipettiert und 5-20 min bis zur Bildung der Farbstoffe inkubiert. Die Schnitte wurden 5 min mit PBS und 1 min mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen und in Höchst-Farbstoff-haltigem Medium zur Färbung der Zellkerne eingebettet (vgl. 2.2.7.3).
- ♦ Für Doppelfärbungen wurden zwei Färbeschritte hintereinander durchgeführt.
- ♦ Lagerung der Objektträger: 4°C
- ♦ Die Schnitte wurden innerhalb einer Woche fotografiert (2.2.7.5).

### **2.2.7.5 Dokumentation**

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem „Axioskop“ (Zeiss) im Hellfeld oder im Fluoreszenzlicht (Höchst-Kernfärbung, 2.2.7.3) bei einer 100- bis 400-fachen Vergrößerung ausgezählt (2.2.8) und fotografiert (Kamera: Nikon F 301; automatische Belichtung; Film: Kodak Ektachrom EPY 64 T). Die Gehirnschnitte wurden durch ein Stereomikroskop („Stemi SV6“, Zeiss) x vergrößert und im Hellfeld fotografiert (2.2.16.3).

### **2.2.8 Bestimmung der Effizienz der cGKI Reduktion und des Anteils der proliferierenden VSMCs**

Um eine ungefähre Vorstellung davon zu bekommen, wie stark die cGKI Expression in den glatten Muskelzellen der konditionalen cGKI-defizienten Mäuse reduziert ist, wurden die cGKI-immungefärbten und kerngefärbten Gewebeschnitte von Aorta (8  $\mu\text{m}$ ) und Darm (10-12  $\mu\text{m}$ ) mit einem „Axioskop“ (Zeiss) genauer untersucht. Zunächst wurden die Höchstgefärbten Kerne der glatten Muskelzellen eines Gesichtsfeldes im UV-Licht (395 nm) ausgezählt. Beleuchtete man die Schnitte zusätzlich schwach mit polychromatischem Licht, konnte man die Zellkerne und gleichzeitig die Immunfärbung erkennen. Dadurch konnte in der Aorta die Zahl der cGKI- bzw. PCNA- exprimierenden Zellen im Gesichtsfeld festgestellt und der prozentuale Anteil der Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet werden (3.5.2.3). Die Dünndarmschnitte waren zu dick, um auf diese Weise zu genauen Ergebnissen zu gelangen. Die Effizienz konnte allerdings durch Auszählen der immungefärbten und ungefärbten Muskelzellen in der Längsmuskelschicht abgeschätzt werden.

### **2.2.9 Vergleich der Muster der Fußabdrücke**

Ataxien und Abnormalitäten des Gangs können bei Mäusen sehr einfach anhand der Muster der Fußabdrücke festgestellt werden (vgl. Carter et al., 1999). Dazu wurden die Hinterpfoten der Versuchstiere mit ungiftiger, blauer Tinte, die Vorderpfoten mit roter Tinte bestrichen. Die Mäuse wurden vor einem Tunnel (10 cm Breite x 35 cm Länge x 10 cm Höhe), der mit weißem Papier ausgelegt war, platziert. Beim Laufen durch den Tunnel hinterließen die Tiere ihre Fußabdrücke auf dem Papier und das Muster der Fußabdrücke konnte ausgewertet werden. Folgende Parameter wurden verglichen: 1) Abstand der Abdrücke jeweils eines Fußes zueinander („Schrittlänge“), 2) die Schrittbreite, d.h. der Abstand der Vorder- bzw. Hinterpfoten von einer gedachten Mittellinie in der Laufspur, 3) die Geradlinigkeit der Spur und 4) die Überlappung der Fußabdrücke von Vorder- und Hinterpfoten. Ein ataktischer Gang ist durch eine hohe Variabilität der Schrittlänge und häufige Änderungen der Bewegungsrichtung gekennzeichnet (vgl. Barlow et al., 1996).

### 2.2.10 Untersuchung der motorischen Lernfähigkeit

Die motorische Lernfähigkeit wurde mittels eines „Runway“ Tests (auch „Beam walking“ Test genannt) beurteilt. Dazu wurden die Versuchstiere über eine Brücke, bestehend aus einem 110 cm langem und 1 cm breitem Stab mit zehn 5 mm hohen Hindernissen im Abstand von je 10 cm, laufen gelassen. Der Stab lag in 40 cm Höhe und endete an einer Plattform auf dem Käfig der Mäuse. Die Tiere wurden mit Blickrichtung zur Plattform auf das eine Ende der Stange gesetzt und sollten in Richtung Käfig die Brücke überwinden. Die Aus-/ Abrutscher („slips“) von Vorder- und Hinterbein jeweils einer Seite wurden von zwei Personen gezählt. Ein „slip“ wurde nur dann gezählt, wenn sich der Fuß der Maus deutlich unterhalb der Oberkante des Stabes befand und das Tier währenddessen kurzzeitig das Gleichgewicht verlor. Jede Maus wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen 5 Mal nacheinander getestet.

### 2.2.11 Bestimmung der Magen-Darm-Motilität mittels Röntgenkontrastuntersuchung

Um die Motilität des Magen-Darm-Trakts zu untersuchen, wurde den Versuchstieren mit einer Schlundsonde ein Bariumsulfat-haltiges Kontrastmittel oral verabreicht. Durch Anfertigung aufeinanderfolgender Röntgenbilder zu zuvor festgelegten Zeitpunkten konnte die Weiterbewegung des Kontrastmittelbreies im Verdauungstrakt verfolgt werden. Es war darauf zu achten, dass die Mäuse zur Vermeidung von Verstopfungen ausreichend Wasser aufnehmen konnten. Die Untersuchungen wurden in der Tierklinik der Ludwig-Maximilian-Universität in München (Leitung: Prof. Dr. Matis; Röntgenabteilung der Chirurgie: Dr. Hecht) durchgeführt.

#### Reagenzien:

<b>Röntgenkontrastmittel</b>	Unibaryt (Goldham)	0,6 ml / Maus
⇒	BaSO <sub>4</sub> -haltig, dickflüssig, mit Erdbeergeschmack	

#### Material:

<b>Schlundsonde</b>	1 ml – Spritze (Codan) + kurzer Plastikschlauch	
<b>Röntgengerät</b>	Siemens Polymat 70 (FFA = 1,15 m)	
⇒	Belichtungsdaten:	60 kV, 4 mA; 8 msec
<b>Verstärkerfolie</b>	Mammo medium (Fuji)	
<b>Film</b>	Mammoray (Fuji)	

**Protokoll:**

- ♦ Am Vortag wurde den Versuchstieren das Trockenfutter entzogen, so dass sich der Magen-Darm-Trakt entleeren konnte.
- ♦ Nach 10 h wurden den Versuchstieren im Abstand von 3-5 min über eine Schlundsonde 0,6 ml Unibaryt-Suspension verabreicht. Hierbei war darauf zu achten, dass das Fell der Mäuse nicht mit dem Kontrastmittel verschmutzt wurde, da die Flecke sonst auf den Röntgenbildern zu sehen gewesen wären.
- ♦ Um die Mäuse in der Seitenlage fixieren zu können und um ein übermäßiges Zappeln der Tiere zu verhindern, wurden ihnen während der Aufnahmen eine Baumwollmanschette (eigentlich für die Messung des Blutdrucks/"tail cuff"- Methode) angelegt. Die Tiere waren vor dem Versuch an die Manschette gewöhnt worden.
- ♦ Von jeder Maus wurden vor (t=leer), direkt nach (t=0) Verabreichung des Kontrastmittels und 10, 20, 30, 60, 120, 180 und 260 min (t= x min) nach Gabe der Suspension Röntgenaufnahmen angefertigt. Die Entwicklung der Filme erfolgte sofort nach der Belichtung.

**2.2.12 Bestimmung der Darmpassagezeit**

Den Versuchstieren wurde ein weißes, Bariumsulfat-haltiges Röntgenkontrastmittel oral verabreicht. Dadurch konnte die Darmpassagezeit (= Zeit zwischen Gabe der Suspension und Ausscheidung weiß-gefärbter Faeces) bestimmt werden.

**Reagenzien:**

<b>Röntgenkontrastmittel</b>	Unibaryt (Goldham)	0,6 ml / Maus
	⇒ BaSO <sub>4</sub> -haltig, dickflüssig, mit Erdbeergeschmack	

**Material:**

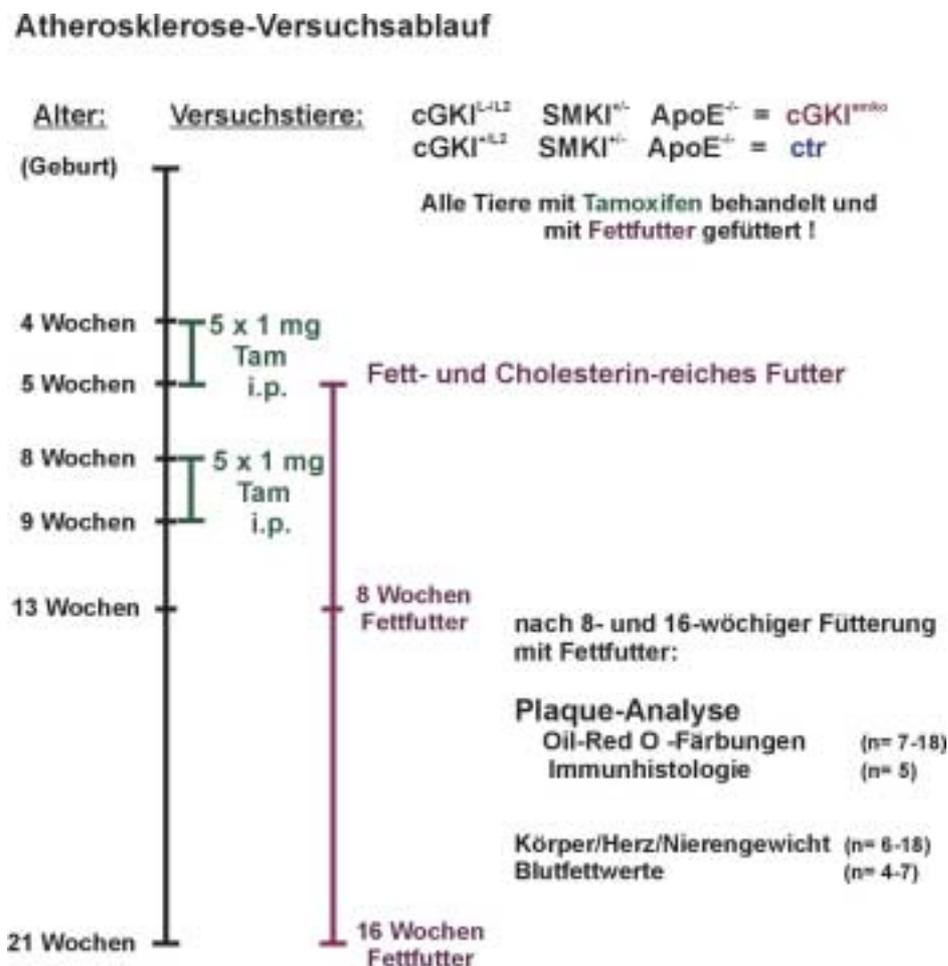
<b>Schlundsonde</b>	1 ml – Spritze (Codan) + kurzer Plastikschlauch
---------------------	-------------------------------------------------

**Protokoll:**

- ♦ 4 h vor Verabreichung der Unibaryt-Suspension wurde den Mäusen das Trockenfutter entzogen.
- ♦ Danach wurde den Versuchstieren über eine Schlundsonde 0,6 ml des Kontrastmittels gegeben. Die Zeitpunkte wurden für jedes Tier notiert.
- ♦ Die Mäuse wurden 7 h beobachtet und die Zeit, nach welcher zum ersten Mal weiß-gefärbte Faeces abgegeben wurde, festgehalten.

### 2.2.13 Induktion der Bildung atherosklerotischer Plaques durch Fett- und Cholesterin- reiches Futter

Homozygote  $ApoE^{-/-}$  Mäuse entwickeln bei Fütterung mit Standardfutter atherosklerotische Plaques im Aortenbogen und im deszendierenden Teil der Aorta (1.4; 2.1.3). Durch Fütterung der Tiere mit Fett- und Cholesterin- reichem Futter kann die Plaquebildung beschleunigt und verstärkt werden. In einem Vorversuch (3.5.1) wurde zunächst getestet, ob in Apo E-defizienten Mäusen durch dieses Spezialfutter die Bildung von Plaques induziert werden kann, und die Größe der Plaques mit denen in Aorten von heterozygoten Apo E-defizienten (+/-) Mäusen, Wildtypmäusen oder  $cGKI^{+/L-}$  Mäusen verglichen (Daten z.T. nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der cGKI auf die Plaquebildung getestet (3.5.2), wozu alle Versuchstiere nach folgendem Schema mit Tamoxifen behandelt und mit Fett- und Cholesterin- reichem Futter gefüttert wurden (**Abb. 2.4**).



**Abb. 2.4: Schema des Versuchsablaufes**

Die Kontrollmäuse (ctr) und konditionalen Knockout Mäuse ( $cGKI^{smko}$ ) wurden im Alter von 4 und 8 Wochen mit Tamoxifen behandelt und erhielten ab der 6. Lebenswoche Fett- und Cholesterin-reiches Futter. Nach 8- bzw. 16-wöchiger Fütterung wurden sie im Alter von 13 bzw 21 Wochen untersucht (Plaque Analyse und Analyse verschiedener physiologischer Parameter).

**Reagenzien:****Fett- und Cholesterin- reiches Futter**

20%	Rohfett (pflanzlich)		2 kg
1,5%	Cholesterin		150 g
	Standardfutter Altromin 1324 <sup>a</sup>	ad	10 kg
	<sup>a</sup> Alleinfuttermittel für Mäuse (Altromin)		

**2.2.14 Bestimmung von Herz-, Nieren und Körpergewicht**

Die Mäuse wurden direkt nach dem Töten gewogen (Precisa 3000C-6000D). Das Herz- und Nierengewicht wurde nach Fixierung, Waschen und Trockentupfen mit Hilfe einer Feinwaage (Mettler AE 163) erfasst.

**2.2.15 Bestimmung von Blutfettwerten**

Die Blutproben der Versuchstiere wurden von der Firma Medical Service München (München) analysiert. Es wurden die Konzentrationen von Gesamtcholesterin, Triglyceriden, LDL und HDL bestimmt.

**Reagenzien:**

<b>Heparin-Na</b> (ratiopharm, 25000I.E.)	200 µl/ml Vollblut
-------------------------------------------	--------------------

**Protokoll:**

- Den Mäusen wurde 6 h vor Blutentnahme das Futter entzogen.
- Die Tiere wurden mit Diethylether (aus der Apotheke des Klinikums Rechts der Isar) betäubt und möglichst viel Blut (mind. 1 ml) mit einer heparinisierten 1 ml Spritze aus der linken Herzkammer gezogen.
- Das Blut wurde in beschriftete Eppendorfgefäße überführt und 2 h bei RT stehen gelassen.
- Danach wurde 3 min bei 3000xg zentrifugiert.
- Der Überstand (Serum) wurde abgehoben, über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag von der Firma Medical Service (München) untersucht.
- Die Aorten der Mäuse wurden entnommen und über Nacht in 10% Formaldehyd-PBS fixiert und danach in Paraffin eingebettet (vgl. 2.2.7.2).

## 2.2.16 Analyse der atherosklerotischen Plaques in der Aorta

Um die Größe und Verteilung der atherosklerotischen Plaques in der Aorta untersuchen zu können, wurden die Aorten mit einer Formaldehydlösung noch vor Entnahme fixiert (Perfusionsfixierung) (Zhang et al., 1994). Dadurch wurde 1) Blut aus dem Gefäß ausgeschwemmt, 2) verhindert, dass die Aorta nach Entnahme kollabiert und 3) dass Proteine abgebaut werden. Die Plaques wurden mit einem fettlöslichen roten Farbstoff (Oil Red O) angefärbt. Zur Bestimmung der Plaqueläche wurden die Aorten (-bögen) beidseitig fotografiert, die Dias eingescannt und mit Hilfe des Computerprogramms Image Tool (University of Texas; Health Science Centre, Version 3.0) ausgewertet.

### 2.2.16.1 Perfusionsfixierung von Mausgeweben

#### Reagenzien:

<b>Fixierlösung</b>	10%	Formaldehyd (Sigma)	(37%)	37 ml
		10x PBS		10 ml
		H <sub>2</sub> O	ad	100 ml

#### Protokoll:

- Die mit Diethylether betäubten Mäuse wurden gewogen (2.2.14), der Brustkorb und die rechte Herzkammer geöffnet. Über eine Kanüle in der linken Herzkammer wurde mit Fixierlösung 20 min mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min perfusionsfixiert.
- Herz, Aorta und die Nieren wurden für weitere Untersuchungen entnommen und 2 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4°C in Fixierlösung nachfixiert. Die Gewebe wurden zweimal 60 min mit PBS gewaschen.
- Lagerung der Gewebe: 4°C

### 2.2.16.2 Färbung der atherosklerotischen Plaques mit Oil Red O

#### Reagenzien:

<b>1 M NaOH</b>	1 M	Natriumhydroxid (Roth)		40 g
		H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml
<b>78% Methanol</b>	78%	Methanol		78 ml
		H <sub>2</sub> O	ad	100 ml
<b>Oil Red O-Stammlsg.</b>	0,5%	Oil Red O (Sigma)		0,4 g
		Methanol, techn.	ad	80 ml
		⇒ frisch herstellen		
<b>Färbelösung</b>		NaOH	(1 M)	10 ml
		Oil Red O-Stammlösung	(0,5%)	35 ml
		⇒ frisch herstellen und filtrieren		

**Protokoll:**

- Die fixierten Aorten wurden möglichst gut von Fett- und Bindegewebe befreit, 5 min in 78% Methanol gewaschen und danach 90 min in der Färbelösung gefärbt.
- Danach wurden die Aorten 5 min mit 78% Methanol entfärbt, um den Farbstoff aus dem weniger fettreichen Gewebe auszuwaschen und damit den Kontrast zu erhöhen.
- Anhaftendes fettreiches Gewebe wurden vorsichtig abgezupft, um die rot-gefärbten Plaques eindeutig erkennen zu können.

**2.2.16.3 Dokumentation**

Die präparierten und gefärbten Aorten wurden zwischen zwei mit klarem Nagellack abgedichteten, mit PBS gefüllten Diarahmen (Gepe) eingeklemmt und mit einem Stereomikroskop („Stemi SV6“, Zeiss; Vergrößerung: 20x bzw. 40x; im Dunkelfeld) von beiden Seiten fotografiert (Kamera: Nikon F 301; automatische Belichtung; Film: Kodak Ektachrom EPY 64 T). Zur Bestimmung der Plaquefläche (2.2.16.4) wurde ein Maßstab (1 mm) mitfotografiert.

**2.2.16.4 Bestimmung der Plaquefläche**

Zur Bestimmung der Plaquefläche wurden die Dias der Aortenbögen (je zwei Dias/Maus; Vergrößerung 40x) eingescannt und mit dem Programm ImageTool (UTHSCSA, Version 3.0) ausgewertet.

**2.2.16.5 Statistik**

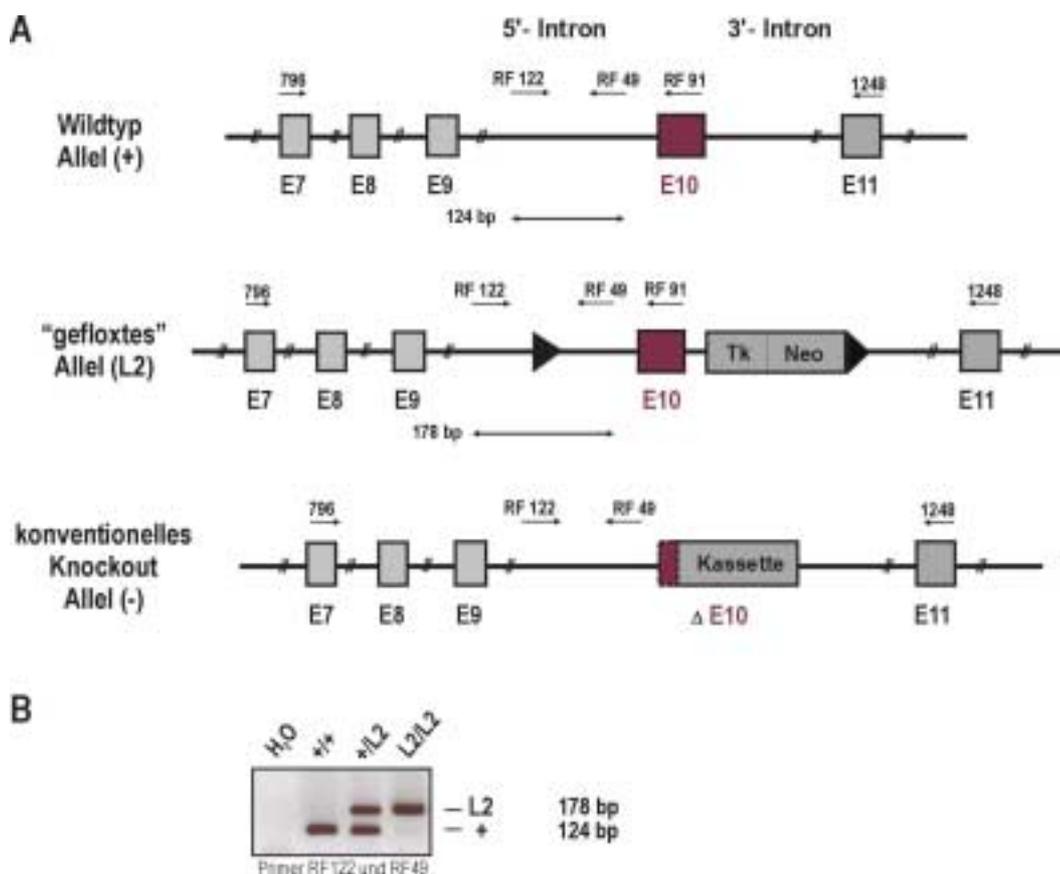
Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Tests untersucht (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; n = Anzahl der untersuchten Tiere).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung „gefloxter“ cGKI Mäuse

##### 3.1.1 Zucht homozygot „gefloxter“ cGKI Mäuse

Die  $cGKI^{L2}$  Mäuse, deren Exon 10 des cGKI Gens durch zwei *loxP*-DNS-Sequenzen gleicher Orientierung flankiert ist (L2; **Abb. 3.1 A**; vgl. 2.1.1; 6.1), wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Feil generiert. Das Exon 10 kodiert einen Teil der MgATP- Bindungsstelle und ist deshalb essentiell für die Proteinkinaseaktivität der cGKI. Die Genotypisierung wurde mittels PCR Analyse der Schwanz-DNS durchgeführt (**Abb. 3.1 B**). Die nach Verkreuzen von heterozygoten ( $cGKI^{+/L2}$ ) Mäusen entsprechend den Mendel'schen Regeln geborenen homozygoten ( $cGKI^{L2/L2}$ ) Tiere waren phänotypisch unauffällig. Die Erzeugung von  $cGKI^{L2/L2}$  Tieren bestätigte, dass die *loxP*-Sequenzen im cGKI Genort integriert waren.

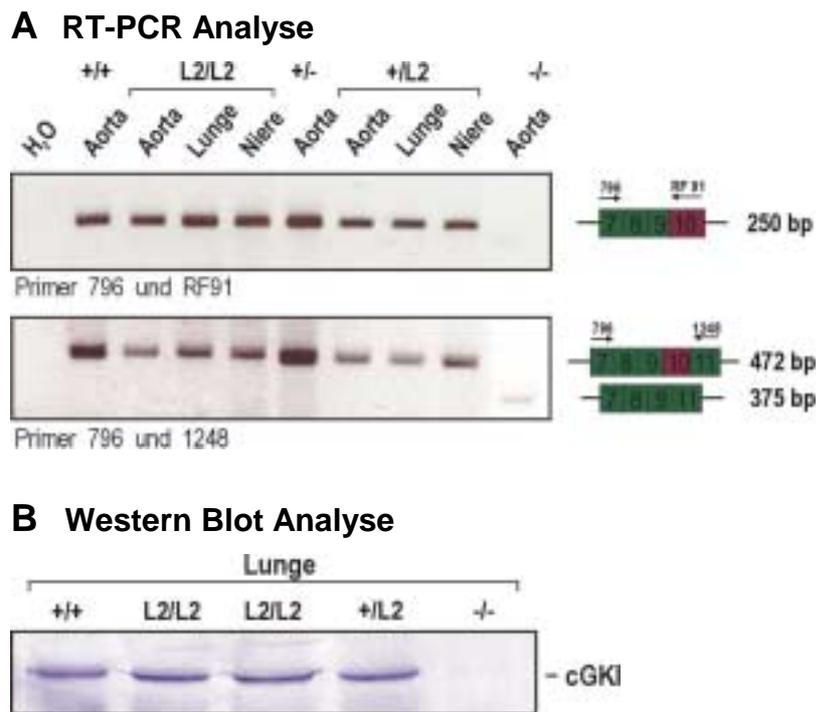


**Abb. 3.1: Genotypisierung der  $cGKI^{L2}$  Mäuse**

(A) Dargestellt sind der cGKI Wildtyp Genort, der  $cGKI^{L2}$  Genort und der konventionelle cGKI Total-Knockout Genort (Nullallel) sowie die Lage der verwendeten Primer. (B) Genotypisierung der Mäuse mittels PCR (2.2.1) mit den Primern RF122 und RF49 (6.3; 6.4). Weitere Erklärungen im Text.

### 3.1.2 Expression der cGKI in $cGKI^{L2}$ Mäusen

Um zu testen, ob die cGKI vom *loxP*-flankierten („geflochten“) L2 Allel normal exprimiert wird, wurden Transkription und Translation untersucht. Aus verschiedenen Geweben vier Wochen alter  $cGKI^{L2/L2}$  und  $cGKI^{+/L2}$  Mäuse wurden RNS bzw. Proteine isoliert und durch RT-PCR bzw. Western Blot analysiert. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden Proben aus Wildtyp- und konventionellen  $cGKI^{-/-}$  Mäusen verwendet. Die cGKI Wildtyp-RNS und das cGKI Protein konnte in allen untersuchten Geweben der homozygoten ( $cGKI^{L2/L2}$ ) und heterozygoten ( $cGKI^{+/L2}$ ) Mäuse detektiert werden (**Abb. 3.2**). Mit den Primern 796 und 1248 wurde in der RT-PCR Analyse der RNS aus der Aorta einer  $cGKI^{-/-}$  Maus ein kürzeres cDNS-Fragment (375 bp) detektiert (**Abb. 3.2 A**, vgl. 3.2.1). Die Expression des cGKI Proteins war ähnlich stark in  $cGKI^{L2/L2}$ ,  $cGKI^{+/L2}$  und Wildtyp-Proben (**Abb. 3.2 B**). Die Anwesenheit der *loxP*-Sequenzen und des *Tk/Neo* Gens (**Abb. 3.1**) schien die Expression der cGKI vom „geflochten“ Allel also nicht zu stören.



**Abb. 3.2: RT-PCR und Western Blot Analyse der Expression von cGKI in  $cGKI^{L2}$  Mäusen**

(A) Nachweis der Wildtyp cGKI-RNS (vgl. 2.2.5.2) in verschiedenen Organen hetero- und homozygoter  $cGKI^{L2}$  Mäuse unter Verwendung zweier unterschiedlicher Primerkombinationen (Primer 796+RF91, 796+1248; vgl. 6.3;6.4). Die potentiell amplifizierte Exons sind angegeben. Die RNS wurde wie unter 2.2.5.2 und 2.2.5.4 angegeben isoliert und durch RT-PCR (2.2.5.4) amplifiziert. In  $cGKI^{-/-}$  Gewebe konnte keine intakte Wildtyp-RNS nachgewiesen werden. (B) Nachweis des cGKI Proteins in der Lunge von  $cGKI^{L2}$  Mäusen. In Knockout Gewebe konnte die cGKI nicht detektiert werden. Proteinisolierung und Western Blot Analyse sind im „Material und Methoden“-Teil beschrieben (2.2.6.3; 2.2.6.5). Die Kontrollproben aus  $cGKI^{+/+}$ ,  $cGKI^{+/+}$ ,  $cGKI^{-/-}$  Geweben wurden freundlicherweise von Sabine Brummer zur Verfügung gestellt.

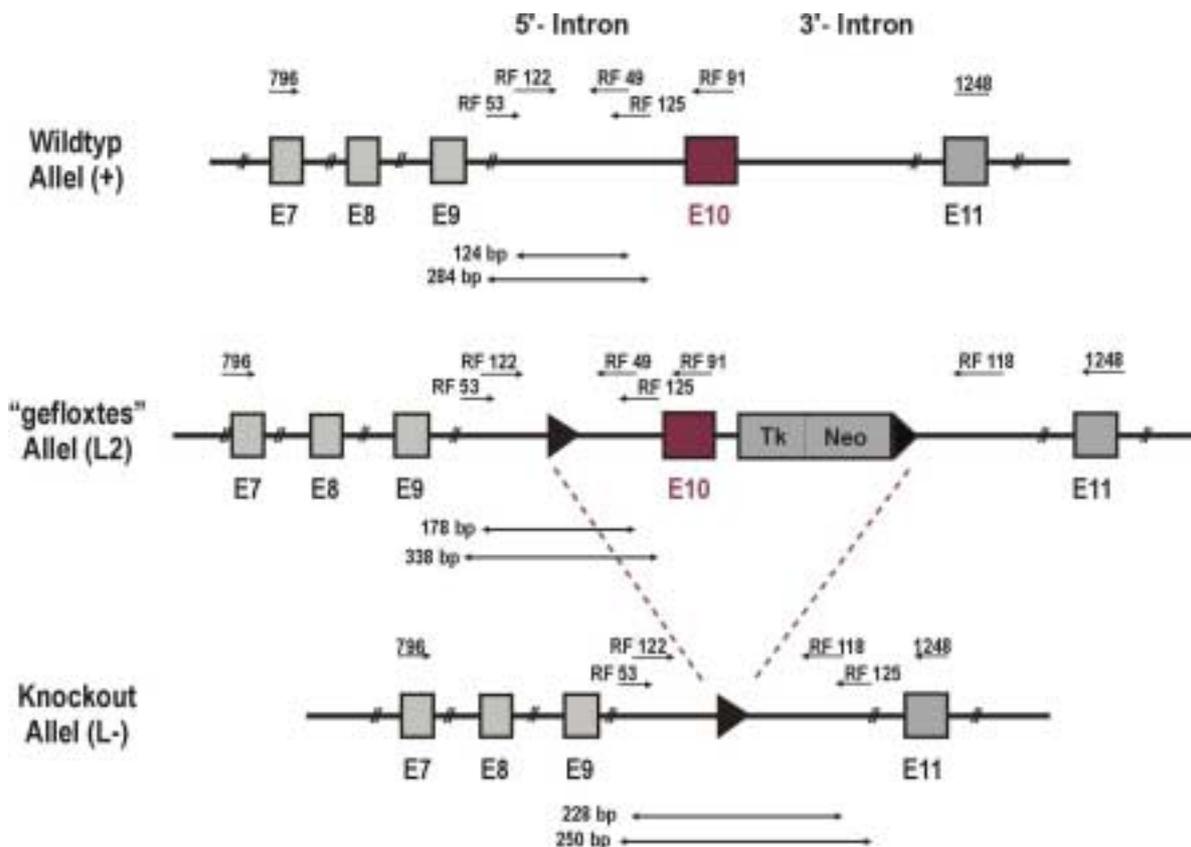
Zur Untersuchung der cGKI Expression auf zellulärer Ebene wurden Paraffinschnitte der Aorta und verschiedenen Regionen des Darmes mit einem polyklonalen Antikörper gegen die cGKI immungefärbt (2.2.7.4; 6.6). Spezifische und gleichmäßige rotbraune Färbung konnte in den vaskulären und viszeralen glatten Muskelzellen sowohl von Wildtyp, als auch von  $cGKI^{L2/L2}$  Mäusen beobachtet werden (**Abb. 3.5**). Glatte Muskelzellen wurden durch immunhistologische Färbung mit einem monoklonalen „smooth muscle- $\alpha$ -actin“-Antikörper nachgewiesen.

### 3.2 „*In vivo*-Generierung“ eines cGKI Nullallels durch Cre-vermittelte Exzision des L2 Allels

Um das Gen für die cGKI durch Cre-vermittelte Exzision in Keimzellen zu inaktivieren, wurden  $cGKI^{L2}$  Mäuse mit *CMV-Cre* Mäusen verkreuzt (vgl. 2.1.4). Da diese Mäuse die Cre Rekombinase unter Kontrolle des CMV Promotors in einem frühen Entwicklungsstadium bzw. in Keimzellen exprimieren, besteht die Möglichkeit, dass das rekombinierte Allel (L-) über die Keimbahn weitergegeben wird (Dupé et al., 1997). Durch die Verpaarung der  $cGKI^{L2}$  Mäuse mit *CMV-Cre* Mäusen sollte eine konventionelle cGKI-defiziente Mauslinie (Nullmutante) erzeugt werden (**Abb. 3.3**).

#### 3.2.1 Rekombinations- und Expressionsanalyse

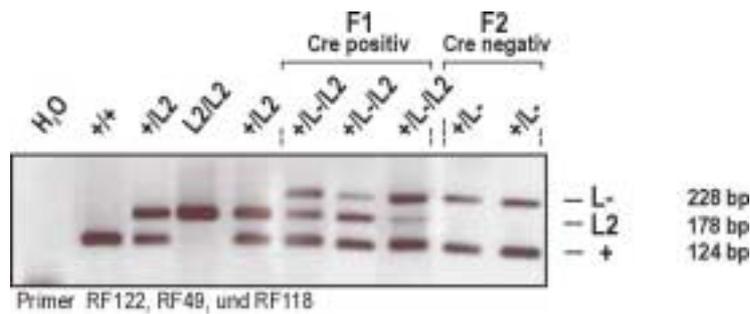
Die Exzision des „geflochten“ Exons 10 des cGKI Gens wurde durch PCR Analyse von Schwanz-DNS untersucht. Durch die Wahl der Primer konnten in einer PCR das cGKI Wildtyp, das L2 und das L- Allel nebeneinander nachgewiesen werden. Es wurden verschiedene Primerkombinationen getestet, von denen zwei Kombinationen besonders günstig waren (Oligonukleotide RF49, RF118 und RF122 bzw. RF53, RF118 und RF125). Die jeweiligen Banden konnten in der Agarose-Gelelektrophorese leicht getrennt werden und entstanden unter den verwendeten PCR-Bedingungen bei jeweils gleichen Mengen eingesetzter DNS in ungefähr gleichen Mengen. Die DNS-Fragmente wurden aus dem Gel isoliert (2.2.2) und ihre Sequenz analysiert (2.2.3). Die *loxP*-Segmente waren im L2 Allel an der richtigen Stelle in den Introns integriert und im L- Allel war das „geflochte“ Exon wie erwartet aus dem Genom herausgeschnitten worden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung der *in vivo*-Generierung cGKI-defizienter Mäuse

Dargestellt sind der cGKI Wildtyp Genort, der  $cGKI^{L2}$  Genort und der  $cGKI^{L-}$  Knockout Genort (Nullallel), welcher durch Cre-vermittelte Exzision des „gefloxten“ Exons 10 entsteht. Die Lage verschiedener Primer ist ebenfalls gezeigt.

In der DNS aller nach Verkreuzen der  $cGKI^{L2/L2}$  mit den *CMV-Cre* Mäusen (2.1.4) geborenen Tiere (F1-Generation) konnten erwartungsgemäß Wildtyp und L2 Allel detektiert werden, bei *CMV-Cre* transgenen Tieren gleichzeitig auch das L- Allel. Diese Mäuse hatten einen „Mosaik“ Genotyp ( $cGKI^{+/L2/L-}$ ) (Abb. 3.4). Nach Verkreuzen dieser „Mosaik“ Mäuse (F1-Generation) mit Wildtyp Mäusen (C57Bl/6) wurde durch Genotypisierung der Schwanz-DNS die Keimbahngängigkeit des L- Allels getestet. In einem Teil der Mäuse der folgenden Generation (F2) war zwar das L- Allel, aber weder das *CMV-Cre* noch das  $cGKI^{L2}$  Gen nachweisbar (Abb. 3.4). Dies bedeutete, dass das L- Allel über die Keimbahn weitergegeben wurde. Durch Verkreuzen von  $cGKI^{+/L-}$  Mäusen konnten  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen generiert werden.



### Abb. 3.4: PCR Genotypisierung der Mäuse aus der F1- und F2-Generation

Nachweis der drei verschiedenen Allele (+/L2/L-) durch PCR Analyse der Schwanz-DNS (2.2.1) unter Verwendung der Primer RF122, RF49 und RF118 (6.3; 6.4). Für den Nachweis des Cre Transgens wurden die Primer TK140 und TK142 verwendet (Daten nicht gezeigt). Weitere Erklärungen im Text.

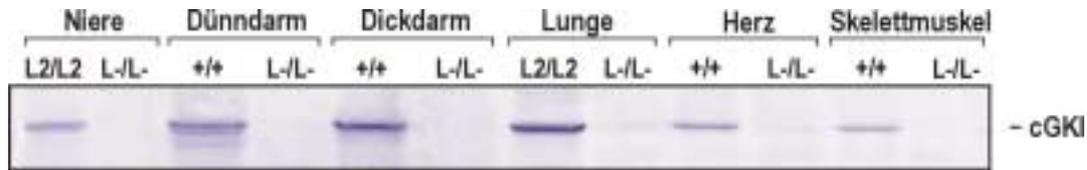
Die Expression der cGKI in  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen wurde zunächst durch RT-PCR analysiert (2.2.5.4). Mit der RNS aus Geweben von Wildtyp,  $cGKI^{L2/L2}$  und  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen wurde eine RT-PCR durchgeführt, wobei durch Verwendung spezifischer Primer (6.3; 6.4) die RNS des cGKI Wildtyp Allels und des L- Nullallels nachgewiesen werden konnte (vgl. **Abb. 3.2 A**). Mit den Primerpaaren 796 und RF91 bzw. 796 und 1248 war in allen untersuchten Geweben von Wildtyp und  $cGKI^{L2}$  Tieren die cGKI Wildtyp-RNS (~250 bp bzw. 472 bp) detektierbar, während sie in keiner der RNS-Proben aus verschiedenen Organen von  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen nachweisbar war. Ähnlich wie in  $cGKI^{-/-}$  Mäusen wurden in RNS-Proben aus  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen mit den Primern 796 und 1248 sehr geringe Mengen eines verkürzten cDNS-Amplifikats (~375 bp) gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzanalyse bestätigte, dass in  $cGKI^{-/-}$  und  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen das Exon 9 direkt auf Exon 11 „gespliced“ wurde.

Mittels Western Blot Analyse (2.2.6.5) und immunhistologischer Färbungen (2.2.7.4) konnte in Geweben von  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen kein intaktes cGKI Protein detektiert werden (**Abb. 3.5**).

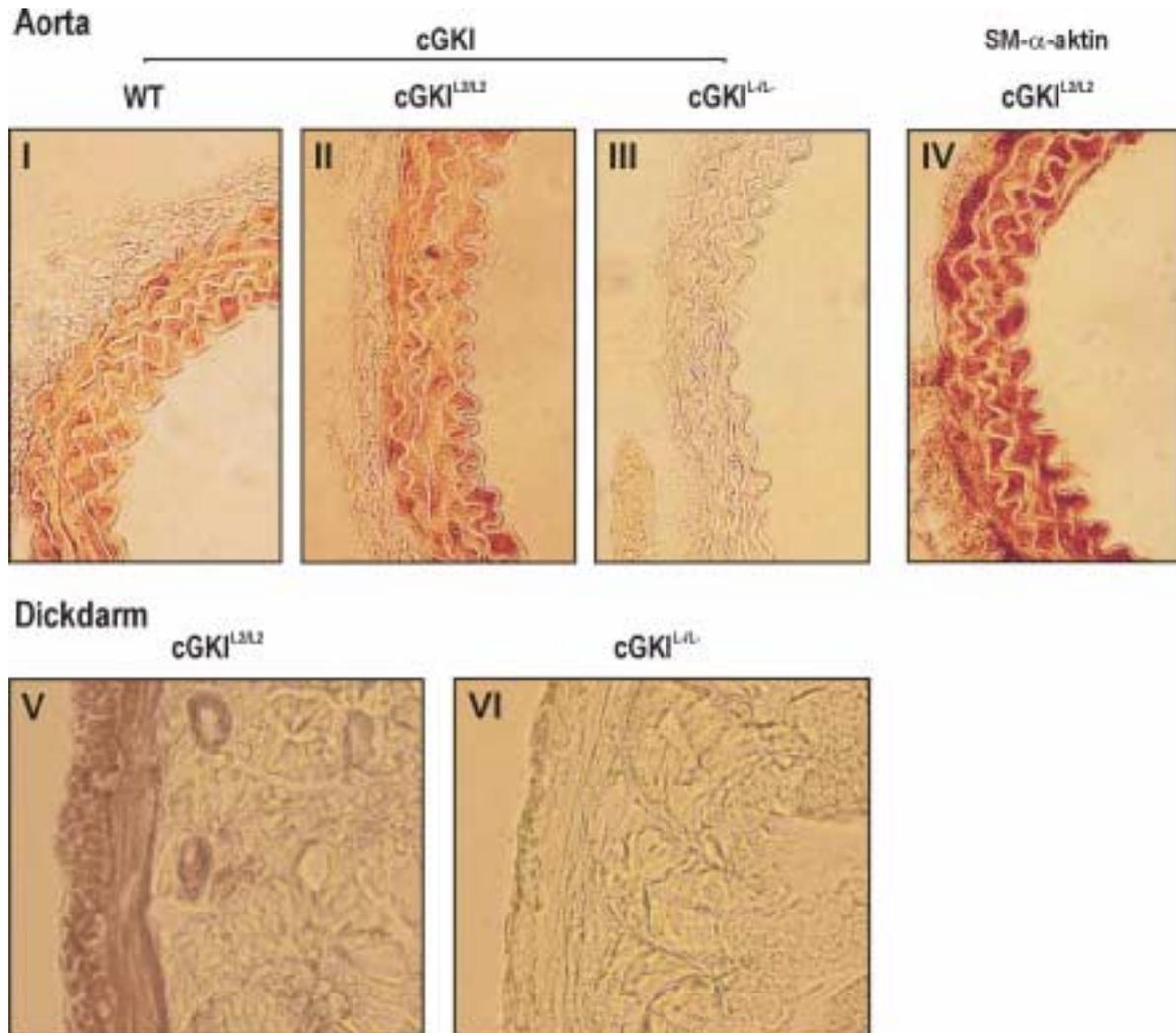
### 3.2.2 Funktionelle Analyse

Schon im Alter von ein bis zwei Wochen fielen die  $cGKI^{L-/L-}$  Mäuse durch ein signifikant geringeres Körpergewicht auf. Ihre Lebenserwartung betrug ungefähr 3 bis 6 Wochen. Die Autopsie zeigte, dass der Blinddarm, aber auch andere Bereiche des Darmes stark vergrößert und aufgebläht waren, während Pylorus und Ileozökalklappe oft stark verengt schienen (Daten nicht gezeigt). Der Phänotyp der  $cGKI^{L-/L-}$  Tiere ist dem zweier anderer cGKI-defizienter Mauslinien (Pfeifer et al., 1998; Wegener et al., 2002) sehr ähnlich.

### A Western Blot Analyse



### B Immunhistologische Färbung

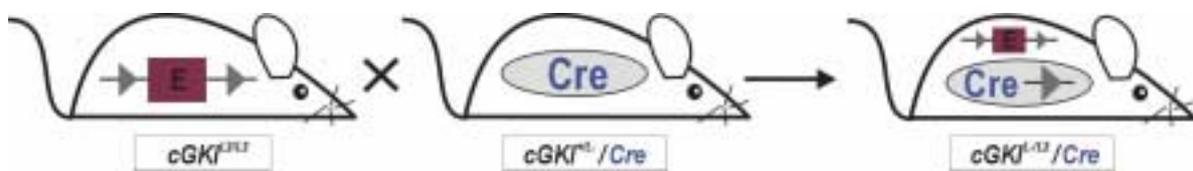


### Abb. 3.5: Expression des cGKI Proteins in $cGKI^{L-/L-}$ Mäusen

(A) Western Blot Analyse von Proteinen aus verschiedenen Geweben von Wildtyp (+/+),  $cGKI^{L2/L2}$  und  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen. (B) Nachweis der cGKI auf Gewebeschnitten der Aorta (I-IV) bzw. des Dickdarms (V,VI) von Wildtyp (I) und  $cGKI^{L2/L2}$  (II,V) Mäusen. Keine Farbreaktion auf Gewebeschnitten von  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen (III,VI). Glatte Muskelzellen wurden mit einem Antikörper gegen „smooth muscle- $\alpha$ -actin“ (SM- $\alpha$ -aktin) nachgewiesen (IV). Verwendete Antikörper: vgl. 6.5; 6.6; 6.7. Originalvergrößerung der Schnitte: Aorta 400x; Dickdarm 200x.

### 3.3 Gewebe-spezifische cGKI-defiziente Mäuse

Die Gewebe-spezifische Inaktivierung des cGKI Gens basiert auf der Exzision des *loxP*-flankierten Exons 10 in Cre-exprimierenden Zellen. Dazu wurden „gefloxt“ cGKI ( $cGKI^{L2}$ ) Mäuse mit verschiedenen Cre Mauslinien (6.2), in welchen die Cre Rekombinase unter Kontrolle eines speziellen Promotors Zelltyp-spezifisch exprimiert wird, verkreuzt. Dadurch sollte es möglich sein, Mäuse zu züchten, die in den Geweben, die Cre Aktivität zeigen, eine verminderte cGKI Expression aufweisen, und in den übrigen Geweben das cGKI Protein in normalen Mengen bilden (**Abb. 3.6**).



**Abb. 3.6: Gewebe-spezifische Mutagenese des cGKI Gens in der Maus**

Gewebe-spezifische Inaktivierung des cGKI Gens durch Exzision des *loxP*-flankierten (Dreieck) Exons 10 (E; rotes Rechteck) in allen Cre-exprimierende Zellen (graues Oval).

Die im Folgenden beschriebenen konditionalen Knockout- und Kontrollmäuse stammten jeweils aus den gleichen Würfen („litter-matched“) und wurden nach dem gleichen Verkreuzungsschema generiert (2.1.5). Die konditionalen cGKI-defizienten Tiere zeigten keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen (verminderte Lebensfähigkeit, verändertes Wachstum, auffälliges Verhalten oder gestörte Bewegungsabläufe) im Vergleich zu Kontrollmäusen. Alle Untersuchungen wurden mit Tieren mit gemischtem genetischen Hintergrund (129/Sv / C57Bl/6) durchgeführt.

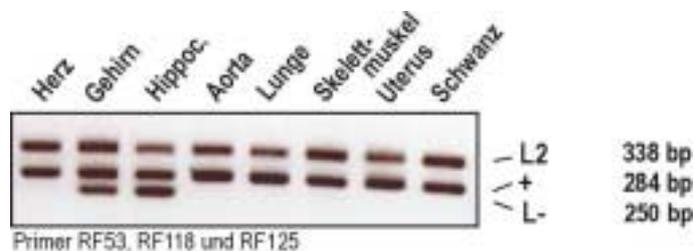
#### 3.3.1 Hippocampus-spezifische cGKI-defiziente Mäuse

Die zur Hippocampus-spezifischen Deletion des  $cGKI^{L2}$  Gens verwendeten *NEX-Cre* Mäuse stammten aus der Arbeitsgruppe von Klaus-Armin Nave (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen). Die *NEX-Cre* („Knockin“) Mauslinie exprimiert die Cre Rekombinase unter Kontrolle des endogenen NEX Promotors hauptsächlich in der CA1-CA3 Region des Hippocampus und weniger stark im Gyrus dentatus (Schwab et al., 2000). Für den Nachweis des NEX Wildtyp Allels

(+) und des NEX Knockin Allels (-) mittels PCR (2.2.1.3) wurden die Primer RF112, RF113 und RF114 (6.3; 6.4) verwendet.

### 3.3.1.1 Rekombinations- und Expressionsanalyse

Die PCR Analyse der DNS aus verschiedenen Geweben von männlichen und weiblichen  $cGKI^{+/L2}/NEX-Cre$  Mäusen im Alter von zehn Wochen ergab, dass Rekombination, d.h. Exzision des „geflochten“ cGKI Gens durch die Cre Rekombinase, in Zellen des Gehirns, vor allem im Hippocampus, stattgefunden hatte. In den übrigen untersuchten Organen (z.B. Herz, Aorta, Lunge, Uterus) wurde keine Rekombination detektiert (**Abb. 3.7**).



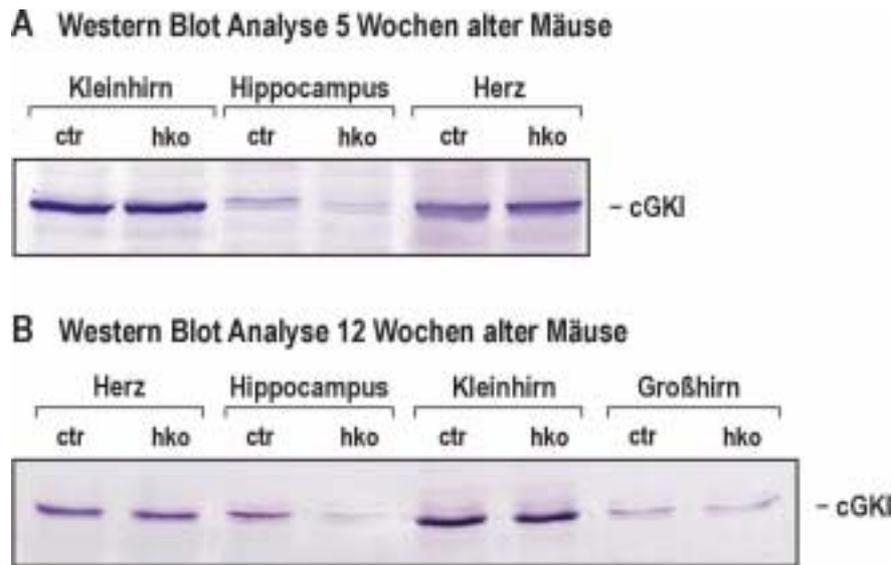
#### Abb. 3.7: PCR Analyse Hippocampus-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse

Nachweis des  $cGKI^{-}$  Allels im Gehirn und Hippocampus von  $cGKI^{+/L2}/NEX-Cre$  Mäusen durch PCR Analyse (2.2.1.3) der DNS (2.2.1.1). Verwendete Primer: RF53, RF118 und RF125.

Die Expression der cGKI in Geweben aus Kontrolltieren (ctr;  $cGKI^{+/L2}/NEX-Cre$ ) und Hippocampus-spezifischen Knockout Mäusen ( $cGKI^{hko}$ ;  $cGKI^{L-/L2}/NEX-Cre$ ) wurde mittels Western Blot, *in situ*-Hybridisierung und Immunhistologie analysiert.

In den Proteinproben aus den Hippocampi vier und zwölf Wochen alter  $cGKI^{hko}$  war die Menge an cGKI Protein gegenüber Kontrollmäusen stark vermindert (**Abb. 3.8**). In allen übrigen getesteten Geweben inklusive dem Cerebellum der cGKI Mutanten war die cGKI Expression normal (Daten zum Teil nicht gezeigt). In Extrakten der hippocampalen Region von  $cGKI^{hko}$  Mäusen war noch eine schwache cGKI Bande sichtbar, was darauf hinwies, dass in wenigen Zellen des Hippocampus noch cGKI Protein gebildet wurde. Des Weiteren könnte die restliche cGKI in den Mutanten auch von cerebralen Blutgefäßen stammen (siehe unten).

Durch *in situ*-Hybridisierung von Gehirnschnitten wurde gezeigt, dass in den Neuronen der CA1-CA3 Region des Hippocampus der  $cGKI^{hko}$  Mäuse keine cGKI Wildtyp-mRNS mehr zu finden war (**Abb. 3.9 A**). Im Unterschied dazu war sie im Gyrus dentatus noch deutlich nachweisbar. Allerdings schien sie dort in geringeren



**Abb. 3.8: Western Blot Analyse der Hippocampus-spezifischen cGKI-defizienten Mäuse**

Aufgetragen wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aus verschiedenen Organen von **(A)** 5 Wochen alten und **(B)** 12 Wochen alten Kontrolltieren (ctr;  $cGKI^{+/L2}/NEX-Cre$ ) und  $cGKI^{hko}$  Mäusen ( $cGKI^{L-L2}/NEX-Cre$ ). Die Proteinisolierung und Durchführung der Western Blot Analyse sind in 2.2.6 und 2.2.6.5 beschrieben, die verwendeten Antikörper sind in 6.5 und 6.7 aufgeführt. Nähere Erläuterungen im Text.

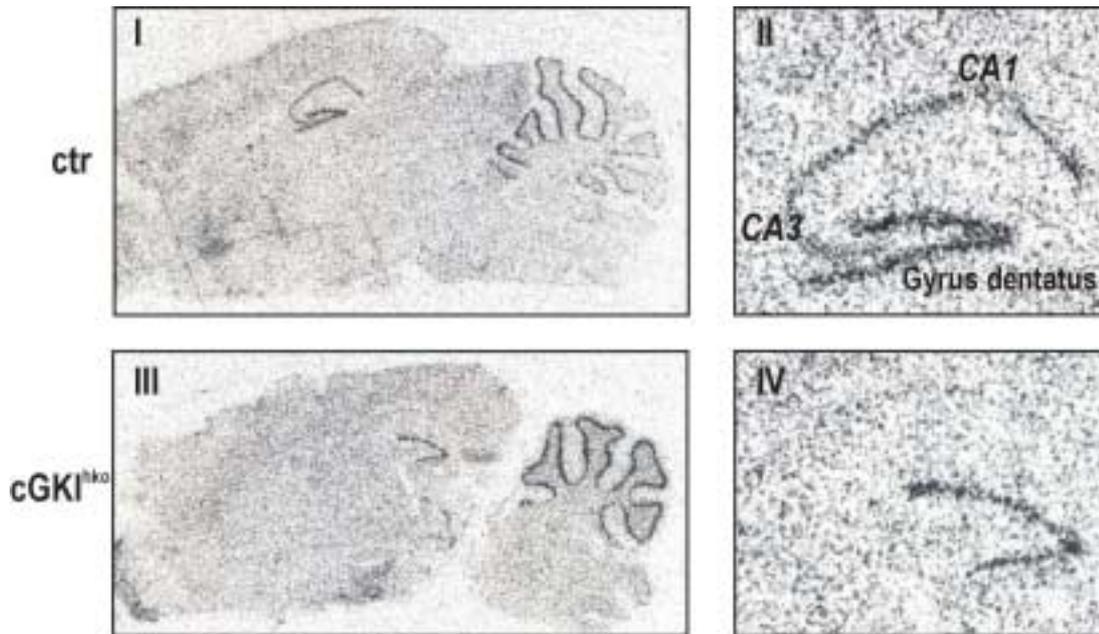
Mengen vorhanden zu sein als im Gyrus dentatus der Kontrollmäuse. Im Cerebellum der  $cGKI$  Mutanten war die  $cGKI$ -mRNS nicht reduziert.

Die Intensität der immunhistologischen  $cGKI$  Färbung (**Abb. 3.9 B**) war in Hippocampi von Wildtyp (Daten nicht gezeigt) als auch in Kontrollmäusen sehr schwach, was darauf hindeutet, dass das  $cGKI$  Protein im Hippocampus nur relativ gering exprimiert wird. Außerdem schien die  $cGKI$  auch in den stark verzweigten Dendritenbäumen der Neuronen vorzukommen, wodurch die Immunfärbung „verschwommen“ wirkte. Die  $cGKI$  Expression war im Hippocampus, aber nicht im Cerebellum von  $cGKI^{hko}$  Mäusen deutlich reduziert, womit die Ergebnisse der Western Blot Analyse (**Abb. 3.8**) und der *in situ*-Hybridisierung (**Abb. 3.9 A**) bestätigt wurden. In allen immungefärbten Gehirnen mit Ausnahme der Negativkontrollen ( $cGKI^{-/-}$ ;  $cGKI^{L-L2}$ ) wurde in Blutgefäßen und in Purkinje Zellen des Kleinhirns  $cGKI$  Protein nachgewiesen (Daten z.T. nicht gezeigt).

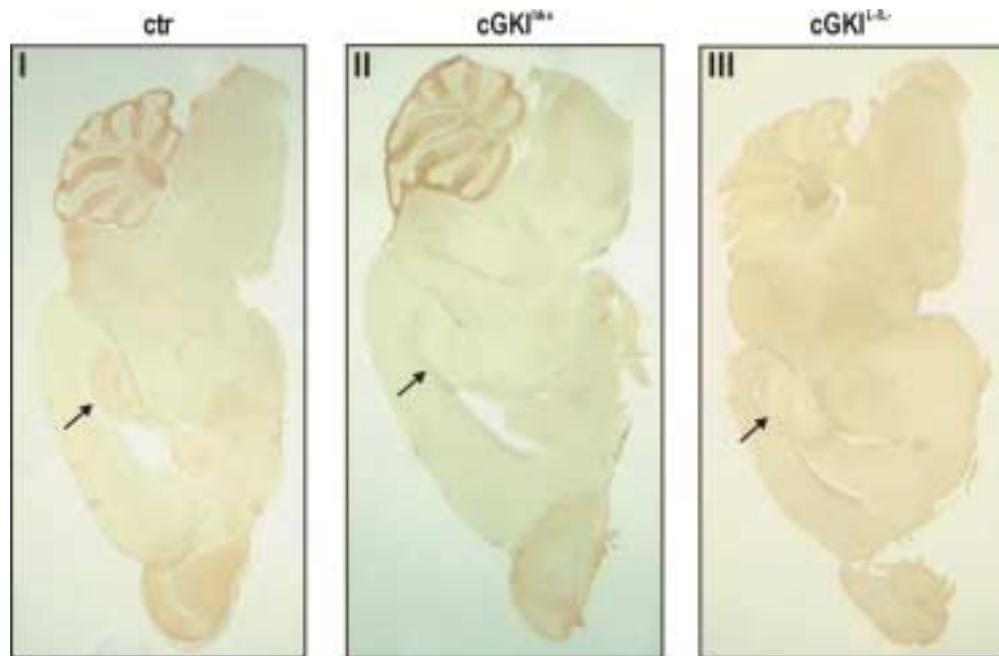
### 3.3.1.2 Funktionelle Analyse

In jungen (5 Wochen alten)  $cGKI^{hko}$  Mäusen konnte kein Defekt der LTP gefunden werden (**Abb. 3.10 A**), wodurch frühere Ergebnisse mit  $cGKI^{-/-}$  Mäusen (Kleppisch et al., 1999) bestätigt werden konnten. Interessanterweise wurde in erwachsenen

### A *In situ*-Hybridisierung



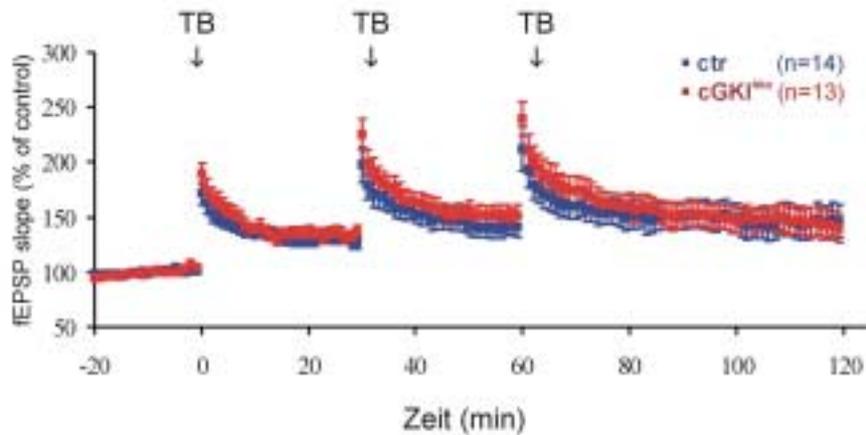
### B Immunhistologische Färbung



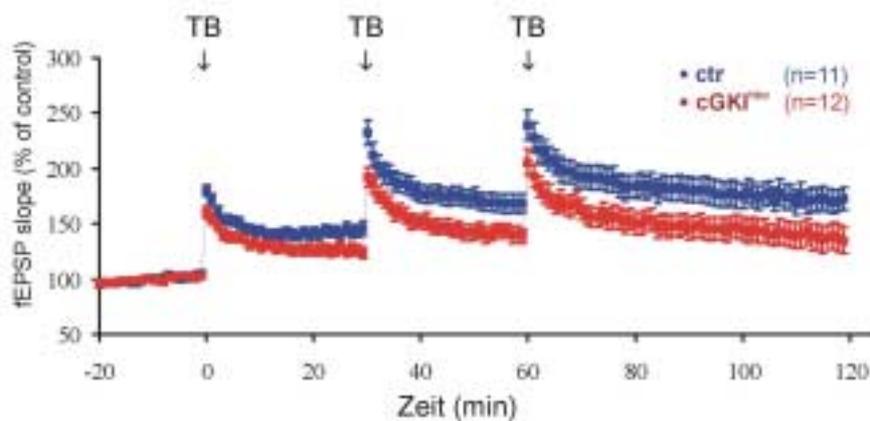
**Abb. 3.9: *In situ*-Hybridisierung und immunhistologische Färbung der Gehirne Hippocampus-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse**

(A) Nachweis der cGKI Wildtyp-mRNS durch *in situ*-Hybridisierung (2.2.7.1) von Gefrierschnitten des Gehirns von Kontrolltieren (ctr;  $cGKI^{+/L2}/NEX-Cre$ ) und  $cGKI^{hko}$  ( $cGKI^{L-/L2}/NEX-Cre$ ) Mäusen (Alter: 35 Wochen). In der CA1-CA3 Region des Hippocampus der  $cGKI^{hko}$  Maus konnte keine cGKI Wildtyp-mRNS detektiert werden (IV). (B) Immunhistologischer Nachweis des cGKI Proteins in Gehirnschnitten von Kontrolltieren (ctr; I),  $cGKI^{hko}$  Mäusen (II) (Alter: 10 Wochen) und  $cGKI^{L-/L-}$  Mäusen (III; Negativkontrolle; Alter: 4 Wochen). Der Pfeil markiert die hippocampale Region. Originalvergrößerung 25x.

### A LTP-Messungen 5 Wochen alter Mäuse



### B LTP-Messungen 12 Wochen alter Mäuse



#### Abb. 3.10: Messung der Langzeitpotenzierung in Hippocampus-spezifischen cGKI-defizienten Mäusen

Zur Messung der LTP im Hippocampus wurden die Neurone der CA3 Region dreimal im Abstand von 30 min durch einen „Thetaburst“ (TB) gereizt. Exzitatorische postsynaptische Potentiale wurden durch extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen (fEPSP) erfasst. **(A)** Die Induktion der LTP war in jungen (5 Wochen alten) cGKI<sup>hko</sup> Mäusen normal. **(B)** Die nach Stimulation auftretende LTP war in erwachsenen (12 Wochen alten) cGKI<sup>hko</sup> Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen (ctr) vermindert.

(12 Wochen alten) cGKI<sup>hko</sup> Mäusen eine verminderte LTP festgestellt (**Abb. 3.10 B**), was auf eine altersabhängige Funktion der cGKI hinweist. Die LTP-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Kleppisch und Rüdiger Allmann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München) durchgeführt. Das motorische bzw. räumliche Lernen der Tiere im „Rotarod“ Test und im modifizierten „Morris water maze“ Test war normal (Dr. Susanne Feil, persönliche Mitteilung).

### 3.3.2 Purkinje Zell-spezifische cGKI-defiziente Mäuse

Um das cGKI Gen spezifisch in den Purkinje Zellen des Kleinhirns zu zerstören, wurde das „gefloخته“ cGKI L2 Allel in die *L7-Cre* Mauslinie (vgl. 2.1.2; 6.2) eingekreuzt (vgl. 2.1.5), die uns freundlicherweise von Dr. Jaroslaw J. Barski und Dr. Michael Meyer (MPI für Neurobiologie, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. Transgene *L7-Cre* Mäuse exprimieren die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des *L7/pcp-2* Promotors (Oberdick et al., 1990). Nach Verpaarung dieser Mäuse mit zwei verschiedenen *LacZ-Cre-Reporter*mauslinien (Akagi et al., 1997; Soriano et al., 1999) konnte durch  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung gezeigt werden, dass Rekombination hauptsächlich in Purkinje Zellen, in sehr geringen Mengen auch in retinalen bipolaren Neuronen und in anderen Bereichen des Zentralnervensystems stattfand (Barski et al., 2000; Dr. Susanne Feil, unveröffentlichte Daten).

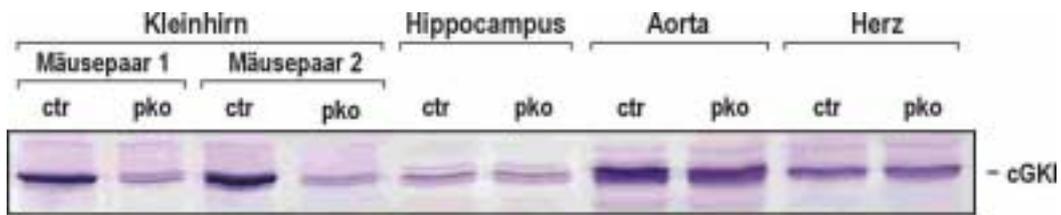
#### 3.3.2.1 Rekombinations- und Expressionsanalyse

Die Rekombination wurde durch Untersuchung der DNS aus verschiedenen Geweben von *cGKI<sup>+L2</sup>/L7-Cre* Mäusen (Alter: 4-5 Wochen) mittels PCR (2.2.1.3) analysiert. Interessanterweise wurde in der DNS aus dem Kleinhirn nur eine relativ geringe Menge des rekombinierten Allels (L-) detektiert (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigte sich im Western Blot (**Abb. 3.11 A**) eine starke Reduktion der cGKI Expression im Kleinhirn der Purkinje Zell-spezifischen cGKI Knockout (*cGKI<sup>pk0</sup>*) Mäuse verglichen mit Kontrolltieren (ctr). In den übrigen Geweben der *cGKI<sup>pk0</sup>* Mäuse war die cGKI Expression gegenüber den Kontrollen nicht vermindert. Auf zellulärer Ebene ließ sich durch immunhistologische Färbungen (**Abb. 3.11 B**) nachweisen, dass nur noch in weniger als 10% der Purkinje Zellen des Kleinhirns 12 Wochen alter *cGKI<sup>pk0</sup>* Mäuse cGKI Protein gebildet wurde, während die cGKI in über 90% der Purkinje Zellen der Kontrollmäuse nachweisbar war. In den glatten Muskelzellen von Gefäßen im Gehirn der *cGKI<sup>pk0</sup>* Mäuse wurde die cGKI normal exprimiert.

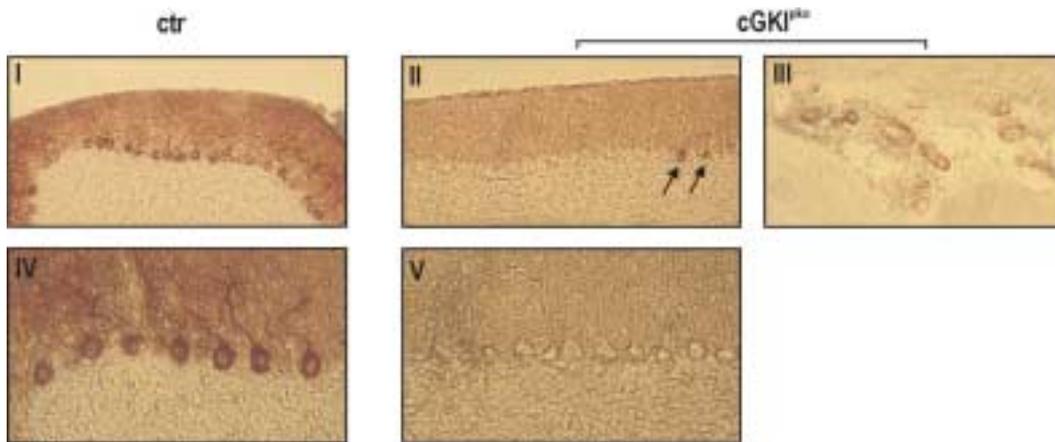
#### 3.3.2.2 Funktionelle Analyse

Anatomie und Morphologie des Kleinhirns wurden durch die Deletion des cGKI Gens in den Purkinje Zellen nicht beeinflusst (Prof. Dr. K. Schilling, Anatomisches Institut, Anatomie und Zellbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; Daten nicht gezeigt). Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben einen Verlust der Induktion von LTD in den Purkinje Zellen der *cGKI<sup>pk0</sup>* Mäuse (**Abb. 3.12**). Die LTD-Messungen wurden von Dr. Jana Hartmann (Physiologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München) durchgeführt.

### A Western Blot Analyse

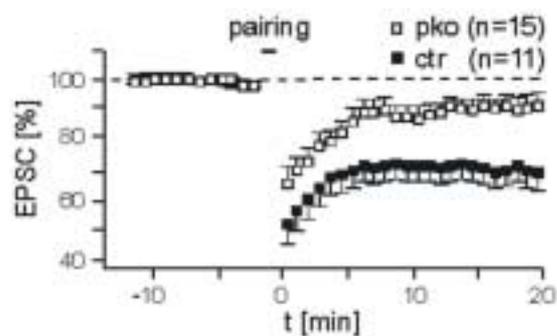


### B Immunhistologische Färbung



### Abb. 3.11: Expressionsanalyse Purkinje Zell-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse

(A) Nachweis des cGKI Proteins durch Western Blot Analyse (2.2.6.5). Reduktion der cGKI in Kleinhirnextrakten verschiedener cGKI<sup>pko</sup> (pko; *cGKI<sup>L/L2</sup>/L7-Cre*) Tiere (Alter: 20 Wochen). Normale cGKI Expression in Hippocampus, Aorta und Herz. (B) Immunhistologische Färbung (2.2.7.4) der Gehirnschnitte von Kontrollmäusen (ctr; *cGKI<sup>L/L2</sup>/L7-Cre*) und cGKI<sup>pko</sup> Mäusen. (II,V) Im Kleinhirn der cGKI<sup>pko</sup> Mäuse ist das cGKI Protein nur in wenigen Purkinje Zellen nachweisbar (Pfeile). Detektion der cGKI in Gehirngefäßen von cGKI<sup>pko</sup> Mäusen (III). Originalvergrößerungen: I,II,III 200x; IV,V 400x. Nähere Erläuterungen im Text.

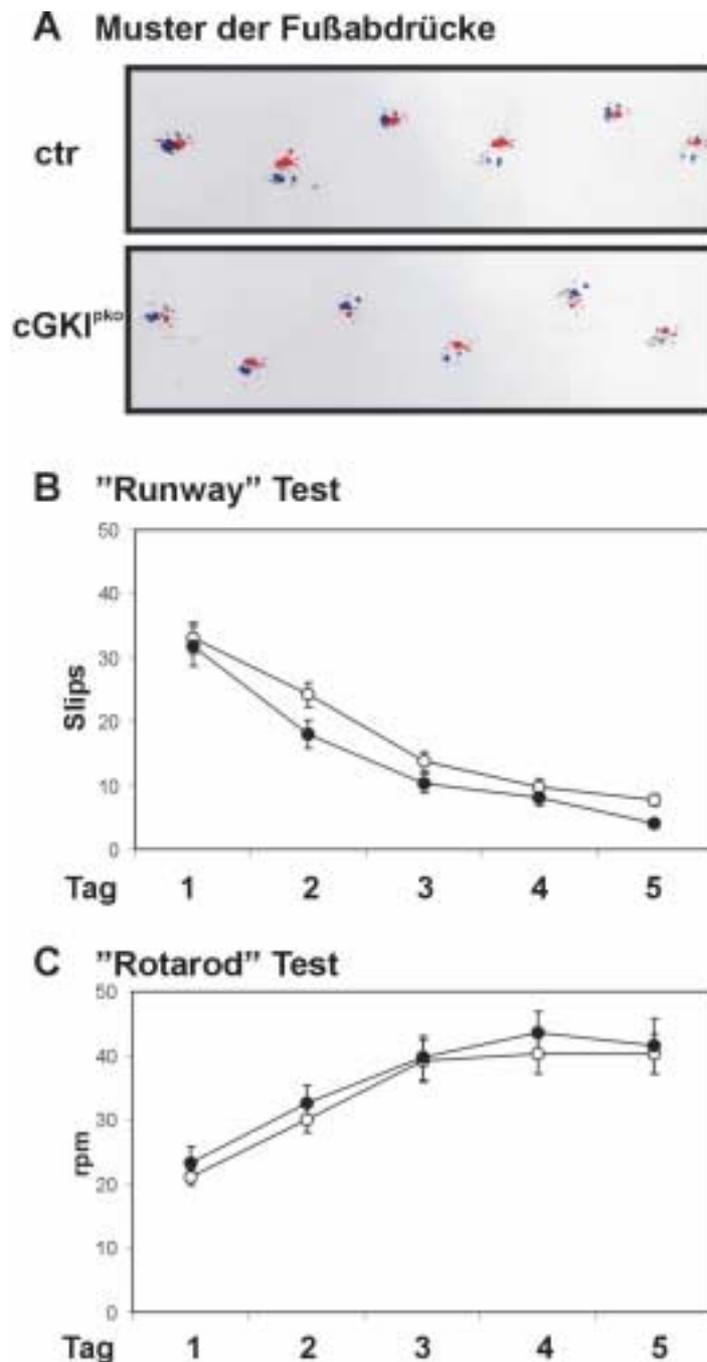


### Abb. 3.12: Langzeitdepression in Purkinje Zell-spezifischen cGKI-defizienten Mäusen

Der exzitatorische postsynaptische Strom (EPSC) vor Stimulation der Purkinje Zellen wurde gleich 100% gesetzt. In cGKI<sup>pko</sup> Mäusen (pko) (hohle Quader) war 20 min nach der Reizung („pairing“) kaum LTD im Vergleich zu Kontrolltieren (ctr) (gefüllte Quader) feststellbar.

Eine standardisierte Methode zur Abschätzung verschiedener Verhaltensparameter ist die Untersuchung der spontanen Aktivität im offenen Feld („Open field Test“). Durch ein mit Infrarotlicht und Photozellen ausgerüstetes System wurden die horizontalen und vertikalen Bewegungen der Tiere auf einer 40 cm x 40 cm großen Fläche beobachtet und anschließend ausgewertet. Sowohl die Kontrolltiere als auch die cGKI<sup>pk0</sup> Mäuse verhielten sich unauffällig, zeigten spontane Aktivität und normale motorische Funktionen (Dr. J. Barski; Daten nicht gezeigt). Ein relativ einfacher Test auf veränderte, ataktische Bewegungsabläufe ist der Vergleich der Muster der Fußabdrücke („footprints“) von Tieren der verschiedenen Genotypen (Carter et al., 1999). Wie die Fußspuren von je zwei Kontroll- (ctr) und cGKI<sup>pk0</sup> Mäusen (Alter: 29 Wochen) beweisen, waren die Tiere beider Genotypen in der Lage, die Strecke auf geradem Weg mit gleichmäßigen Schritten zurückzulegen (**Abb. 3.13 A**). In der Schrittlänge und –breite (Abstand zwischen den Vorder- bzw. Hinterpfoten) unterschieden sich die Mäuse nicht. Vorder- und Hinterpfoten wurden meistens an der selben Stelle aufgesetzt („Forepaw / hindpaw overlap“). Eine Möglichkeit, die motorische Lernfähigkeit zu untersuchen, ist der „Runway“ oder „Beam walking“ Test, bei welchem die Mäuse einen 110 cm langen und 1 cm breiten Stab mit 10 niedrigen Hindernissen überqueren müssen. Die Anzahl der Ausrutscher („slips“) pro Seite wurde von beiden Seiten der Stange von je einer Person erfasst und die Tiere beider Genotypen miteinander verglichen. Zu Beginn der Versuchsreihe hatten alle Versuchstiere deutliche Probleme, den Stab zu passieren. Nach 5 Tagen Training bewältigten sie diese Aufgabe wesentlich besser und liefen schneller mit flüssigeren Bewegungen über das Hindernis. An keinem der 5 Versuchstage konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den cGKI<sup>pk0</sup> Mäusen und den Kontrolltieren festgestellt werden (**Abb. 3.13 B**). Ein weiteres Experiment zur Analyse des motorischen Lernens ist der „Rotarod“ Test auf motorische Koordination und Balance (vgl. Carter et al., 1999). Die untersuchten Kontroll- und cGKI<sup>pk0</sup> Mäuse zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied im „accelerating rotarod“ -Test (Dr. Susanne Feil; **Abb. 3.13 C**).

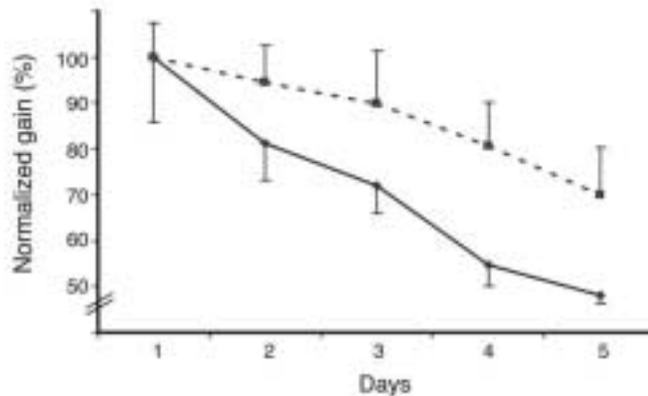
Durch Untersuchung der Adaptation des Vestibulo-Okular-Reflexes (VOR) während eines „Visuo-Vestibular-Trainings“ kann festgestellt werden, ob das cerebelläre Lernen von Bewegungsabläufen beeinträchtigt ist (de Zeeuw et al., 1998). Vor dem Training waren sowohl in den Kontrollmäusen als auch in den cGKI<sup>pk0</sup> Tieren die durchschnittliche Stärke („amplitude“) der Augenbewegungen und die zeitliche Verschiebung („timing“; „phase“ und „latency“) der kompensatorischen Augenbewegungen während des Vestibulo-Okular-Reflexes und des optokinetischen Reflexes (OKR) normal (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.13: Analyse der Motorik der Purkinje Zell-spezifischen cGKI-defizienten Mäuse**

(A) Vergleich der Muster der Fußabdrücke von Kontrolltieren (ctr) und cGKI<sup>pk0</sup> Mäusen (Vorderpfoten: rot; Hinterpfoten: blau). Untersuchung der motorischen Lernfähigkeit der Kontrolltiere (gefüllte Kreise) und cGKI<sup>pk0</sup> Mäuse (hohle Kreise) anhand (B) des „Runway“ bzw. (C) des „Rotarod“ Tests an jeweils 5 Trainingstagen. Vergleich der Anzahl der „slips“ pro Lauf (B) bzw. der maximal erreichten Geschwindigkeit des rotierenden Stabes (rpm) (C). Zwischen den beiden Genotypen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Durch Training konnte in den Kontrollmäusen eine Verbesserung der Augenbewegungen des VOR erzielt werden, während sich in Purkinje Zell-spezifischen cGKI-defizienten Mäusen die Adaptation des VOR nach Training weniger stark verbesserte (**Abb. 3.14**). Die Versuche wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. C. de Zeeuw (Department of Neuroscience, Erasmus University Rotterdam) durchgeführt.



**Abb. 3.14: Analyse der Adaptation des Vestibulo-Okular-Reflexes in Purkinje Zell-spezifischen cGKI-defizienten Mäusen**

Verbesserung der Augenbewegung des VOR („gain“) während eines 5-tägigen Trainings der Kontrollmäuse (durchgezogene Linie) und cGKI<sup>pk0</sup> Mäuse (gestrichelte Linie). Die Stärke der Augenbewegungen zu Versuchsbeginn (Tag 1) wurden normalisiert (gleich 100% gesetzt).

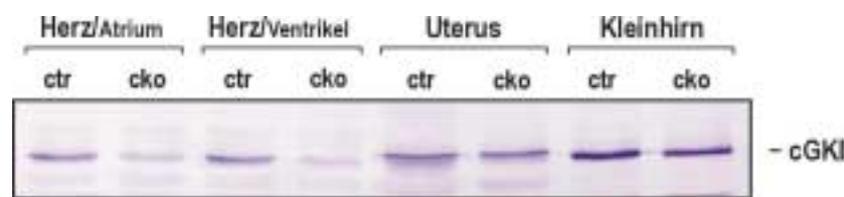
### 3.3.3 Herzmuskel-spezifische cGKI-defiziente Mäuse

Zur Deletion des cGKI Gens in Herzmuskelzellen wurde die *MLC2a-Cre* Mauslinie verwendet, die von der Arbeitsgruppe um Kenneth R. Chien (University of California; La Jolla, USA) generiert wurde. Diese Mauslinie exprimiert die Cre Rekombinase unter Kontrolle des „atrial myosin light chain“ Promotors und ermöglicht ein effizientes Herausschneiden „gefloxter“ Exons in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten (J. Chien, K. R. Chien, unveröffentlichte Daten).

#### 3.3.3.1 Rekombinations- und Expressionsanalyse

Sowohl die nach Verkreuzen mit Reportermauslinien erhaltenen X-Gal-Färbungen (Dr. Susanne Feil) als auch die PCR Analyse der DNS verschiedener Gewebe aus cGKI<sup>+L2</sup>/*MLC2a-Cre* Mäusen zeigte, dass Rekombination in hohem Ausmaß im

Herzen und in geringen Mengen auch in anderen Geweben stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Die Western Blot Analyse der Proteine aus Kleinhirn, Uterus und Atrium und Ventrikel des Herzens Herzmuskel-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse (cGKI<sup>cko</sup>; c= „cardiomyocyte“) und Kontrollmäusen (ctr) zeigte, dass die Menge an cGKI Protein im Herzen der cGKI<sup>cko</sup> Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren stark reduziert war (**Abb. 3.15**). Es ist möglich, dass die geringen Mengen an cGKI, die in Extrakten des Herzgewebes von cGKI<sup>cko</sup> Mäusen noch detektiert wurden, aus dem Gefäßsystem des Herzens oder aus Thrombozyten stammten. In den übrigen untersuchten Geweben von cGKI<sup>cko</sup> Mäusen wurde die cGKI normal exprimiert.



**Abb. 3.15: Western Blot Analyse Herzmuskel-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse**

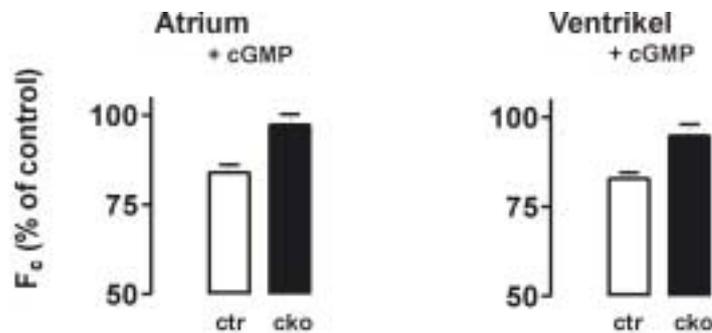
Nachweis der cGKI Expression in verschiedenen Geweben von Kontrollmäusen (ctr; cGKI<sup>+L2/MLC2a-Cre</sup>) und cGKI<sup>cko</sup> (cko; cGKI<sup>-L2/MLC2a-Cre</sup>) Mäusen (Alter: 10 Wochen) durch Western Blot Analyse (2.2.6.5). Aufgetragene Mengen Protein/Bahn: 50µg (2.2.6). Die verwendeten Antikörper sind in 6.5 und 6.7 aufgeführt.

Eine immunhistologische Färbung der Kardiomyozyten von cGKI<sup>cko</sup> Mäusen wurde nicht vorgenommen, da bei der Färbung von Herzen aus konventionellen cGKI Knockout Mäusen (cGKI<sup>-/-</sup> und cGKI<sup>-L2/-L2</sup>) eine Farbreaktion im Herzmuskelgewebe schon nach alleiniger Zugabe der Färbelösungen (DAB, Vector Blue/Red, 2.2.7.4) eintrat. Auch das Blockieren der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid, bzw. der endogenen alkalischen Phosphatase mit Levamisol (Vector) verminderte diese unspezifische Färbung nicht wesentlich.

### 3.3.3.2 Funktionelle Analyse

Mit Hilfe von konventionellen und konditional cGKI-defizienten Mäusen wurde untersucht, ob der negativ inotrope Effekt von cGMP durch die cGKI in Kardiomyozyten vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in jungen (4 Wochen alten) konventionellen cGKI<sup>-/-</sup> Mäusen als auch in erwachsenen (18 bis 28 Wochen alten) cGKI<sup>cko</sup> Mäusen die Aktivierung der cGKI an der Regulation der myokardialen Kontraktilität durch cGMP beteiligt ist. Ein Teil dieser Ergebnisse ist in **Abb. 3.16** dargestellt. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J.

Wegener (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München) durchgeführt.



**Abb. 3.16: Analyse der Kontraktionskraft des Herzens der Herzmuskel-spezifischer cGKI-defizienter Mäuse**

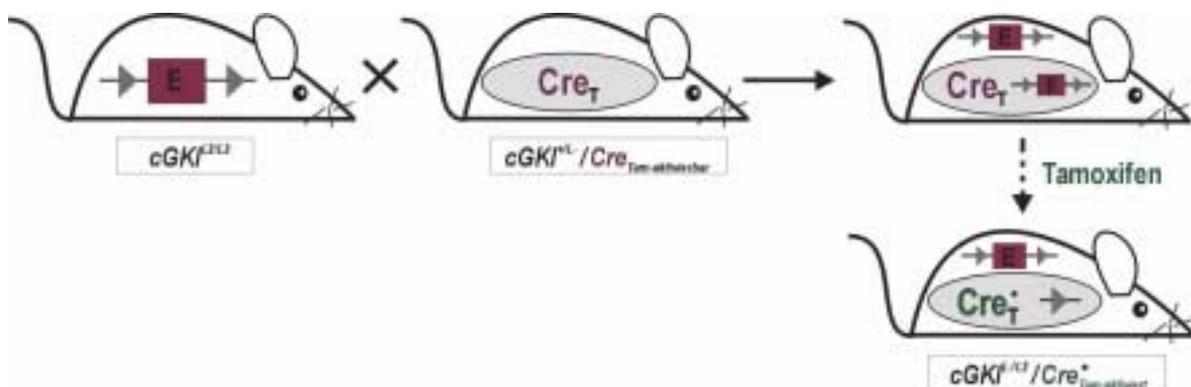
Einfluss von cGMP auf die Kontraktionskraft ( $F_c$ ) von Herzmuskelstreifen aus Atrium und Ventrikel von Kontrolltieren (ctr) und cGKI<sup>cko</sup> Mäusen (cko). Kontraktionskraft ohne cGMP Behandlung: 100%. Die Kontraktionskraft des Herzmuskels von Kontrolltieren wird durch cGMP stark verringert, während sie bei cGKI<sup>cko</sup> Mäusen nach cGMP-Behandlung kaum reduziert ist.

### 3.4 Gewebe- und Zeit- spezifische cGKI-defiziente Mäuse

Zur zeitlichen Steuerung der Mutagenese wurden modifizierte Cre Rekombinasen entwickelt, die sich durch synthetische Stoffe aktivieren lassen (**Abb. 1.5 C; Abb. 3.17**). Durch die Verwendung dieser „Liganden-aktivierbaren“ Cre Rekombinasen ist es möglich, den Zeitpunkt der Rekombination zu kontrollieren, d.h. die Exzision eines Zielgens durch Verabreichung des Liganden sowohl in Geweben erwachsener Mäuse (Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997) als auch *in utero* während der Embryonalentwicklung (Danielian et al., 1998) zu bewirken. Wird nun eine „Liganden-aktivierbare“ Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines Gewebespezifischen Promotors exprimiert, ist es möglich, ein „gefloxtes“ Zielgen Gewebe- und Zeit-spezifisch aus dem Genom zu entfernen.

### 3.4.1 Glattmuskel-spezifische und Tamoxifen-induzierbare cGKI-defiziente Mäuse

Für die Glattmuskel- und Zeit-spezifische Zerstörung des cGKI Gens wurden  $cGKI^{L2}$  und  $cGKI^{-}$  Mäuse mit *SM-KI* („Knockin“; Genotyp: +/-) Mäusen (Kühbandner et al., 2000) verkreuzt, die die Tamoxifen-aktivierbare CreER<sup>T2</sup> Rekombinase (Cre<sub>T</sub>) unter der Kontrolle des endogenen *SM22* Promotors exprimieren. Dies sollte ein zeitlich regulierbares Herausschneiden des „geflochten“ cGKI Exons durch die Rekombinase erlauben (**Abb. 3.17**). CreER<sup>T2</sup> wird schon durch relativ geringe Mengen an Tamoxifen (i.p. verabreicht; 2.2.4) aktiviert, vor allem in der viszeralen, aber auch in der vaskulären glatten Muskulatur (Kühbandner et al., 2000). Untersuchungen der Rekombination im glatten Muskel des Darmes und der Aorta zeigten, dass eine effiziente Exzision „gefloxter“ DNS im Darm bereits durch 5-malige Gabe von 1 mg Tamoxifen (i.p.) erreicht wird und durch einen zweiten Injektionszyklus in der Aorta leicht verbessert werden kann (Dr. Susanne Feil, persönliche Mitteilung). Um sowohl in den viszeralen als auch in den vaskulären glatten Muskelzellen eine möglichst hohe Rekombinationsrate zu erhalten, wurden alle Mäuse zweimal im Abstand von 3 Wochen (im Alter von 4 und 8 Wochen) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 1 mg Tamoxifen (pro Tag) behandelt.



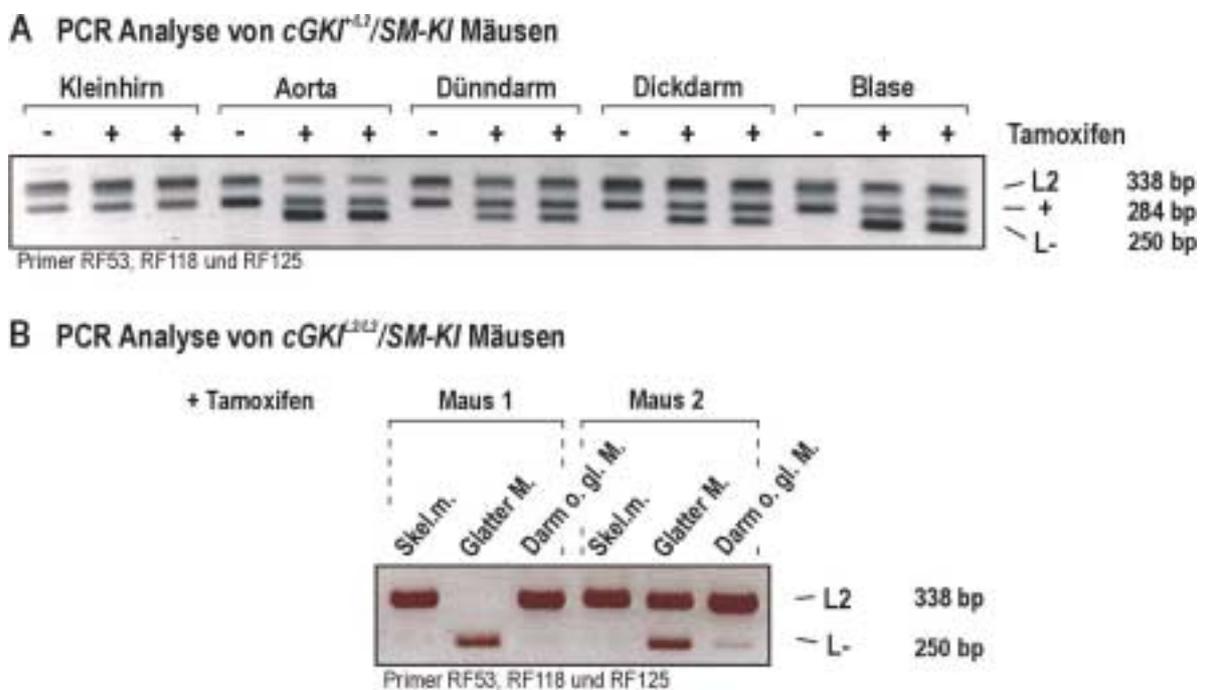
**Abb. 3.17: Gewebe- und Zeit-spezifische Mutagenese des cGKI Gens in der Maus**

Nach Verabreichung von Tamoxifen wird die Tamoxifen-aktivierbare Cre<sub>T</sub> aktiviert (Sternchen), was zu einer Gewebe-spezifischen Exzision des *loxP*-flankierten (Dreieck) Exons in den Zellen führt, die die Cre<sub>T</sub> exprimieren (graues Oval).

#### 3.4.1.1 Rekombinations- und Expressionsanalyse

Da die CreER<sup>T2</sup> Rekombinase in Abwesenheit des Liganden Tamoxifen nicht aktiv ist, kann man  $cGKI^{L2}$  Mäuse mit *SM-KI* Mäusen verkreuzen, ohne dass das

„gefloxt“ Exon aus dem Genom herausgeschnitten wird. Es ist also möglich,  $cGKI^{+/L2}/SM-KI$  oder  $cGKI^{L2/L2}/SM-KI$  Mäuse zu generieren (vgl. 2.1.6), wobei erst nach Verabreichung von Tamoxifen ein L- Allel entsteht (**Abb. 3.17**). Die PCR Analyse der DNS aus verschiedenen Organen von  $cGKI^{+/L2}/SM-KI$  Tieren ergab, dass das L- Allel selektiv in glatten Muskelzellen und nur nach Tamoxifengabe entstanden war (**Abb. 3.18 A**). Die Analyse der DNS von Tamoxifen-injizierten  $cGKI^{L2/L2}/SM-KI$  Mäusen bestätigte die Ergebnisse und wies darauf hin, dass zwischen den untersuchten Tieren individuelle Unterschiede in der Rekombinationsrate bestehen können (**Abb. 3.18 B**).



**Abb. 3.18: Rekombinationsanalyse der Glattmuskel-spezifische und Tamoxifen-induzierbaren  $cGKI$ -defizienten Mäuse**

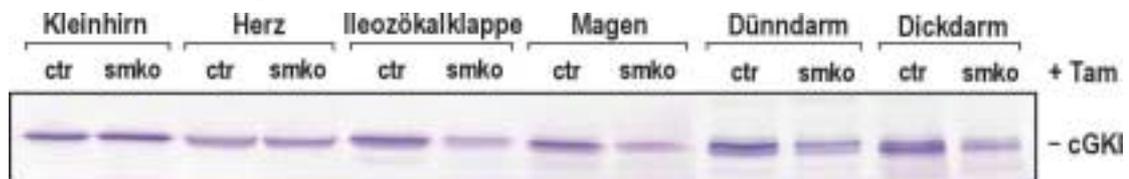
PCR Analyse (2.2.5.4) der Exzision des „gefloxt“  $cGKI^{L2}$  Allels nach Aktivierung der Cre Rekombinase durch Verabreichung von Tamoxifen (2.2.4). (A) Analyse von  $cGKI^{+/L2}/SM-KI$  Mäusen und (B)  $cGKI^{L2/L2}/SM-KI$  Mäusen (Alter: 13 Wochen) unter Verwendung der Primer RF53, RF118 und RF 125. (A) Verändertes PCR-Protokoll. „Skel.m.“ = Skelettmuskel; „Glatter M.“ = abgezogene glatte Muskelschicht des Dünndarmes; „Darm o. gl. M.“ = das nach Entfernen der glatten Muskulatur übrig bleibende Dünndarmgewebe.

Für die weiteren Expressionsanalysen und für die funktionellen Analysen wurden  $cGKI^{L-/L2}/SM-KI$  Mäuse (Glattmuskel-spezifische  $cGKI$ -defiziente Mäuse;  $cGKI^{smko}$ ) gezüchtet (2.1.5) und mit Kontrollmäusen (ctr;  $cGKI^{+/L2}/SM-KI$ ) verglichen. Die  $cGKI^{smko}$  Tiere haben den Vorteil, dass schon von vornherein ein Knockout Allel

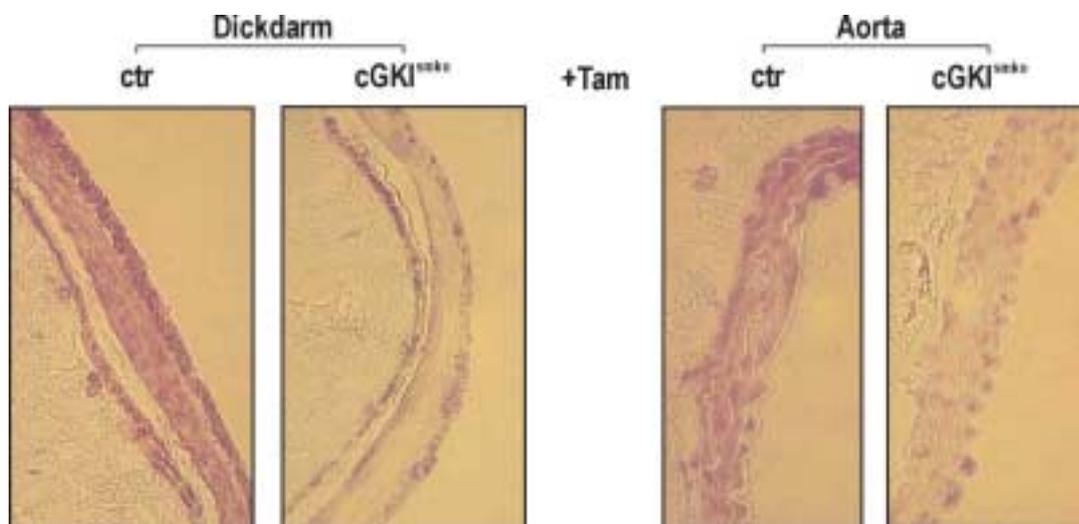
(L-) im Genom vorhanden ist, und lediglich ein „gefloxtes“ Exon durch die Cre Rekombinase herausgeschnitten werden muss, um eine cGKI-defiziente Zelle zu erhalten.

Im Western Blot war eine deutliche Reduktion des cGKI Proteins in Proben aus Ileozökalklappe, Magen, Dünndarm und Dickdarm von Tamoxifen-injizierten  $cGKI^{smko}$  Mäusen im Vergleich zu Tamoxifen-injizierten Kontrolltieren zu erkennen. In Extrakten aus Kleinhirn, Herz, Thrombozyten (2.2.6.1) und weiteren nicht-glattmuskulären Geweben waren die Mengen an cGKI bei Mäusen beider Genotypen ungefähr gleich (**Abb. 3.19 A**; Daten z.T. nicht gezeigt). Immunhistologische Untersuchungen von Darm und Aorta der Kontrollmäuse und

### A Western Blot Analyse



### B Immunhistologische Färbungen



### Abb. 3.19: Expressionsanalyse Glattmuskel-spezifischer und Tamoxifen-induzierbarer cGKI-defizienter Mäuse

Nachweis der cGKI Proteins durch (A) Western Blot Analyse (2.2.6.5) und (B) immunhistologische Färbung (2.2.7.4) der Gewebeschnitte von Kontrolltieren (ctr;  $cGKI^{+/L2}/SM-KI$ ) und  $cGKI^{smko}$  (smko;  $cGKI^{L-L2}/SM-KI$ ) Mäusen nach Injektion von Tamoxifen (Alter der Tiere: 13 Wochen). In der viszeralen und vaskulären glatten Muskulatur der  $cGKI^{smko}$  Mäuse lässt sich cGKI Protein nur in wenigen Zellen nachweisen. Originalvergrößerung der Schnitte des Darmes bzw. der Aorta: 200x und 400x. Die verwendeten Antikörper sind in 6.5; 6.6 und 6.7 aufgeführt. Nähere Erläuterungen im Text.

cGKI<sup>smko</sup> Mäuse zeigten, dass die Expression des cGKI Proteins in der glatten Muskulatur des Darms von Tamoxifen-behandelten cGKI Mutanten um ungefähr 80% - 90% verringert war. In den glatten Muskelzellen der Aorta schien die cGKI etwas weniger stark reduziert zu sein (**Abb. 3.19 B**).

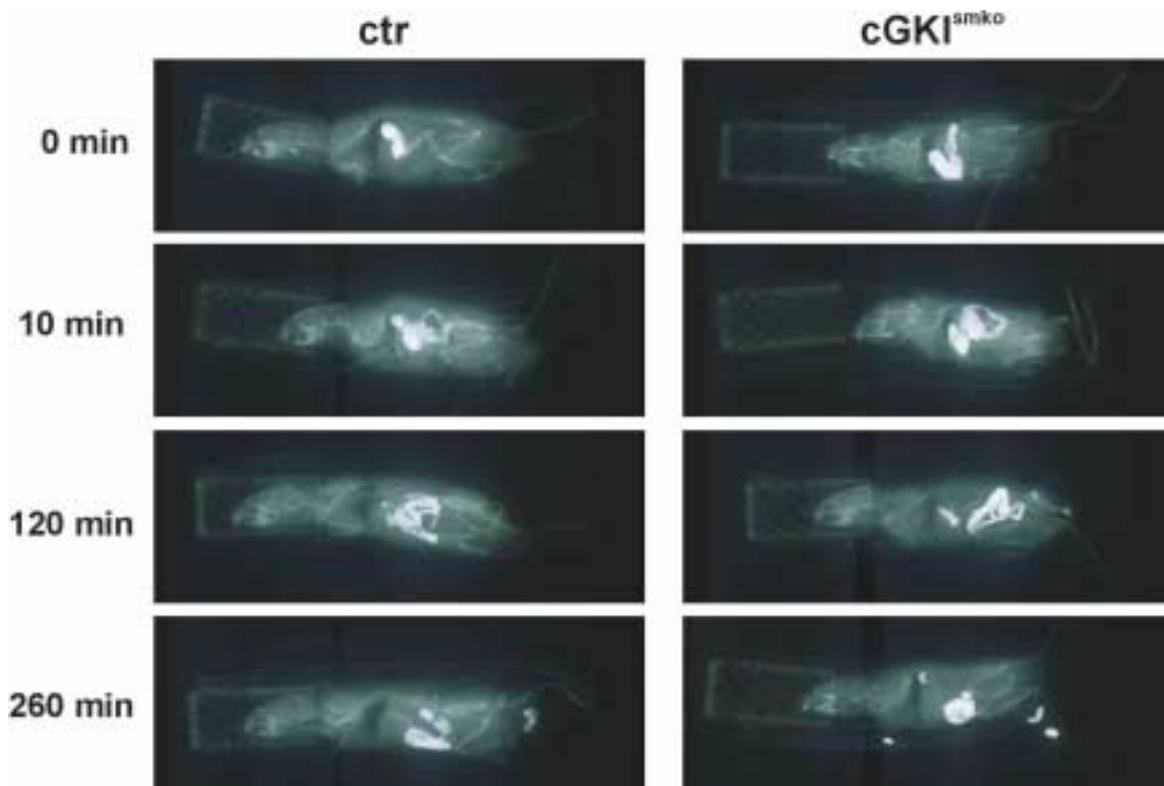
Um eine genauere Vorstellung von der Effizienz der cGKI- Reduktion in der glatten Muskulatur der Aorta zu bekommen, wurden 6 µm dicke Paraffinschnitte der Aorta von je 5 Tamoxifen-injizierten Kontroll- und cGKI<sup>smko</sup> Mäusen im Alter von 12 Wochen angefertigt (2.2.7.4). Der Anteil der immungefärbten cGKI-positiven vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) wurde jeweils mit der Gesamtzahl der VSMCs pro Gesichtsfeld von mindestens 3 verschiedenen Schnitten pro Maus ins Verhältnis gesetzt (2.2.8). Von jeder Maus wurde die prozentuale Menge an cGKI-positiven Zellen errechnet (n = 15 Schnitte pro Genotyp). Die cGKI wurde in ca. 69% der VSMCs der Kontrolltiere und in ca. 29% der VSMCs der cGKI<sup>smko</sup> Tiere detektiert. Dies bedeutet, dass in cGKI<sup>smko</sup> Mäusen die cGKI in über 55% der VSMCs, die das Protein normalerweise exprimieren, deletiert war.

### 3.4.1.2 Funktionelle Analyse

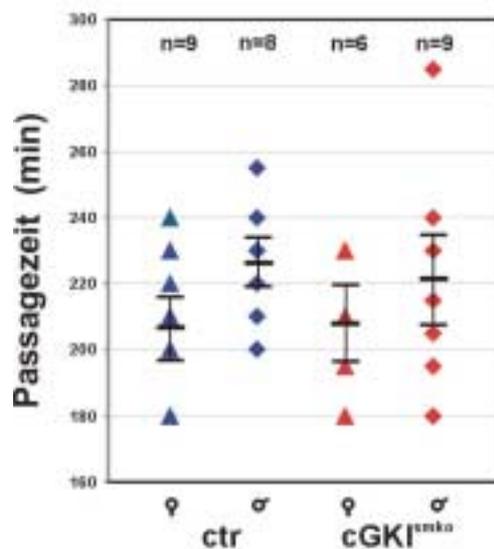
Die Tamoxifen-behandelten cGKI<sup>smko</sup> Mäuse erschienen phänotypisch unauffällig. Die Auswirkung des cGKI Gendefekts in einem Großteil der glatten Muskelzellen des Magen-Darm-Trakts auf die intestinale Motilität wurde durch Röntgenkontrastuntersuchung analysiert. Bei allen Versuchstieren (je 2 Kontrolltiere und cGKI<sup>smko</sup> Mäuse, Tamoxifen-behandelt) wurden normale peristaltische Bewegungen festgestellt (**Abb. 3.20 A**). Dieser Versuch wurde mit mehreren Kontrollmäusen (n=17) und cGKI<sup>smko</sup> Mäusen (n=15) wiederholt, wobei lediglich die Zeit für die Passage des Bariumsulfat-haltigen Breis gemessen und keine weiteren Röntgenbilder angefertigt wurden (**Abb. 3.20 B**). Bariumsulfat-haltige Faeces erschien frühestens 180 min und spätestens 285 min nach Verabreichung des Kontrastmittels. Die gemittelten Passagezeiten durch den Magen-Darm-Trakt waren zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich.

Bei Tamoxifen-injizierten cGKI<sup>smko</sup> Mäusen wurde mit der „tail cuff“-Methode ein normaler Blutdruck festgestellt (Dr. Susanne Feil, persönliche Mitteilung).

## A Röntgenuntersuchung



## B Darmpassagezeit



**Abb. 3.20: Analyse der gastrointestinalen Motilität der Glattmuskelspezifischen und Tamoxifen-induzierbaren cGKI-defizienten Mäuse**

(A) Röntgenaufnahmen (2.2.11) von Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren (ctr;  $cGKI^{+/L2}/SM-KI$ ) und  $cGKI^{smko}$  ( $cGKI^{L-/L2}/SM-KI$ ) Mäusen nach Verabreichung von Bariumsulfat (p.o.). (B) Analyse der Darmpassagezeit (2.2.12) des Nahrungsbreis von weiblichen und männlichen Kontrolltieren und  $cGKI^{smko}$  Mäusen (Alter: 23-31 Wochen). Die Balken (schwarz) stellen die jeweiligen Mittelwerte ( $\pm$  SEM) dar.

### 3.5 Glattmuskel-spezifische Tamoxifen-induzierbare cGKI-defiziente Mäuse auf Apo E-defizientem Hintergrund

Zur Untersuchung der Funktion der cGKI in VSMCs der Aorta wurden die cGKI<sup>smko</sup> Mäuse mit Atherosklerose-entwickelnden Apo E-defizienten Mäusen (Zhang et al., 1992) verkreuzt und der Einfluss der cGKI auf die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen analysiert.

#### 3.5.1 Atherosklerose in Apo E-defizienten Mäusen und Einfluss von Tamoxifen auf die Bildung atherosklerotischer Plaques

*Apo E*<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln progressive atherosklerotische Plaques (2.1.3) und werden häufig als Tiermodell für die Erforschung des Einflusses genetischer Veränderungen auf den Verlauf der Atherosklerose verwendet (Breslow, 1996). Um die Bedeutung der cGKI für die Atheroskleroseentwicklung (3.5.2) analysieren zu können, mussten die Versuchstiere mit Tamoxifen behandelt werden. Da Tamoxifen Auswirkungen auf die Größe der entstehenden Plaques haben könnte (Reckless et al., 1997), wurde in einem Vorversuch überprüft, ob sich nach Injektion von insgesamt 10 mg Tamoxifen bzw. Vehikel (2.2.4) die durchschnittlichen Plaqueflächen wesentlich voneinander unterscheiden. Es wurden Gruppen von 2-4 weiblichen und männlichen *Apo E*<sup>+/-</sup> (Kontrolle) und *Apo E*<sup>-/-</sup> Mäusen mit Tamoxifen bzw. Vehikel behandelt und 14 und 18 Wochen lang mit Fett- und Cholesterin-reichem Futter (2.2.13) ernährt. Die Größe der atherosklerotischen Plaques im Aortenbogen wurde anhand eines Punktesystems verglichen. Die Injektion von Tamoxifen hatte auf die Entwicklung der Atherosklerose in *Apo E*<sup>-/-</sup> Tieren keinen Einfluss (**Tab. 6.8**). Gleichzeitig konnte in diesem Versuch bestätigt werden, dass mit der Fett- und Cholesterin-reichen Diät in *Apo E*<sup>-/-</sup> Mäusen Atherosklerose induziert werden konnte. Im Gegensatz dazu waren in den Aorten der *Apo E*<sup>+/-</sup> Tiere keine Läsionen zu finden, unabhängig davon, ob sie mit Tamoxifen oder Vehikel behandelt worden waren.

### 3.5.2 Einfluss der cGKI auf die Bildung atherosklerotischer Plaques

Die Funktion der cGKI für die Entstehung und Progression der Atherosklerose in der Aorta wurde in cGKI<sup>smko</sup> Mäusen auf Apo E-defizientem Hintergrund untersucht. Die konditionalen cGKI Mutanten (cGKI<sup>smko</sup>; Genotyp: cGKI<sup>L/L2</sup> /SM-KI /Apo E<sup>-/-</sup>) und die Kontrolltiere (ctr; Genotyp: cGKI<sup>+L2</sup> /SM-KI /Apo E<sup>-/-</sup>) wurden nach dem Verpaarungsschema in 2.1.6 generiert. Alle Tiere wurden mit Tamoxifen behandelt (2.2.4) und 8 bzw. 16 Wochen lang mit einer Fett- und Cholesterinreichen Diät gefüttert (2.2.13). Der Versuchsablauf ist schematisch in 2.2.13 gezeigt. Im Folgenden sind die Ergebnisse für weibliche Mäuse dargestellt. Mit männlichen Mäusen wurden tendenziell ähnliche Ergebnisse erhalten.

#### 3.5.2.1 Analyse verschiedener physiologischer Parameter

Da unterschiedliche Blutfettwerte in Kontrollmäusen (ctr) und konditionalen cGKI Mutanten (cGKI<sup>smko</sup>) ein Grund für einen Unterschied in der Fläche der Läsionen sein könnte, wurden die Konzentrationen von Gesamtcholesterin, Triglyzeriden, HDL und LDL im Blut gemessen (3.5.2.1). Nach 8 bzw. 16 Wochen Fütterung mit dem Spezialfutter wurde das Blut von jeweils 5 bis 7 Tieren entnommen und analysiert. Es wurde bei keinem untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Blutfettwerten der beiden Genotypen festgestellt (**Tab. 3.1 A**). Das Körpergewicht sowie das Verhältnis von Herz- bzw. Nierengewicht zum Körpergewicht war zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich (**Tab. 3.1 B**). Schließlich wurde der Blutdruck („tail cuff“-Methode) und die Herzrate der Tiere bestimmt. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und konditionalen cGKI Mutanten (**Tab. 3.1 C**).

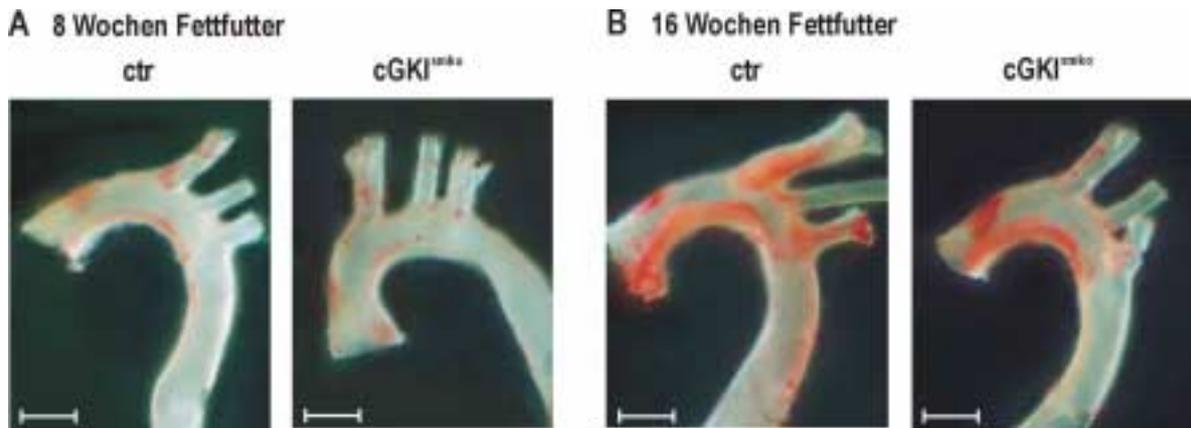
#### 3.5.2.2 Vergleich der Plaqueflächen im Aortenbogen

Die Aorten der Versuchstiere wurden wie in 2.2.16 beschrieben entnommen und mit Oil Red O gefärbt (**Abb. 3.21**). Die Flächen der rot-gefärbten atherosklerotischen Plaques wurden zunächst optisch beurteilt und danach mit Hilfe eines Computerprogramms vermessen (2.2.16.4). Während die Plaqueflächen nach 8-wöchiger Fütterung noch ähnlich waren, wurde nach 16-wöchiger Fütterung ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollmäusen (ctr) und konditionalen cGKI Mutanten (cGKI<sup>smko</sup>) festgestellt, sowohl bei Beurteilung der Plaques in den

Tab. 3.1: Analyse verschiedener physiologischer Parameter

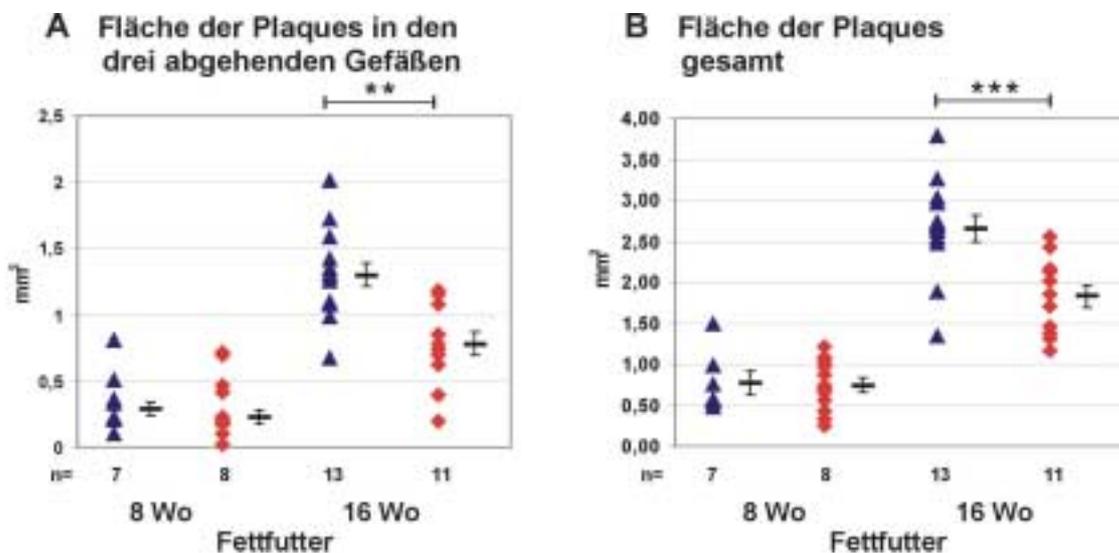
	8 Wochen Fettfutter		16 Wochen Fettfutter	
	ctr	cGKI <sup>smko</sup>	ctr	cGKI <sup>smko</sup>
<b>A</b>				
<b>Blutfettwerte</b> (in mg/dl)	n = 5	n = 5	n = 7	n = 5
<b>Gesamtcholest.</b>	535,2 ± 48,1	460 ± 33,6	459 ± 41,3	540 ± 60,9
<b>Triglyzeride</b>	202,6 ± 4,1	202,6 ± 2,5	84,3 ± 12	88 ± 4,3
<b>HDL</b>	95,4 ± 7,3	88,6 ± 5,7	91,8 ± 9,7	91 ± 10
<b>LDL</b>	399,3 ± 43,6	330,9 ± 28,6	350,3 ± 33,7	431,8 ± 55,8
<b>HDL/LDL</b>	4,2 ± 0,39	3,7 ± 0,17	3,9 ± 0,22	4,7 ± 0,22
<b>B</b>				
	n = 9	n = 10	n = 15	n = 11
<b>Körpergewicht (g)</b>	21,4 ± 0,6	21,6 ± 0,5	25,1 ± 0,5	24,9 ± 0,8
<b>Herzgewicht / Körpergewicht (mg/g)</b>	3,92 ± 0,11	3,48 ± 0,36	3,99 ± 0,1	4,03 ± 0,17
<b>Nierengewicht / Körpergewicht (mg/g)</b>	6,16 ± 0,26	5,44 ± 0,14	5,43 ± 0,15	5,61 ± 0,15
<b>C</b>				
<b>Blutdruck</b>	n.b. <sup>b</sup>	n.b. <sup>b</sup>	n = 9	n = 6
<b>MBP (mm Hg)</b>	n.b. <sup>b</sup>	n.b. <sup>b</sup>	81 ± 2	86 ± 3
<b>Herzrate (bpm<sup>a</sup>)</b>	n.b. <sup>b</sup>	n.b. <sup>b</sup>	633 ± 17	662 ± 16

<sup>a</sup> bpm = "beats per minute"; Herzschläge pro Minute; <sup>b</sup> n.b. = nicht bestimmt



### Abb. 3.21: Oil Red O – Färbung der Aortenbögen

Oil Red O - Färbung (2.2.16.2) der atherosklerotischen Plaques in Aortenbögen von Kontrollmäusen (ctr) und konditionalen ( $cGKI^{smko}$ ) Mutanten nach (A) 8 und (B) 16 Wochen Fettfutter-Diät. Sowohl die Flächen der Plaques in den drei abgehenden Gefäßen (Truncus brachiocephalicus, Arteria carotis communis sinistra, A. subclavia sinistra) als auch die Gesamtflächen der Plaques wurden vermessen (s. Abb. 3.22) und ausgewertet. Balken: 1mm.



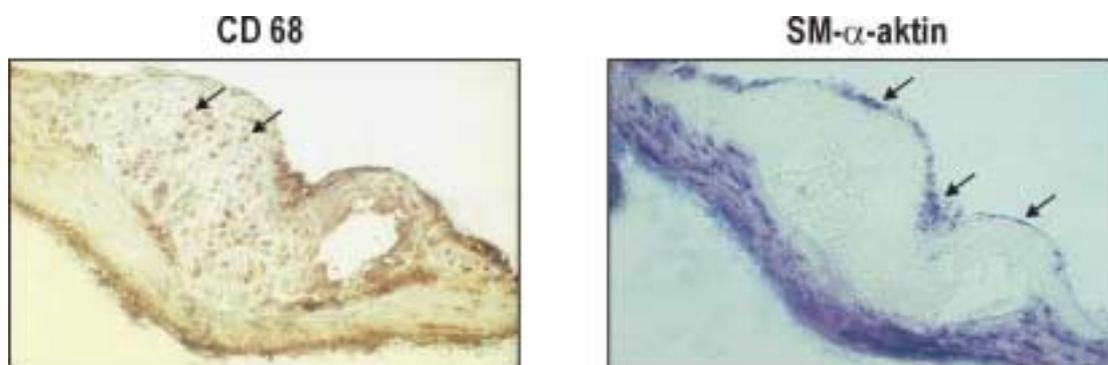
### Abb. 3.22: Analyse der Flächen der atherosklerotischen Läsionen

Vergleich der Plaqueflächen (in  $mm^2$ ) in (A) den drei vom Aortenbogen abgehenden Gefäßen bzw. (B) im gesamten Aortenbogen von weiblichen Kontrollmäusen (blau) und konditionalen Knockout Mäusen (rot) nach 8- und 16-wöchiger Fütterung mit der Spezialdiät (2.2.13). Ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney Test; 2.2.16.5) zwischen den Plaqueflächen von Kontrollmäusen und konditionalen Mutanten wurde nach 16-wöchiger Diät erhalten (\*\*  $p=0,002$ ; \*\*\*  $p=0,0007$ ).

drei abgehenden Gefäßen (Truncus brachiocephalicus, Arteria carotis communis sinistra und A. subclavia sinistra) (**Abb. 3.22 A**) als auch bei der Beurteilung der Gesamtplaquefläche (**Abb. 3.22 B**). Die durchschnittliche Gesamtfläche der Läsionen (bzw. der Läsionen in den drei abgehenden Gefäßen) betrug bei Kontrollmäusen  $2,63 \pm 0,16 \text{ mm}^2$  (bzw.  $1,28 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ ) und bei  $\text{cGKI}^{\text{smko}}$  Mäusen  $1,81 \pm 0,14 \text{ mm}^2$  (bzw.  $0,77 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ ). Das entspricht bei Kontrolltieren  $32,9 \pm 2,0\%$  (bzw.  $16,0 \pm 1,2\%$ ) und bei den konditionalen Mutanten  $22,7 \pm 0,9\%$  (bzw.  $9,6 \pm 0,9\%$ ) der Gesamtfläche des Aortenbogens ( $\cong 8 \text{ mm}^2$ ). Die durchschnittliche Plauefläche betrug also in  $\text{cGKI}^{\text{smko}}$  Mäusen ca. 69% (bzw. 60%) der in Kontrolltieren gemessene Fläche, d.h. in den  $\text{cGKI}$  Mutanten war die Fläche der Plaques gegenüber den Kontrollen um ca. 30-40% reduziert.

### 3.5.2.3 Expression von cGKI und Markerproteinen in atherosklerotischen Plaques

Die CD68-Immunfärbung bestätigte die Anwesenheit von Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen. Mit einem Antikörper gegen „smooth muscle- $\alpha$ -actin“ (SM- $\alpha$ -aktin) konnten im Randbereich der Plaques glatte Muskelzellen nachgewiesen werden (**Abb. 3.23**). In der glatten Gefäßmuskulatur war die cGKI Expression in  $\text{cGKI}^{\text{smko}}$  Mäusen um über 55% reduziert im Vergleich zu den Kontrollmäusen (**Abb. 3.24; Tab.3.2**). Dies bestätigt die Ergebnisse der cGKI Expressionsanalyse der  $\text{cGKI}^{\text{smko}}$  Mäuse auf gemischtem Hintergrund (nicht Apo E-defizientem Hintergrund) (vgl. 3.4.1.1; **Abb. 3.19**). Auffällig war, dass sowohl in Läsionen der Kontrolltiere als auch in denen der konditionalen Knockout Mäuse die meisten der eingewanderten Makrophagen cGKI bildeten (**Abb. 3.24**).



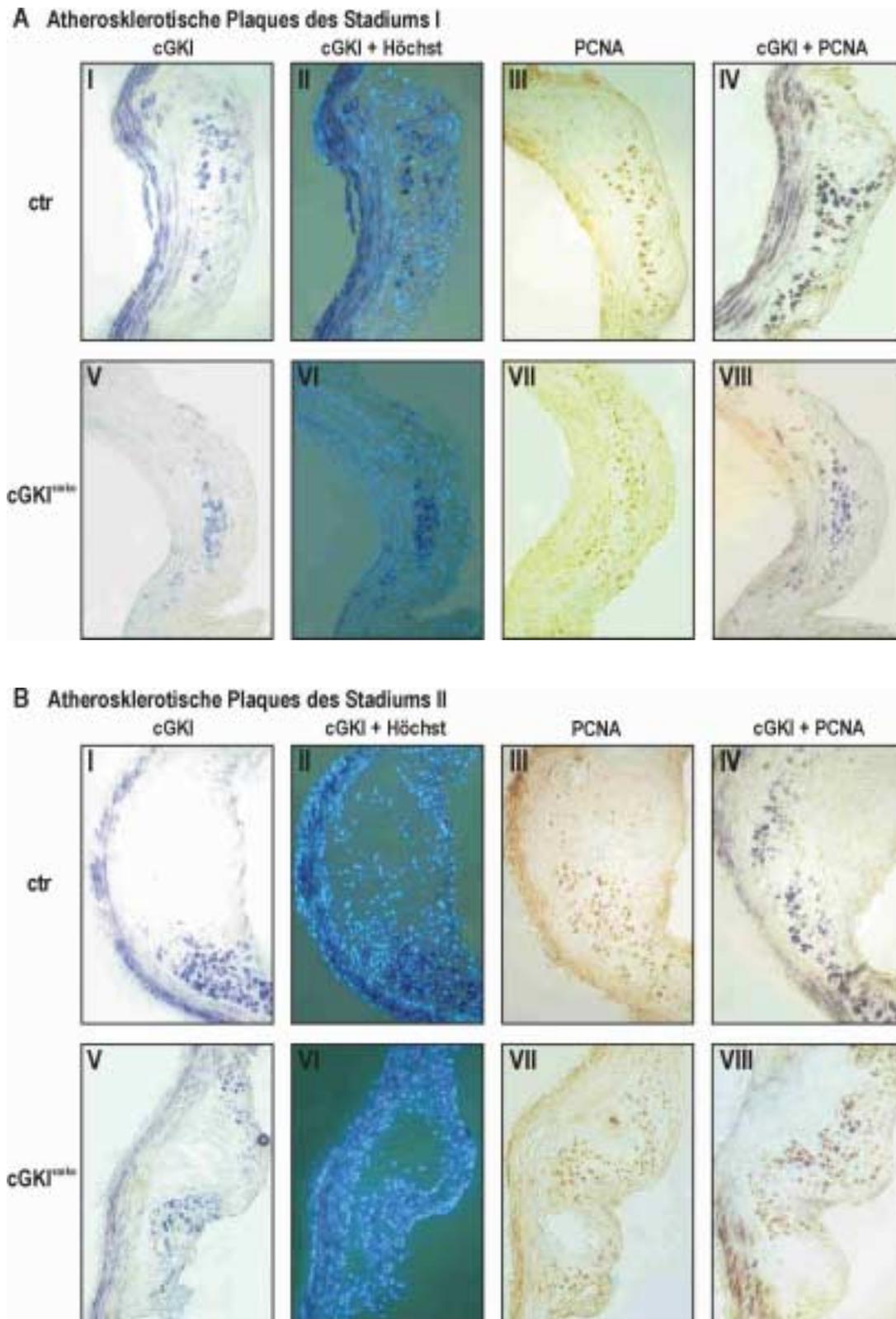
**Abb. 3.23: Nachweis von Makrophagen und glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques**

Immunfärbung (2.2.7.4) der seriellen Schnitte des Aortenbogens einer  $\text{cGKI}^{\text{smko}}$  Maus (vgl. **Abb. 3.24 B**) mit Antikörpern gegen CD68 bzw. SM- $\alpha$ -aktin (6.6; 6.7) zum Nachweis von Makrophagen (braun; Pfeile) bzw. glatten Muskelzellen (blau). Bildung einer fibrösen Hülle mit eingewanderten glatten Muskelzellen (blau; Pfeile). Originalvergrößerung: 200x.

Das „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) ist ein essentieller Bestandteil der eukaryotischen DNS-Replikationsmaschinerie und wird in der frühen G1- und S-Phase des Zellzyklus in der Kernregion gebildet (Waseem et al., 1990; Woods et al., 1991). Durch gleichzeitige cGKI und PCNA Immunfärbung von Schnitten der Aortenbögen im Bereich der Läsionen konnte festgestellt werden, dass ein großer Teil der cGKI-exprimierenden glatten Muskelzellen der Arterienwand unterhalb eines atherosklerotischen Plaques gleichzeitig auch PCNA-positiv war (**Abb. 3.24**). In der Mehrheit der nicht cGKI-exprimierenden Zellen konnte kein PCNA nachgewiesen werden. Von jeweils 5 Kontrollmäusen und cGKI<sup>smko</sup> Mäusen (Apo E-defizienter Hintergrund) wurden die VSMCs unterhalb der Plaques von Aortenschnitten ausgezählt (je 3 Schnitte pro Maus; n= 15 pro Genotyp), in welchen cGKI und/oder PCNA immunhistologisch und die Zellkerne mit Höchst-Farbstoff gefärbt waren. Die Zahl der Zellen (pro Gesichtsfeld), die cGKI oder cGKI und PCNA exprimierten, wurde bestimmt und zur Gesamtzellzahl (Kernfärbung) ins Verhältnis gesetzt (**Tab. 3.2**).  $55,5 \pm 3,1\%$  der VSMCs der Kontrollmäuse exprimierten cGKI,  $43,3 \pm 1,8\%$  gleichzeitig cGKI und PCNA. Bei den konditionalen Knockout Mäusen wurde in  $23,9 \pm 2,6\%$  der VSMCs cGKI nachgewiesen,  $16,7 \pm 1,8\%$  der VSMCs exprimierten cGKI und PCNA. Das bedeutet, dass in ca. 70-80% der ausgezählten cGKI-positiven VSMCs von Kontrollmäusen und cGKI<sup>smko</sup> Mäusen gleichzeitig auch PCNA detektiert werden konnte. Bei den meisten der cGKI-positiven Zellen handelt es sich also um proliferierende Zellen.

**Tab. 3.2: Bestimmung der Anzahl der cGKI- und PCNA-exprimierenden Zellen**

Immunfärbung	Glatte Muskelzellen unterhalb des Plaques	
<p style="text-align: center;"><b>cGKI</b></p> <p style="text-align: center;"><b>cGKI + PCNA</b></p>	<p>n = 15</p> <p><b>ctr</b></p>	<p><b>cGKI<sup>smko</sup></b></p>
	<p><math>55,5\% \pm 3,1\%</math></p>	<p><math>23,9\% \pm 2,6\%</math></p>
	<p><math>43,3\% \pm 1,8\%</math></p>	<p><math>16,7\% \pm 1,8\%</math></p>
	<p><math>p \leq 0,001</math></p>	



**Abb. 3.24: Immunfärbung von Schnitten der atherosklerotischen Plaques**

Atherosklerotische Plaques der Stadien I (A) und II (B). Immun- und Kernfärbung (2.2.7.3; 2.2.7.4) der in Serie geschnittenen Aorten von Kontrollmäusen (ctr) (I-IV) und konditionalen Mutanten (cGKI<sup>smko</sup>) (V-VIII). Die Färbungen wurden mit Antikörpern gegen cGKI (I;V), PCNA (III;VII) bzw. cGKI und PCNA (IV;VIII; Doppelfärbung) durchgeführt. Verwendete Antikörper siehe 6.6 und 6.7. Kernfärbung mit Höchst-Farbstoff im UV-Licht ( $\lambda = 395 \text{ nm}$ ) (II;VI). Originalvergrößerung: 200x.

## 4 Diskussion

### 4.1 Konditional cGKI-defiziente Mäuse – Möglichkeiten und Grenzen

Die Generierung transgener Mäuse hat es möglich gemacht, die physiologische und pathophysiologische Rolle verschiedener Signalstoffe und Signalkaskaden genauer zu analysieren. Auch wenn konventionelle cGKI-defiziente Mäuse (*cGKI*<sup>-/-</sup> Mäuse) schon einiges zur Aufklärung der Funktion der cGKI beigetragen haben (Pfeifer et al., 1998; Massberg et al., 1999), so können bestimmte Fragestellungen an diesen Tieren nur schwer untersucht werden. *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäuse haben einen schwerwiegenden Phänotyp, der vor allem durch eine intestinale Fehlfunktion charakterisiert ist und zu einer stark verminderten Lebenserwartung der Mutanten (ca. 3-6 Wochen) führt. Da die cGKI während der Ontogenese in allen Zellen fehlt, ist die funktionelle Analyse der *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäuse limitiert. Sekundäre Effekte, die als Folge des multiplen Phänotyps auftreten, erschweren die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse.

Um einige dieser Probleme umgehen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Strategie für die konditionale, d.h. Gewebe-spezifische und/oder induzierbare Zerstörung des cGKI Gens entwickelt (**Abb. 3.3; Abb. 3.6; Abb. 3.17**). Das durch zwei *loxP*-Sequenzen flankierte Exon 10 des cGKI Gens (L2 Allel) sollte durch die Cre Rekombinase aus dem Genom entfernt und somit in den Zellen, in welchen Cre aktiv war, ein cGKI Knockout hergestellt werden.

Heterozygote *cGKI*<sup>+/L2</sup> und homozygote *cGKI*<sup>L2/L2</sup> Mäuse waren phänotypisch unauffällig und exprimierten normale Mengen an cGKI (3.1; **Abb. 3.2; Abb. 3.5**). Die in den Intronsequenzen vor und nach Exon 10 des Gens integrierten *loxP*-Erkennungssegmente und die für die Selektion rekombinierter ES-Zellklone notwendige *Tk/Neo*-Kassette hatten also keinen Einfluss auf Transkription und Translation der cGKI.

Durch Verpaaren der „gefloxten“ Mäuse mit einer Cre „deleter“ Mauslinie konnte durch Exzision des *loxP*-flankierten Genabschnitts ein keimbahngängiges Nullallel (L-) erzeugt werden. In homozygoten *cGKI*<sup>L-/L-</sup> Mäusen war weder Wildtyp cGKI-mRNS noch intaktes cGKI Protein nachweisbar (3.2.1; **Abb. 3.5**). Durch Herausschneiden des „gefloxten“ Exons 10 aus dem cGKI Gen wurde die ATP-Bindungsstelle zerstört und der Leserahmen unterbrochen. Der Phänotyp der *cGKI*<sup>L-/L-</sup> Tiere entsprach dem der schon beschriebenen konventionellen cGKI Knockout Mäuse (Pfeifer et al., 1998) (3.2.2). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch

Cre-vermittelte Rekombination des  $cGKI^{L2}$  Allels ein  $cGKI^{-}$  Nullallel entsteht, von welchem keine funktionelle cGKI exprimiert wird. Damit war eine weitere wichtige Voraussetzung für die Generierung konditional cGKI-defizienter Mäuse erfüllt.

Mittels des Cre/loxP-Rekombinationssystems wurden verschiedene Gewebe- und/oder Zeit-spezifische cGKI-defiziente Mausmutanten generiert. Für die Analyse des Phänotyps der Mutanten war es notwendig möglichst homogene Versuchstiergruppen zu erhalten. Hierzu wurden die konditionalen cGKI Mutanten und geeignete Kontrolltiere nach einem optimierten Verkreuzungsschema gezüchtet (2.1.5). Mäuse mit dem Genotyp  $cGKI^{L-L2}/Cre$  exprimieren die Cre Rekombinase nur in bestimmten Geweben oder Zelltypen. Nur in den Zellen, in welchen das Cre Enzym aktiv ist, kann eine Rekombination des  $cGKI^{L2}$  Allels zum  $cGKI^{-}$  Allel stattfinden, wodurch diese dann zu Knockout ( $cGKI^{L-L-}$ ) Zellen werden. In den nicht Cre-exprimierenden Geweben bleibt das  $cGKI^{L2}$  Allel und damit das cGKI Protein erhalten. Als Kontrolltiere wurden in der Regel  $cGKI^{+/L2}/Cre$  Mäuse verwendet. Da diese ebenfalls Cre bilden, kann die Ursache für einen eventuell auftretenden unterschiedlichen Phänotyp zwischen Kontrolltieren (ctr) und Knockout Mäusen nicht mit der An- bzw. Abwesenheit der Cre Rekombinase begründet werden. Die Kontrolltiere unterschieden sich von den Knockout Tieren nur durch den „Austausch“ des L- Allels durch ein Wildtyp Allel (+), das durch die Aktivität von Cre nicht zerstört werden kann. Deshalb besaßen die Kontrollmäuse in jeder Körperzelle mindestens ein intaktes cGKI Allel.

Die somatische Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems kann auch einige Nachteile mit sich bringen: 1) Oftmals sind die Gewebe-spezifischen Promotoren, die die Cre Expression steuern, nur in einem Teil der Zellen des gewünschten Gewebes aktiv, was den Anteil der rekombinierten Zellen im Zielgewebe vermindert („mosaicness“). 2) Rekombination kann aufgrund unerwarteter Expression der Cre Rekombinase auch in Zellen anderer Gewebe auftreten, in welchen das Gen intakt bleiben sollte („leakiness“). 3) In vielen Cre-transgenen Mauslinien wird Cre zu einem unerwünschten Zeitpunkt gebildet, oftmals bereits während der Embryogenese. Eine Möglichkeit der zeitlichen Steuerung der Rekombination ist die Verwendung Liganden-aktivierbarer Cre Rekombinasen. Die Qualität der Mutagenese ist also abhängig von der Verfügbarkeit Cre-transgener Mauslinien mit hoher Gewebe-Spezifität und der Möglichkeit der Kontrolle des Rekombinationszeitpunktes.

## 4.2 Vergleich der cGKI-Expression in verschiedenen konditionalen cGKI-defizienten Mauslinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Generierung konditional cGKI-defizienter Mäuse vier verschiedene Cre Mauslinien verwendet:

- ♦ *NEX-Cre* für Hippocampus-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>hko</sup>),
- ♦ *L7-Cre* für Purkinje Zell-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>pko</sup>),
- ♦ *MLC2a-Cre* für Herzmuskel-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>cko</sup>),
- ♦ *SM-KI* für Tamoxifen-induzierbare und Glattmuskel-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>smko</sup>).

Vor einer Untersuchung des Phänotyps der konditionalen Knockout Mäuse war es wichtig festzustellen, in welchen Geweben und in welchen Mengen das cGKI<sup>L-</sup> Allel gebildet wurde und ob eine Reduktion des cGKI Proteins in den gewünschten Organen bzw. Zelltypen nachweisbar war.

Die Analyse der DNS aus *GKI<sup>+L2</sup>/NEX-Cre* Mäusen zeigte, dass rekombinierte DNS lediglich im Gehirn bzw. im Hippocampus vorlag (**Abb. 3.7**). Man konnte also davon ausgehen, dass die cGKI Expression in den übrigen Geweben der cGKI<sup>hko</sup> Mäuse normal war. Im Western Blot wurden im Hippocampus der cGKI<sup>hko</sup> Mäuse noch Spuren des cGKI Proteins detektiert (**Abb. 3.8**). Deshalb war es wichtig, durch *in situ*-Hybridisierung auf zellulärer Ebene (**Abb. 3.9 A**) zu bestätigen, dass in der CA1-CA3 Region des Hippocampus cGKI-defiziente Zellen vorlagen. Dies war für die Beurteilung der späteren LTP-Messungen von Bedeutung. Das Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung konnte durch immunhistochemische Analysen bestätigt werden (**Abb. 3.9 B**).

In *GKI<sup>+L2</sup>/L7-Cre* Mäusen wurde in der DNS aus der Kleinhirnregion interessanterweise nur eine relativ schwache Rekombination des cGKI<sup>L2</sup> Allels festgestellt (3.3.2.1). Der Nachweis der Rekombination auf DNS-Ebene war auch bei anderen „geflochten“ Zielgenen nach Verkreuzen mit der *L7-Cre* Mauslinie ein Problem (Dr. J. Barski, Dr. A. Ludwig; mündliche Mitteilungen). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Rekombination selektiv nur in Purkinje Zellen stattfand, deren Anteil an der Gesamtzellzahl bzw. DNS im Kleinhirn relativ gering ist. In der Tat zeigte die Western Blot Analyse der cGKI<sup>pko</sup> Mäuse eine starke Reduktion der cGKI im Kleinhirn und die Immunhistologie eine vollständige Abwesenheit des Proteins in über 90% der Purkinje Zellen (**Abb. 3.11**). Die im Western Blot noch zu detektierende cGKI könnte auch aus glatten Muskelzellen der Hirngefäße oder aus Thrombozyten stammen

Das MLC2a-Cre Transgen scheint zwar in Kardiomyozyten sehr effizient zu sein, allerdings zeigte die DNS-Analyse von  $GKI^{+/L2}/MLC2a-Cre$  Mäusen auch Rekombination in anderen Geweben (3.3.3.1). Dadurch wurde die cGKI Expression in diesen Organen jedoch kaum beeinflusst (**Abb. 3.17**), was daran liegen könnte, dass die Rekombination vor allem in Zellen stattgefunden hatte, die keine cGKI exprimieren.

In Tamoxifen-induzierbaren Glattmuskel-spezifischen cGKI Knockout Mäusen sollte die Rekombination zeitlich steuerbar sein. Tatsächlich war in unbehandelten Tieren keine rekombinierte DNS nachweisbar, während die Exzision des  $cGKI^{L2}$  Allels durch i.p. Injektion von Tamoxifen selektiv in glatten Muskelzellen induziert werden konnte (**Abb. 3.18**). Das cGKI Protein wurde in den Tamoxifen-behandelten Mäusen effizient entfernt, in ca. 80-90% der viszeralen glatten Muskelzellen und in etwa 55% der VSMCs der Aorta (**Abb. 3.19**). Um einen möglichen Einfluss von Tamoxifen auf die Versuchsergebnisse auszugleichen, wurden stets Kontrollmäuse und  $cGKI^{smko}$  Tiere behandelt. Auswirkungen von Tamoxifen auf das Verhalten der Mäuse wurden nicht beobachtet. Nach Verabreichung von Tamoxifen wurde bis zur Analyse der Tiere eine Wartezeit von mindestens zwei Wochen eingehalten, damit die vorhandene cGKI abgebaut werden konnte.

Insgesamt zeigten diese Untersuchungen, dass die konditional cGKI-defizienten Mäuse für alle gewünschten Gewebe bzw. Zelltypen erfolgreich generiert wurden. Die Ergebnisse weisen aber auch darauf hin, dass die Rekombinationsanalyse auf DNS-Ebene alleine kaum Aussagen über eine Reduktion des Proteins in gewissen Geweben bzw. Zelltypen zulässt. Man kann lediglich abschätzen, wie hoch der Anteil der rekombinierten Zellen in den untersuchten Geweben ist. Dagegen gibt die Western Blot Analyse einen ersten Anhaltspunkt über die Reduktion des Proteins selbst, allerdings ohne zelluläre Auflösung. Letztendlich ist es aber notwendig, die Expression des Zielproteins auf zellulärer Ebene zu untersuchen, um eine genaue Vorstellung von der Qualität und Quantität der Mutagenese zu erhalten.

### 4.3 Funktionelle Analyse der konditional cGKI-defizienten Mäuse

Da zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen teilweise gravierende funktionelle Unterschiede bestehen können, kann der genetische Hintergrund der verwendeten Mäuse einen entscheidenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben. Um

diese Möglichkeit zu minimieren, wurden in allen Versuchen konditional cGKI-defiziente Mäuse mit Geschwistertieren (Kontrollen) aus dem gleichen Wurf verglichen („litter-matched“). Die in den funktionellen Analysen erhaltenen Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontrollmäusen und cGKI Mutanten sollten also auf die Zelltyp-spezifische Zerstörung des cGKI Gens zurückzuführen sein.

### 4.3.1 Die Rolle der cGKI für die Induktion von LTP und LTD

LTP und LTD sind zwei Formen synaptischer Plastizität, die in verschiedenen Regionen des Gehirns auftreten und für verschiedene Formen von Lernen und Gedächtnis von Bedeutung sein könnten.

#### cGKI und LTP im Hippocampus

Dass NO für die Induktion von LTP im Hippocampus eine wichtige Rolle spielt, scheint experimentell hinreichend gesichert zu sein (1.2.1). Der Weg, über welchen NO in der CA1 Region des Hippocampus LTP induziert, wird allerdings kontrovers diskutiert. Insbesondere ist unklar, ob hierbei die Aktivierung der cGK beteiligt ist. Interessanterweise zeigen junge (5 Wochen alte) Knockout Mäuse mit einer globalen cGKI Defizienz eine normale hippocampale LTP (Kleppisch et al., 1999). Ein Nachteil bei der Untersuchung dieser Mäuse ist deren verminderte Lebenserwartung und schwerwiegender Phänotyp, so dass nur relativ junge und „kranke“ Tiere untersucht werden können. Dagegen sind konditionale cGKI<sup>hko</sup> Mäuse phänotypisch gesund und können als adulte Tiere untersucht werden. LTP-Messungen erwachsener (12 Wochen alter) cGKI<sup>hko</sup> Mäuse ergaben, dass die Induktion der LTP unter bestimmten Reizbedingungen vermindert war (**Abb. 3.10**). Dagegen war in jungen (5 Wochen alten) cGKI<sup>hko</sup> Mäusen die LTP normal, was die früheren Befunde mit cGKI<sup>-/-</sup> Tieren bestätigt. Diese Ergebnisse weisen auf eine altersabhängige Rolle der cGKI für die LTP im Hippocampus hin. In den adulten Kontrollen konnte eine höhere LTP als in den jungen Mäusen ausgelöst werden (**Abb. 3.10**). Dies spricht dafür, dass mit zunehmendem Alter ein Mechanismus relevant wird, an welchem die cGKI beteiligt ist. Da das cGKI Protein sowohl in jungen als auch in erwachsenen Mäusen im Hippocampus exprimiert wird (**Abb. 3.8**), könnten Veränderungen vor- oder nachgeschalteter Signalproteine für den altersabhängigen Unterschied verantwortlich sein. Auch von verschiedenen anderen Mausmutanten ist bekannt, dass sich ein Defekt der LTP erst mit zunehmendem Alter manifestieren kann (z.B. Kirkwood et al., 1997). Die cGKI könnte über eine (direkte oder indirekte) Phosphorylierung des „cAMP-response-element“ -bindenden Proteins (CREB) an der Induktion der L-LTP („Late-phase LTP“) im Hippocampus beteiligt sein (Lu et al., 1999).

Die Hypothese, dass die synaptische Plastizität in bestimmten Teilen des Gehirns ein spezielles Verhalten vermittelt, ist experimentell schwer zu belegen. Es gibt Hinweise dafür, dass die hippocampale LTP mit bestimmten Formen des räumlichen Lernens assoziiert ist (1.2.1). Allerdings kann eine Korrelation zwischen einem Gendefekt in einem bestimmten Zelltyp und einem bestimmten Phänotyp in konventionellen Knockout Mäusen nur schwer nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Verhaltens konditionaler Mausmutanten ist in diesem Zusammenhang sehr hilfreich, da es mit dieser Technik möglich ist, eine genetische Veränderung in bestimmten Zelltypen in eingegrenzten Bereichen des Gehirns zu etablieren. Mit den erwachsenen cGKI<sup>hko</sup> Tieren wurden verschiedene Tests durchgeführt, mit denen „Hippocampus-abhängiges Verhalten“ untersucht werden kann, z.B. Angst-Konditionierung (Dr. Carsten Wotjak, MPI für Psychiatrie, München) und räumliches Lernen im modifizierten „Morris water maze“-Test (Dr. Susanne Feil). Trotz ihres LTP-Defekts war das Verhalten der cGKI<sup>hko</sup> Mäuse in allen durchgeführten Tests normal. Die cGKI des Hippocampus ist also für die hier untersuchten Formen des Lernens nicht von Bedeutung. Diese Ergebnisse passen zu Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die zeigen, dass die Bildung von NO im Hippocampus keine Auswirkung auf die Lernfähigkeit hat (z.B. Blokland et al., 1999).

### **cGKI und LTD im Kleinhirn**

Wie bereits erwähnt (1.2.1) gibt es zahlreiche Hinweise, dass die NO/cGMP Signalkaskade und möglicherweise die cGKI an der Induktion von LTD im Kleinhirn beteiligt sein könnte.

Purkinje Zell-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>pk0</sup> Mäuse) sind ein ideales Modell zur Analyse der LTD im Kleinhirn. Sie sind durch eine nahezu vollständige Abwesenheit der cGKI in Purkinje Zellen charakterisiert, während die cGKI in anderen Geweben normal exprimiert wird (**Abb. 3.11**). Für Unterschiede in der LTD und im Verhalten ist also ausschließlich das Fehlen des Proteins in diesen Zellen verantwortlich. Da diese Tiere eine normale Lebenserwartung besitzen, konnten die LTD- und Verhaltensanalysen mit erwachsenen Mäusen durchgeführt werden. Die Abwesenheit der cGKI in den Purkinje Zellen führte nicht zu Veränderungen der Anatomie des Kleinhirns (Dr. K. Schilling, Anatomisches Institut, Anatomie und Zellbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) oder der synaptisch ausgelösten Kalziumsignale in den Purkinje Zell-Dendriten (Dr. J. Hartmann, Physiologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München). In den Purkinje Zellen der cGKI<sup>pk0</sup> Mäuse wurde aber ein

fast vollständiger Verlust der LTD gefunden, was bedeutet, dass die cGKI an der Entstehung der LTD beteiligt ist.

Die LTD im Kleinhirn gilt als elektrophysiologisches Korrelat für die Speicherung von Informationen. Ergebnisse früherer Studien ließen die Vermutung zu, dass die Induktion von LTD motorisches Lernen vermittelt und dass ein Fehlen von LTD im Kleinhirn eine mögliche Erklärung für die Entwicklung von Ataxien ist (Aiba et al., 1994). Neuere Studien weisen aber darauf hin, dass die LTD nur für bestimmte Formen des motorischen Lernens notwendig ist, z.B. für die assoziative Lidschlusskonditionierung und die Adaptation des Vestibulo-Okular-Reflexes (VOR) (De Zeeuw et al., 1998). Interessanterweise zeigen die LTD-defizienten cGKI<sup>pk0</sup> Mäuse eine verminderte Adaptation des VOR (**Abb. 3.14**) bei normalen Augenbewegungen und motorischer Koordination. Das Defizit dieser cGKI Mutanten beschränkt sich also auf das Erlernen bestimmter Bewegungsabläufe.

Es stellt sich die Frage, über welchen molekularen Mechanismus die cGKI die Funktion des Kleinhirns reguliert. Ein in Purkinje Zellen vorkommendes Substratprotein der cGKI ist das sogenannte G-Substrat (Endo et al., 1999; Hall et al., 1999). Phosphoryliertes G-Substrat hemmt die Proteinphosphatase 1/2A. Applikation von Phosphataseinhibitoren und gleichzeitige Stimulation der Parallelfasern induziert LTD (Ajima und Ito, 1995). Es wäre also denkbar, dass die cGKI in Purkinje Zellen G-Substrat phosphoryliert, was zur Hemmung der Proteinphosphatase führt. Damit sollten die Mengen an Phospho-Proteinen in der Zelle ansteigen. Es ist bekannt, dass der phosphorylierte AMPA-Rezeptor vermehrt durch Endozytose von der Zellmembran entfernt wird, was dann zur LTD führt.

### 4.3.2 Die Funktion der cGKI für die Kraftentwicklung im Mausmyocard

Es ist schon länger bekannt, dass cGMP die myokardiale Kontraktilität reduziert. Wie dieser negativ inotrope Effekt intrazellulär vermittelt wird, ist nicht klar (1.2.2). Zur Analyse der cGKI Funktion im Herzen adulter Tiere wurden Herzmuskel-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>ck0</sup> Mäuse) untersucht. In den Herzmuskelpräparaten aus cGKI<sup>ck0</sup> Mäusen wurde keine Verminderung der Kontraktionskraft durch Behandlung mit cGMP-Analoga beobachtet, während sie in Kontrollpräparaten deutlich reduziert war (**Abb. 3.16**). Da in cGKI<sup>ck0</sup> Tieren das cGKI Protein selektiv in Kardiomyozyten reduziert war (**Abb. 3.15**) spiegelt der myokardiale Phänotyp eine zellautonome Funktion der cGKI in Herzmuskelzellen wieder, und nicht eine Funktion der cGKI in anderen Zelltypen. Als Mechanismus

kommen z.B. eine cGKI-vermittelte Desensitivierung kontraktile Filamente (Shah et al., 1995; Vila-Petroff et al., 1999) oder eine Hemmung der Aktivität des Kalziumkanals in Frage (Méry et al., 1991; Sumii et al., 1995). Der muskarinische Agonist Carbachol reduzierte die Kontraktionskraft des Herzmuskels von cGKI<sup>hko</sup> Mäusen und Kontrolltieren gleichermaßen (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate zeigen, dass die cGKI nicht an dem durch muskarinische Agonisten ausgelösten negativ inotropen Effekt beteiligt ist.

### 4.3.3 Die Rolle der cGKI für die Relaxation der glatten Muskulatur des Darmes

Das durch nicht-adrenerge nicht-cholinerge (NANC) Neurone oder Cajal Zellen gebildete NO stimuliert in den glatten Muskelzellen des Darmes die sGC und führt auf diese Weise zu einem erhöhten cGMP Spiegel. Der genaue Mechanismus der NO-Wirkung ist noch nicht geklärt, aber es scheint sehr wahrscheinlich, dass die NO/cGMP/cGKI Signalkaskade hier beteiligt ist (1.2.3).

Der Phänotyp von Mäusen mit einer globalen cGKI Defizienz lässt vermuten, dass die cGKI eine Relaxation der glatten Muskulatur des Darms bewirkt und die Peristaltik koordiniert (Pfeifer et al., 1998; eigene Beobachtungen). In cGKI Knockout Mäusen treten am Pylorus und an der Ileozökalklappe Stenosen auf, was die Passage der Nahrung durch den Magen-Darm-Trakt verzögert. Die Tiere weisen eine Mangelernährung auf und bleiben in ihrer körperlichen Entwicklung zurück. Da sich das Darmepithel nicht von dem der Wildtyp Tiere unterscheidet, ist eine verringerte Resorption von Nährstoffen unwahrscheinlich. Als Todesursache wird eine fortschreitende Entzündung des Bauchraumes, die durch den Stau des Nahrungsbreies hervorgerufen wird, vermutet (Pfeifer et al., 1999).

Mit Hilfe der Glattmuskel-spezifischen cGKI-defizienten Mäuse (cGKI<sup>smko</sup>) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch das Fehlen des cGKI Proteins in einem Großteil der glatten Muskelzellen des Magen-Darm-Traktes (**Abb. 3.19**) die Passage des Nahrungsbreies nicht beeinflusst wird (**Abb. 3.20**). An Pylorus und Ileozökalklappe waren keine Stenosen sichtbar. Da noch ca. 10% der glatten Muskelzellen im Magen-Darm-Trakt der cGKI<sup>smko</sup> Mäusen cGKI exprimierten, könnte es sein, dass diese Menge ausreicht, um die normale Funktion des Gastrointestinaltrakts aufrecht zu erhalten. Möglicherweise übernimmt die cGKI auch in NANC Neuronen oder Cajal Zellen eine wichtige Funktion. Da in den cGKI<sup>smko</sup> Mäusen das cGKI Gen in diesen Zellen wahrscheinlich noch intakt war, wäre das Auftreten eines funktionellen Defektes auch nicht zu erwarten.

#### 4.3.4 Die Rolle der cGKI für die Entwicklung der Atherosklerose

Das im Endothel von Gefäßen durch die eNOS gebildete NO scheint ein wichtiges vaskuloprotektives Molekül zu sein (1.4). Es soll eine Rolle bei der Verminderung des oxidativen Stresses, bei Entzündungsreaktionen, der Zellproliferation und Blutplättchenaggregation spielen. Man geht davon aus, dass eine gestörte endotheliale NO-Synthese zu Spasmen der vaskulären glatten Muskulatur und zu intravaskulärer Thrombenbildung führt und dadurch kardiale Ischämie und Myokardinfarkt ausgelöst werden können. Ein erhöhter Blutdruck und Atherosklerose sind wichtige Ursachen für die Entstehung der ischämischen Herzkrankheit. In atherosklerotischen Gefäßen ist die Expression der eNOS reduziert (Oemar et al., 1998).

Die Bedeutung von NO für die Entwicklung der Atherosklerose wurde in mehreren Studien mit Hilfe von Apolipoprotein E-defizienten (*Apo E<sup>-/-</sup>*) Mäusen (2.1.3), die spontan atherosklerotische Läsionen bilden, untersucht. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen stehen zum Teil im Widerspruch zueinander.

Einerseits wurde gezeigt, dass die Hemmung oder das Fehlen der eNOS und damit die Verminderung der NO-Synthese im Gefäßendothel eine verstärkte Bildung atherosklerotischer Läsionen hervorruft (Knowles et al., 2000; Kauser et al., 2000; Kuhlencordt et al., 2001a). Für diesen Effekt könnte zumindest teilweise ein erhöhter Blutdruck in eNOS-defizienten Mäusen verantwortlich sein. Denn durch die Gabe von Enalapril, einem Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) – Hemmer, wurde sowohl der erhöhte Blutdruck als auch die verstärkte Bildung atherosklerotischer Plaques in eNOS-defizienten Mäusen normalisiert (Knowles et al., 2000). Ein erhöhter Blutdruck führt zu einer verstärkten Turbulenz und Dehnung der Arterienwände, wodurch die Entstehung von Läsionen begünstigt wird. Die potentiell atheroprotektive Funktion der eNOS wurde kürzlich in Frage gestellt, da eine Überexpression der eNOS in transgenen Mäusen eine gesteigerte Bildung atherosklerotischer Läsionen bewirkte (Ozaki et al., 2002). Nach Inaktivierung der iNOS war die Bildung von Läsionen unbeeinflusst (Knowles et al., 2000) oder sogar reduziert (Detmers et al., 2000; Kuhlencordt et al., 2001b). Interessanterweise ist der Blutdruck der iNOS Knockout Mäuse normal (Knowles et al., 2000). Insgesamt weisen die Studien mit NOS-transgenen Mäusen darauf hin, dass NO wahrscheinlich abhängig von Ort und Menge seiner Bildung und über verschiedene Signalwege die Progression der Läsionen sowohl hemmen als auch fördern kann.

NO könnte über die Aktivierung der sGC und cGKI die Entstehung der Atherosklerose beeinflussen. Zahlreiche *in vitro*-Studien weisen darauf hin, dass

cGMP (möglicherweise über die cGKI) die Proliferation von VSMCs hemmen kann und damit atheroprotektiv wirken könnte (Sarkar und Webb, 1998). Die Funktion der cGKI bei der Bildung atherosklerotischer Läsionen kann in *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäusen aufgrund ihrer geringen Lebenserwartung nicht untersucht werden. Eine Alternative bieten die Tamoxifen-induzierbaren, Glattmuskel-spezifischen cGKI-defizienten Mäuse (*cGKI*<sup>smko</sup>). Die Verabreichung von Tamoxifen an diese Mäuse führte in ca. 55% der VSMCs der Aorta zu einer Deletion der cGKI (**Abb. 3.19**). Dieses Tiermodell wurde mit einem Mausmodell für Atherosklerose, den Apo E-defizienten Mäusen (Zhang et al., 1992) kombiniert. Zur Beschleunigung der Plaqueentwicklung wurden die Tiere mit einer Fett- und Cholesterin-reichen Diät gefüttert. Überraschenderweise war in cGKI Mutanten nach 16-wöchiger Fütterung die Größe der Plaques im gesamten Aortenbogen als auch in den drei abgehenden Gefäßen (Truncus brachiocephalicus, Arteria carotis communis sinistra, A. subclavia sinistra) signifikant geringer als in den Kontrolltieren (**Abb. 3.22**). Dies bedeutet, dass die cGKI der VSMCs die Atherogenese beschleunigt und möglicherweise die pro-atherosklerotische Wirkung von NO vermittelt. Dagegen scheint die cGKI an den atheroprotektiven Effekten von NO nicht beteiligt zu sein.

Es stellt sich nun die Frage, über welchen Mechanismus die cGKI der VSMCs die Atherosklerose fördert. Ein Einfluss der cGKI auf die Bildung von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1) konnte durch immunhistologische Färbungen nur schwer beurteilt werden, da die verwendeten Antiseren eine starke Hintergrundfärbung aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Eine Veränderung der Zusammensetzung und Konzentration der Lipide im Serum kann sich direkt auf die Bildung atherosklerotischer Plaques auswirken. Da sich die Plasmalipoproteinprofile von Kontrollmäusen und konditionalen cGKI Mutanten nicht unterschieden (**Tab. 3.1 A**), kann man davon ausgehen, dass die aufgetretenen Unterschiede in den Flächen der Läsionen auf andere Ursachen zurückzuführen sind. *cGKI*<sup>smko</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren keinen erhöhten Blutdruck (Dr. Susanne Feil; **Tab. 3.1 C**). Ein Einfluss von Blutdruckunterschieden zwischen den Versuchsgruppen auf die Größe der entstandenen Läsionen ist also auszuschließen. Schließlich wurde bei keinem der untersuchten Tiere eine Schädigung der Nieren beobachtet, und das Verhältnis von Nieren- und Herzgewicht zum Körpergewicht der Tiere beider Genotypen war gleich (**Tab. 3.1 B**). Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass sowohl NO als auch cGMP die Proliferation von VSMCs *in vitro* fördern können (Hassid et al., 1994; Quinlan et al., 2000). In den Aortenbögen von Kontroll- und konditionalen Knockout Mäusen waren hauptsächlich Läsionen der Stadien I und II zu finden, wobei der Anteil der fortgeschritteneren Plaques bei den Kontrolltieren höher lag (Daten nicht gezeigt). Die immunhistologische Analyse

der Plaques belegt, dass der überwiegende Teil der cGKI-positiven glatten Muskelzellen unterhalb eines entstandenen Plaques gleichzeitig auch den Proliferationsmarker PCNA bildete (**Abb. 3.24**). In Kontrollmäusen war der Anteil der cGKI-positiven als auch der cGKI- und PCNA-positiven glatten Muskelzellen ca. 3-mal höher als in den konditionalen cGKI Mutanten. Die cGKI scheint also die Proliferation der VSMCs in den atherosklerotischen Plaques zu fördern und dadurch eine Verstärkung der Atherosklerose zu bewirken.

Da Tamoxifen die Plaque-Entwicklung beeinflussen könnte (vgl. Reckless et al., 1997), wurden alle Versuchstiere (konditionale Mutanten und Kontrollmäuse) mit Tamoxifen behandelt.

#### 4.4 Zukunftsperspektive

Mit Hilfe der konditionalen cGKI Mausmutanten war es möglich, eine Reihe von Problemen zu umgehen, die sich bei der Verwendung von cGKI Inhibitoren oder der Untersuchung von Mausmutanten mit einer globalen cGKI Defizienz ergeben. In dieser Arbeit wurden erstmals verschiedene Funktionen des cGKI Proteins aufgeklärt, deren Untersuchung aufgrund der geringen Lebenserwartung oder des multiplen Phänotyps der *cGKI*<sup>-/-</sup> Tiere vorher kaum möglich war. Es sind allerdings noch einige Fragen offen, die sich aus den erhaltenen Befunden ergeben.

Die Analyse der Hippocampus- und Purkinje Zell-spezifischen cGKI-Mutanten hat gezeigt, dass die cGKI an bestimmtem Formen der synaptischen Plastizität im ZNS und des Lernens beteiligt ist. Es wäre nun wichtig, die molekularen Wirkmechanismen aufzuklären, über welche die cGKI die LTP und LTD und letztendlich das Verhalten beeinflusst.

Mit Hilfe der Herzmuskel-spezifischen cGKI Knockout Mäuse konnte hier gezeigt werden, dass die cGKI der Kardiomyozyten den negativ inotropen Effekt von cGMP vermittelt. Die physiologische bzw. pathophysiologische Funktion der cGKI im Herzen ist jedoch noch völlig unklar und könnte nun mit Hilfe dieser Mutanten in verschiedenen Modellen (Herzinsuffizienz, Herzinfarkt) untersucht werden.

Es wäre sehr interessant den Signaltransduktionsmechanismus, der für die Relaxation der glatten Muskulatur im Magen-Darm-Trakt verantwortlich ist, genauer zu untersuchen. Bis jetzt konnte lediglich beobachtet werden, dass die fast vollständige Deletion der cGKI in den glatten Muskelzellen nur geringen Einfluss auf die gastrointestinale Motilität hat. Die Analyse der Relaxation der Darmmuskulatur von cGKI<sup>smko</sup> Mäusen wird zur Zeit vorgenommen. Das Fehlen

der cGKI alleine in glatten Muskelzellen scheint nicht die Todesursache bei cGKI-defizienten Mäusen zu sein. Die Autopsie der cGKI<sup>-/-</sup> Tiere bestärkt die Vermutung, dass Entzündungsprozesse beim Tod der Mutanten eine Rolle spielen könnten. Die konditionale Deletion der cGKI in verschiedenen Zelltypen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, könnte hier über die Funktion der cGKI Aufschluss geben. Die Immunfärbung der atherosklerotischen Läsionen zeigte, dass die cGKI in den eingewanderten Makrophagen stark exprimiert wird (**Abb. 3.24**). Die Untersuchung Makrophagen-spezifischer cGKI Knockout Mäuse könnte demnach neue Ergebnisse zur Rolle der cGKI bei Entzündungsreaktionen liefern.

Die Untersuchungen der Tamoxifen-induzierbaren, Glattmuskel-spezifischen cGKI-defizienten Mäuse wiesen darauf hin, dass die cGKI in glatten Gefäßmuskelzellen möglicherweise einen Atherosklerose-fördernden Effekt hat. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine weitere konditional cGKI-defiziente Mausmutante auf Apo E-defizientem Hintergrund generiert und wird zu Zeit analysiert. Zur Deletion des cGKI Gens wurde hier eine andere Glattmuskel-spezifische Cre Mauslinie verwendet, welche die Cre Rekombinase in über 90% der VSMCs exprimiert. Erste Ergebnisse bestätigen auch in diesem Modell den Befund, dass die cGKI die Entwicklung der Atherosklerose fördert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wäre es sicherlich sehr interessant, die Funktion der cGKI für die Proliferation von VSMCs genauer zu untersuchen, um dadurch die molekularen Wirkmechanismen der cGKI in VSMCs aufzuklären. Die Tatsache, dass NO sowohl antiatherogene als auch atherogene Wirkungen hat, könnte erklären, warum es durch Gabe von NO-freisetzenden Pharmaka bei Patienten, die an Atherosklerose leiden, zu keiner Verbesserung des Krankheitsbildes kommt. Vielleicht wäre die Entwicklung von cGKI-hemmenden Medikamenten eine Möglichkeit zur gezielten Therapie der Atherosklerose.

Die genaue Todesursache der cGKI<sup>-/-</sup> Mäuse ist nach wie vor offen und könnte durch die Analyse weiterer konditional cGKI-defizienter Mauslinien aufgeklärt werden. Aufgrund der bis jetzt vorliegenden Ergebnisse mit verschiedenen konditional cGKI-defizienten Mäusen kann man vermuten, dass ein cGKI Verlust möglicherweise gleichzeitig in mehreren Geweben oder Zelltypen auftreten muss, damit ein ähnlich schwerwiegender Phänotyp wie bei konventionellen cGKI Knockout Mäusen auftritt.

## 5 Zusammenfassung

Das gasförmige Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) ist an der Steuerung vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt. NO kann über verschiedene molekulare Signalwege wirken. Zahlreiche *in vitro*-Studien weisen darauf hin, dass viele Effekte von NO auf das ZNS und das kardiovaskuläre System über die NO-induzierte Synthese des „second Messengers“ cGMP und eine nachfolgende Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein Kinase Typ I (cGKI) vermittelt werden. Um die *in vivo*-Funktion der cGKI aufzuklären, wurden bereits konventionelle cGKI Knockout Mäuse generiert, in denen das cGKI Gen bereits während der Embryonalentwicklung in allen Zellen zerstört ist. Die Analyse dieser cGKI Nullmutanten zeigte, dass NO über die cGKI zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und Hemmung der Thrombozyten-Aggregation führt. Da diese Nullmutanten einen multiplen Phänotyp und eine geringe Lebenserwartung (ca. 3 bis 6 Wochen) aufweisen, können bestimmte Fragestellungen mit diesen Tieren nicht untersucht werden. Beispielsweise ist völlig unklar, welche Rolle die cGKI im ZNS (z.B. für synaptische Plastizität und Lernen), im Herz (z.B. für die Kontraktilität) und im Gefäßsystem (z.B. bei der Atherosklerose) spielt. Die Probleme, die sich aus der „chronischen“ Deletion des cGKI Gens ergeben, könnten durch die Methode der konditionalen somatischen Mutagenese unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems umgangen werden. Diese Technik ermöglicht es, ein Gen Zeit- und Gewebe-spezifisch auszuschalten. Damit könnte man den schwerwiegenden Phänotyp der konventionellen cGKI Nullmutanten umgehen und die Funktion der cGKI in spezifischen Zelltypen untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es, konditional cGKI-defiziente Mäuse zu generieren, die cGKI Expression in diesen Tieren zu analysieren und deren Phänotyp zu charakterisieren. In dieser Arbeit sind vier konditional cGKI-defiziente Mausmutanten beschrieben:

- ♦ Hippocampus-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>hko</sup>)
- ♦ Purkinje Zell-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>pkko</sup>)
- ♦ Herzmuskel-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>cko</sup>)
- ♦ Glattmuskel-spezifische und Tamoxifen-induzierbare cGKI-defiziente Mäuse (cGKI<sup>smko</sup>)

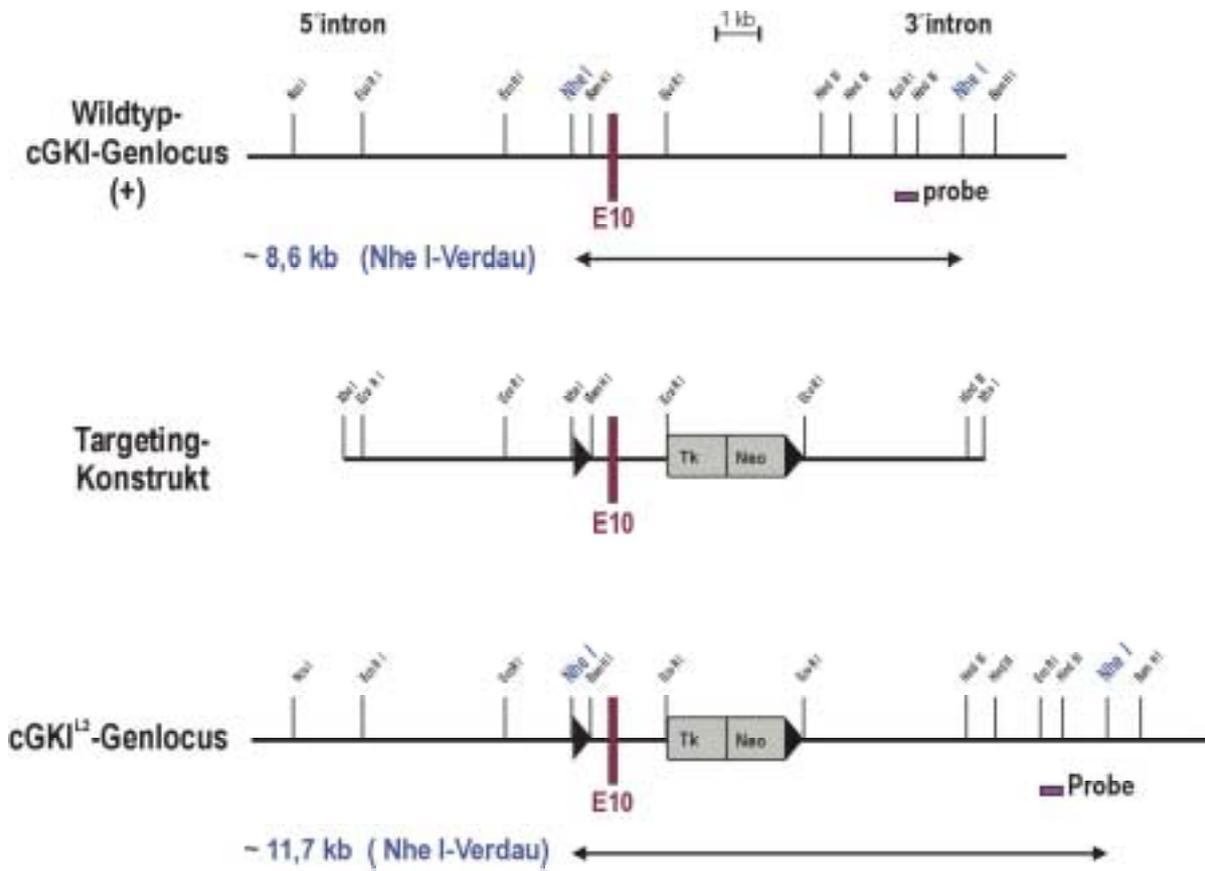
Diese konditionalen Knockout Mäuse zeigten einen selektiven Verlust der cGKI im jeweils gewünschten Gewebe bzw. Zelltyp, d.h. im Hippocampus bzw. in den Purkinje Zellen des Kleinhirns, in Kardiomyozyten oder in der viszeralen und vaskulären glatten Muskulatur. Der schwerwiegende Phänotyp und die geringe Lebenserwartung der konventionellen cGKI Nullmutanten war in keiner der konditional cGKI-defizienten Mausmutanten ausgeprägt. Dadurch konnten erstmals Gewebe-spezifische Funktionen der cGKI in erwachsenen Mäusen untersucht werden. Die phänotypische Charakterisierung der konditionalen cGKI Mutanten ergab folgende Befunde: Die cGKI ist beteiligt an

- ♦ der Induktion der Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus,
- ♦ der Induktion der Langzeitdepression (LTD) in den Purkinje Zellen des Kleinhirns und am Erlernen bestimmter Bewegungsabläufe,
- ♦ der Verminderung der Herzkontraktilität durch cGMP,
- ♦ der Entstehung der Atherosklerose, möglicherweise indem die cGKI die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen fördert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die cGKI and der Regulation wichtiger physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt ist. Die pharmakologische Beeinflussung der cGKI Aktivität wäre ein vielversprechender Ansatz zur Therapie der Atherosklerose, einer der wichtigsten Erkrankungen des Menschen.

## 6 Anhang

### 6.1 „Targeting“ Strategie



Mauslinie	Promotor		Expression der Cre Rekombinase	Verwendung	genetischer Hintergrund	Referenz
<b>CMV-Cre</b>	CMV	tg	in vielen Geweben (ubiquitär)	Erzeugung eines keimbahngängigen cGKI Knockout Allels (L-)	gemischt	Dupé et al., 1997
<b>L7-Cre</b>	L7/pcp2	tg	vor allem in Purkinje Zellen des Kleinhirns	Purkinje Zell-spezifische cGKI Knockout (cGKI <sup>pkö</sup> ) Mäuse	C57Bl/6	Barski et al., 2000
<b>MLC2a-Cre</b>	MLC2a	tg	vor allem in Herzmuskelzellen	Herzmuskel-spezifische cGKI Knockout (cGKI <sup>ckö</sup> ) Mäuse	gemischt	Kenneth R. Chien, La Jolla, USA
<b>NEX-Cre</b>	NEX	ki	vor allem in Pyramidenzellen der CA1-CA3 Region des Hippocampus	Hippocampus-spezifische cGKI Knockout (cGKI <sup>hkö</sup> ) Mäuse	gemischt	Schwab et al., 1999
<b>SM-KI</b>	SM22	ki	in viszeralen und vaskulären glatten Muskelzellen; Tamoxifen-aktivierbare Cre	Tamoxifen-induzierbare Glattmuskel-spezifische cGKI Knockout (cGKI <sup>smkö</sup> ) Mäuse	gemischt	Kühbandner et al., 2000

tg: Transgen      ki: Knockin

### 6.3 Verwendete Oligonukleotide

Primer	Gen / Bindungsstelle <sup>a</sup>	Sequenz in 5`-3`-Richtung
796	cGKI Exon 7 v	GTGAATGTTACTCGAGAAGACT
1248	cGKI Exon 11 r	CAGCTCTACTCGTCCGAAACC
RF49	cGKI Intron 10 r	GTCTTTGCTGCTGTTTCAGGTT
RF53	cGKI Intron 10 v	CCTGGCTGTGATTTCACTCCA
RF67	SM22 Intron 1v	CTCAGAGTGGAAGGCCTGCTT
RF90	SM22 Exon 2 r	CACAACATTCTTCAGCCACA
RF91	cGKI Exon 10 r	GAAGGCAGCTTCGGCTTCAT
RF112	NEX-Cre v	TCTTTTTTCATGTGCTCTTGG
RF113	NEX-Cre wt r	AGTATGTGGAGTAGGGTGAC
RF114	NEX-Cre ki r	CCGCATAACCAGTGAAACAG
RF115	Apo E v	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG
RF116	Apo E wt r	TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC
RF117	Apo E ko r	GCCGCCCCGACTGCATCT
RF118	cGKI Intron 11 r	AAATTATAACTTGTCAAATTCTTG
RF122	cGKI Intron 10 v	CGACACCCCCACTTGTCT
RF125	cGKI Intron 10 r	GTCAAGTGACCACTATG
SC135	Cre r	GGCGATCCCTGAACATGTCC
TK140	Cre v	ATCCGAAAAGAAAACGTTGA
TK142	Cre r	ATCCAGGTTACGGATATAGT

<sup>a</sup> ki = Knockin; ko = Knockout; r = rückwärts; v = vorwärts; wt = Wildtyp

### 6.4 Für die Genotypisierung verwendete Oligonukleotide

Mauslinie	Primer	detektiertes Allel	Größe des Amplifikats
Apo E	RF115 + RF117	-	245 bp
	RF115+ RF116	+	155 bp
cGKI	RF118 + RF122	L-	228 bp
	RF49 + RF122	L2	178 bp
	RF49 + RF122	+	124 bp
cGKI	RF53 + RF118	L-	250 bp
	RF53 + RF125	L2	338 bp
	RF53 + RF125	+	284 bp
CMV-Cre, L7-Cre, MLC2a-Cre	TK140 + TK142	tg	~ 630 bp
Nex-Cre	RF112 + RF114	-	503 bp
	RF112 + RF113	+	740 bp
SM-KI	RF67 + SC135	-	~ 220 kb
	RF67 + RF90	+	~ 300 kb

## 6.5 Für die Western Blot Analyse verwendete primäre Antikörper

Antigen	primärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Referenz
<b>cGKI</b>	cGKIcommon	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Keilbach et al., 1992
<b>MAPK</b>	p44/42 MAP Kinase (Erk1/Erk2)	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signaling #9102

## 6.6 Für immunhistologische Färbungen verwendete primäre Antikörper

Antigen	primärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Referenz
<b>CD68</b>	CD68 (gg. C-Terminus)	polyklonal, Ziege	1:50	Santa Cruz (M-20; sc-7084)
<b>cGKI</b>	cGKIcommon	polyklonal, Kaninchen	1:50	Keilbach et al., 1992
<b>eNOS</b>	NOS 3 (gg. C-Terminus)	polyklonal, Kaninchen	1:100	Santa Cruz (C-20; sc-654)
<b>ICAM-1</b>	ICAM-1 (CD 54) (gg. C-Term.)	polyklonal, Ziege	1:25	Santa Cruz (M-19; sc-1511)
<b>iNOS</b>	NOS 2 (gg. N-Term.)	polyklonal, Kaninchen	1:50	Santa Cruz (N-20; sc-651)
<b>PCNA</b>	PCNA	polyklonal, Kaninchen	1:50	Santa Cruz (FI-261; sc-7907)
<b>SM-<math>\alpha</math>-aktin</b>	Anti- $\alpha$ -smooth muscle actin, Clone 1A4	monoklonal, Maus	1:2000 bis 1:5000	Sigma (A 2547)
<b>VCAM-1</b>	VCAM-1 (gg. C-Term.)	polyklonal, Ziege	1:10	Santa Cruz (C-19; sc-1504)
<b>VCAM-1</b>	VCAM-1	polyklonal, Kaninchen	1:50	Santa Cruz (H-276)

## 6.7 Verwendete sekundäre Antikörper

primärer Antikörper	sekundärer Antikörper	Detektion	Farbe
<b>Western Blot:</b>			
<b>cGKI common MAPK</b>	Anti-rabbit-IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate (A-8025; Sigma); 1:15000	(Alkalische Phosphatase-gekoppelt) +BCIP/NBT	blau
<b>Immunfärbungen:</b>			
<b>cGKI common PCNA</b>	biotinylierter sekundärer anti-rabbit-Antikörper (BA-1000; Vector)*	ABC-POD (Peroxidase-gekoppelt; PK-6100; Vector)* + DAB	rotbraun
<b>CD68</b>	biotinylierter sekundärer anti-goat-Antikörper (BA-9500; Vector)*	ABC-POD (Peroxidase-gekoppelt; PK-6100; Vector)* + DAB	rotbraun
<b>cGKI eNOS iNOS VCAM 1</b>	biotinylierter sekundärer anti-rabbit-Antikörper (BA-1000; Vector)*	ABC-AP (Alkalische Phosphatase-gekoppelt; AK-5000; Vector) + Vektor Blue*	blau
<b>ICAM 1 VCAM 1</b>	biotinylierter sekundärer anti-goat-Antikörper (BA-9500; Vector)*	ABC-AP (Alkalische Phosphatase-gekoppelt; AK-5000; Vector) + Vector Blue*	blau
<b>SM-<math>\alpha</math>-aktin</b>	biotinylierter sekundärer anti-mouse-Antikörper (BA-2000; Vector)*	ABC-AP (Alkalische Phosphatase-gekoppelt; AK-5000; Vector) + Vector Blue*	blau
<b>SM-<math>\alpha</math>-aktin</b>	biotinylierter sekundärer anti-mouse-Antikörper (MOM,PK-2200; Vector)*	ABC-AP (Alkalische Phosphatase-gekoppelt; AK-5000; Vector) + Vector Blue*	blau
* Verdünnung nach Angaben des Herstellers			

## 6.8 Einfluß von Tamoxifen auf die Bildung atherosklerotischer Plaques

Dauer der Fütterung (Alter) (in Wochen)	<i>Apo E<sup>-/-</sup></i>				
	Geschlecht	ohne Tamoxifenbehandlung		2x 5 Tage 1 mg Tamoxifen, i.p.	
		Anzahl	Plaques	Anzahl	Plaques
14	♀	2	++	2	++
(19)	♂	3	++	2	++
18	♀	3	+++	2	+++
(23)	♂	4	+++	2	+++

Dauer der Fütterung (Alter) (in Wochen)	<i>Apo E<sup>+/-</sup></i>				
	Geschlecht	ohne Tamoxifenbehandlung		2x 5 Tage 1 mg Tamoxifen, i.p.	
		Anzahl	Plaques	Anzahl	Plaques
14	♀	2	/	2	/
(19)	♂	4	/	2	/
18	♀	2	/	2	/
(23)	♂	4	/	2	/

## 7 Literaturverzeichnis

### 7.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Aiba, A., Kano, M., Chen, C., Stanton, M. E., Fox, G. D., Herrup, K., Zwingman, T. A. and Tonegawa, S. (1994) Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 377-88.
- Ajima, A. and Ito, M. (1995) A unique role of protein phosphatases in cerebellar long-term depression. *Neuroreport* **6**, 297-300.
- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M. and Berns, A. (1997) Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1766-73.
- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. and Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* **273**, 32950-6.
- Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J. and Vassalli, P. (1995) Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 160-4.
- Arancio, O., Kandel, E. R. and Hawkins, R. D. (1995) Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* **376**, 74-80.
- Aswad, D. W. and Greengard, P. (1981) A specific substrate from rabbit cerebellum for guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. II. Kinetic studies on its phosphorylation by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **256**, 3494-500.
- Barski, J. J., Dethleffsen, K. and Meyer, M. (2000) Cre recombinase expression in cerebellar Purkinje cells. *Genesis* **28**, 93-8.
- Baumner, D. and Nawrath, H. (1995) Effects of inhibitors of cGMP-dependent protein kinase in atrial heart and aortic smooth muscle from rats. *Eur J Pharmacol* **273**, 295-8.
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 151-71.
- Bliss, T. V. and Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-9.
- Blokland, A., de Vente, J., Prickaerts, J., Honig, W., Markerink-van Ittersum, M. and Steinbusch, H. (1999) Local inhibition of hippocampal nitric oxide synthase does not impair place learning in the Morris water escape task in rats. *Eur J Neurosci* **11**, 223-32.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bradley, J., Zhang, Y., Bakin, R., Lester, H. A., Ronnett, G. V. and Zinn, K. (1997) Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J Neurosci* **17**, 1993-2005.
- Braun, M., Pietsch, P., Schror, K., Baumann, G. and Felix, S. B. (1999) Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **41**, 395-401.
- Breslow, J. L. (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science* **272**, 685-8.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P. and Metzger, D. (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14559-63.

- Burns, A. J., Lomax, A. E., Torihashi, S., Sanders, K. M. and Ward, S. M. (1996) Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12008-13.
- Capecchi, M. R. (1994) Targeted gene replacement. *Sci Am* **270**, 52-9.
- Carey, M. and Lisberger, S. (2002) Embarrassed, but not depressed: eye opening lessons for cerebellar learning. *Neuron* **35**, 223-6.
- Carter, P. A., Garland, T., Jr., Dohm, M. R. and Hayes, J. P. (1999) Genetic variation and correlations between genotype and locomotor physiology in outbred laboratory house mice (*Mus domesticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **123**, 155-62.
- Chao, D. S., Silvagno, F., Xia, H., Cornwell, T. L., Lincoln, T. M. and Bretz, D. S. (1997) Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* **76**, 665-72.
- Chen, C. and Tonegawa, S. (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* **20**, 157-84.
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K. and McMahon, A. P. (1998) Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* **8**, 1323-6.
- De Zeeuw, C. I., Hansel, C., Bian, F., Koekkoek, S. K., van Alphen, A. M., Linden, D. J. and Oberdick, J. (1998) Expression of a protein kinase C inhibitor in Purkinje cells blocks cerebellar LTD and adaptation of the vestibulo-ocular reflex. *Neuron* **20**, 495-508.
- Desai, K. M., Sessa, W. C. and Vane, J. R. (1991) Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* **351**, 477-9.
- Detmers, P. A., Hernandez, M., Mudgett, J., Hassing, H., Burton, C., Mundt, S., Chun, S., Fletcher, D., Card, D. J., Lisnock, J., Weikel, R., Bergstrom, J. D., Shevell, D. E., Hermanowski-Vosatka, A., Sparrow, C. P., Chao, Y. S., Rader, D. J., Wright, S. D. and Pure, E. (2000) Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* **165**, 3430-5.
- Draijer, R., Vaandrager, A. B., Nolte, C., de Jonge, H. R., Walter, U. and van Hinsbergh, V. W. (1995) Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res* **77**, 897-905.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P. and Rijli, F. M. (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**, 399-410.
- Endo, S., Suzuki, M., Sumi, M., Nairn, A. C., Morita, R., Yamakawa, K., Greengard, P. and Ito, M. (1999) Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the cGMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2467-72.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D. and Chambon, P. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10887-90.
- Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C. R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S. and Hofmann, F. (2002) Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res* **90**, 1080-6.
- Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B. and Keef, K. D. (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem* **274**, 10927-35.
- Furchgott, R. F. and Vanhoutte, P. M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* **3**, 2007-18.
- Garbers, D. L. and Lowe, D. G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* **269**, 30741-4.

- Gu, H., Zou, Y. R. and Rajewsky, K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-64.
- Hall, K. U., Collins, S. P., Gamm, D. M., Massa, E., DePaoli-Roach, A. A. and Uhler, M. D. (1999) Phosphorylation-dependent inhibition of protein phosphatase-1 by G-substrate. A Purkinje cell substrate of the cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 3485-95.
- Han, X., Kubota, I., Feron, O., Opel, D. J., Arstall, M. A., Zhao, Y.Y., Huang, P., Fishman, M. C., Michel, T. and Kelly, R. A. (1998) Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte ICa-L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 6510-5.
- Hassid, A., Arabshahi, H., Bourcier, T., Dhaunsi, G. S. and Matthews, C. (1994) Nitric oxide selectively amplifies FGF-2-induced mitogenesis in primary rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* **267**, H1040-8.
- Haug, L. S., Jensen, V., Hvalby, O., Walaas, S. I. and Ostvold, A. C. (1999) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J Biol Chem* **274**, 7467-73.
- Hofmann, F., Ammendola, A. and Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **113** ( Pt 10), 1671-6.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. and Ruth, P. (1992) Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* **1135**, 51-60.
- Hofmann, F. and Sold, G. (1972) A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3':5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **49**, 1100-7.
- Huang, E. P. (1997) Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP. *Curr Biol* **7**, R141-3.
- Ito, M. (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* **81**, 1143-95.
- Jaenisch, R. (1988) Transgenic animals. *Science* **240**, 1468-74.
- Jarrard, L. E. (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* **60**, 9-26.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G. and Hansson, G. K. (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* **6**, 131-8.
- Joyce, N. C., DeCamilli, P., Lohmann, S. M. and Walter, U. (1986) cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* **11**, 191-8.
- Kausar, K., da Cunha, V., Fitch, R., Mallari, C. and Rubanyi, G. M. (2000) Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1679-85.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem* **208**, 467-73.
- Kirkwood, A., Silva, A. and Bear, M. F. (1997) Age-dependent decrease of synaptic plasticity in the neocortex of alphaCaMKII mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3380-3.
- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R. and Hofmann, F. (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci* **19**, 48-55.
- Knowles, J. W., Reddick, R. L., Jennette, J. C., Shesely, E. G., Smithies, O. and Maeda, N. (2000) Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* **105**, 451-8.

- Komalavilas, P. and Lincoln, T. M. (1996) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* **271**, 21933-8.
- Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F. and Feil, R. (2000) Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis* **28**, 15-22.
- Kuhlencordt, P. J., Chen, J., Han, F., Astern, J. and Huang, P. L. (2001b) Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* **103**, 3099-104.
- Kuhlencordt, P. J., Gyurko, R., Han, F., Scherrer-Crosbie, M., Aretz, T. H., Hajjar, R., Picard, M. H. and Huang, P. L. (2001a) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* **104**, 448-54.
- Kumar, R., Joyner, R. W., Komalavilas, P. and Lincoln, T. M. (1999) Analysis of expression of cGMP-dependent protein kinase in rabbit heart cells. *J Pharmacol Exp Ther* **291**, 967-75.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. and Westphal, H. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6232-6.
- Lalonde, R., Filali, M., Bensoula, A. N. and Lestienne, F. (1996) Sensorimotor learning in three cerebellar mutant mice. *Neurobiol Learn Mem.* **65**, 113-20.
- Leinders-Zufall, T., Rosenboom, H., Barnstable, C. J., Shepherd, G. M. and Zufall, F. (1995) A calcium-permeable cGMP-activated cation conductance in hippocampal neurons. *Neuroreport* **6**, 1761-5.
- Lev-Ram, V., Jiang, T., Wood, J., Lawrence, D. S. and Tsien, R. Y. (1997) Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca<sup>2+</sup> in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron* **18**, 1025-38.
- Lloyd-Jones, D. M. and Bloch, K. D. (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* **47**, 365-75.
- Lohmann, S. M., Walter, U., Miller, P. E., Greengard, P. and De Camilli, P. (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 653-7.
- Loscalzo, J. and Welch, G. (1995) Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* **38**, 87-104.
- Lu, Y. F., Kandel, E. R. and Hawkins, R. D. (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* **19**, 10250-61.
- Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-41.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. and Hofmann, F. (1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* **189**, 1255-64.
- Mauk, M. D. (1997) Roles of cerebellar cortex and nuclei in motor learning: contradictions or clues? *Neuron* **18**, 343-6.
- Mery, P. F., Lohmann, S. M., Walter, U. and Fischmeister, R. (1991) Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1197-201.
- Metzger, D. and Feil, R. (1999) Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 470-6.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Nagy, A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**, 99-109.

- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. and Ross, R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* **14**, 133-40.
- Oberdick, J., Smeyne, R. J., Mann, J. R., Zackson, S. and Morgan, J. I. (1990) A promoter that drives transgene expression in cerebellar Purkinje and retinal bipolar neurons. *Science* **248**, 223-6.
- Oemar, B. S., Tschudi, M. R., Godoy, N., Brovkovich, V., Malinski, T. and Luscher, T. F. (1998) Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* **97**, 2494-8.
- Orban, P. C., Chui, D. and Marth, J. D. (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6861-5.
- Ozaki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Hirase, T., Namiki, M., Inoue, N., Hirata, K., Yasui, H., Sakurai, H., Yoshida, Y., Masada, M. and Yokoyama, M. (2002) Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* **110**, 331-40.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-6.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. and Hofmann, F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* **17**, 3045-51.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 105-49.
- Pryzwansky, K. B., Kidao, S., Wyatt, T. A., Reed, W. and Lincoln, T. M. (1995) Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* **57**, 670-8.
- Qian, Y., Chao, D. S., Santillano, D. R., Cornwell, T. L., Nairn, A. C., Greengard, P., Lincoln, T. M. and Bredt, D. S. (1996) cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci* **16**, 3130-8.
- Quinlan, T. R., Li, D., Laubach, V. E., Shesely, E. G., Zhou, N. and Johns, R. A. (2000) eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L641-50.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J. and Schwenk, F. (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* **98**, 600-3.
- Reckless, J., Metcalfe, J. C. and Grainger, D. J. (1997) Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* **95**, 1542-8.
- Reddick, R. L., Zhang, S. H. and Maeda, N. (1994) Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* **14**, 141-7.
- Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-9.
- Ruth, P., Wang, G. X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. and Hofmann, F. (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2623-7.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sarkar, R. and Webb, R. C. (1998) Does nitric oxide regulate smooth muscle cell proliferation? A critical appraisal. *J Vasc Res* **35**, 135-42.
- Schlichter, D. J., Casnellie, J. E. and Greengard, P. (1978) An endogenous substrate for cGMP-dependent protein kinase in mammalian cerebellum. *Nature* **273**, 61-2.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. and Ruth, P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* **404**, 197-201.
- Schuman, E. M., Meffert, M. K., Schulman, H. and Madison, D. V. (1994) An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11958-62.
- Schwab, M. H., Bartholomae, A., Heimrich, B., Feldmeyer, D., Druffel-Augustin, S., Goebbels, S., Naya, F. J., Zhao, S., Frotscher, M., Tsai, M. J. and Nave, K. A. (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* **20**, 3714-24.
- Shah, A. M. (1995) Decreased myocardial contractility after damage to endocardial endothelium is caused mainly by loss of endothelin production. *Cardiovasc Res* **30**, 644-5.
- Shibuki, K. and Okada, D. (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* **349**, 326-8.
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* **522 Pt 2**, 177-85.
- Son, H., Hawkins, R. D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P. L., Fishman, M. C. and Kandel, E. R. (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* **87**, 1015-23.
- Sonnenburg, W. K. and Beavo, J. A. (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol* **26**, 87-114.
- Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [letter]. *Nat Genet* **21**, 70-1.
- Sumii, K. and Sperelakis, N. (1995) cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Circ Res* **77**, 803-12.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M. and Mendelsohn, M. E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Science* **286**, 1583-7.
- Taniguchi, J., Furukawa, K. I. and Shigekawa, M. (1993) Maxi K<sup>+</sup> channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch* **423**, 167-72.
- Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G. and Sollott, S. J. (1999) Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* **84**, 1020-31.
- Waldmann, R., Bauer, S., Gobel, C., Hofmann, F., Jakobs, K. H. and Walter, U. (1986) Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur J Biochem* **158**, 203-10.
- Waseem, N. H. and Lane, D. P. (1990) Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* **96 ( Pt 1)**, 121-9.
- Woods, A. L., Hall, P. A., Shepherd, N. A., Hanby, A. M., Waseem, N. H., Lane, D. P. and Levison, D. A. (1991) The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* **19**, 21-7.

- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Burkey, B. and Maeda, N. (1994) Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* **94**, 937-45.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A. and Maeda, N. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258**, 468-71.
- Zhuo, M., Yinghe, H., Schultz, C., Kandel, E. R. and Hawkins, R. D. (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* **368**, 635-9.
- Zola-Morgan, S. and Squire, L. R. (1986) Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav Neurosci* **100**, 155-60.

## 7.2 Eigene Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. and Feil, R. (2002) cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res* **90**, 18-20.

### Abstracts

- Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Brummer, S., Feil, R. and Hofmann, F. (2000) Generation of mice allowing the conditional inactivation of the cGMP-dependent protein kinase I gene. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* 361 R69.
- Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Brummer, S., Feil, R. and Hofmann, F. (2000) Conditional inactivation of the gene encoding cGMP-dependent protein kinase type I. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **363** R51.
- Wolfsgruber, W., Allmann, R., Kuhbandner, S., Goebbels, S., Nave, K.A., Feil, R., Kleppisch, T. and Hofmann, F. (2002) Adult mice with a brain-specific deletion of the cGMP-dependent protein kinase I gene show reduced long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **365** R38.
- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. and Feil, R. (2002) Regulation of myocardial contractility by cGMP-dependent kinase I as revealed by conventional and conditional gene targeting. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **365** R91.

### Eingereichte Arbeiten

- Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Hofmann, F. and Feil, R. (2002) Smooth muscle cGKI promotes atherosclerosis in mice. submitted.
- Kleppisch, T., Wolfsgruber, W., Feil, S., Allmann, R., Wotjak, C., Goebbels, S., Nave, K.A., Hofmann, F. and Feil, R. (2002) Age-dependent impairment of long-term potentiation in mice with a hippocampus-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. submitted.
- Feil, R., Hartmann, J., Luo, C., Wolfsgruber, W., Schilling, K., Feil, S., Barski, J., Meyer, M., Konnerth, A., De Zeeuw, C. and Hofmann, F. (2002) Impairment of cerebellar LTD and learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. submitted.



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich herzlichst all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Franz Hofmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für sein stetes Interesse an meiner Arbeit. Zweifellos hat er durch seine Anregungen und Hilfe entscheidend zum Fortgang der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Martin Biel für die Übernahme der Berichterstattung vor der Fakultät.

Herrn Dr. Robert Feil für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung der Arbeit und seine fachliche Unterstützung.

Susi für die Einführung in die „Mauskunde“ und die tatkräftige Unterstützung im Tierstall. Sabine für die große Hilfe bei der Genotypisierung der Mäuse und bei allen übrigen anfallenden Arbeiten im Labor. Matthias, Thomas und Mark für die abwechslungsreichen musikalischen Beiträge. Claudia, Angela und den „Leuten aus dem 2. Stock“ für die Aufmunterungen im Laboralltag.

Frau Günther, Herrn Pavel und Herrn Sahina für die Betreuung der Mäuse im Tierstall.

Dr. K.A. Nave, Dr. J. Barski, Dr. M. Meyer und Dr. K.R. Chien für die Gewebespezifischen Cre Mauslinien. Dr. T. Kleppisch, R. Allmann, Dr. J. Hartmann, Dr. J.W. Wegener, Prof. Dr. C. de Zeeuw und Dr. C. Wotjak für die Zusammenarbeit bei der Analyse der Mäuse.

Herzlichen Dank auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Und ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Friedrich, Tilmann und Gernot bedanken für den Rückhalt, ihre Geduld und ihr Verständnis.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Wiebke Karen Wolfsgruber  
geboren am 08. Juni 1973 in Erlangen

## Schule

1980-1981 Adalbert-Stifter-Grundschule, Erlangen  
1981-1984 Grundschule Rockenhausen, Rockenhausen  
1984-1993 Wilhelm Erb-Gymnasium, Winnweiler  
mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

## Studium

Oktober 1993 Studium der Pharmazie an der Johannes Gutenberg-  
- April 1998 Universität in Mainz

April 1996	1. Staatsexamen
April 1998	2. Staatsexamen
Juni 1999	3. Staatsexamen

## Praktika

### **Famulatur**

März und Juli 1994 Schloß-Apotheke in Rockenhausen

### **Pharmazeutisches Praktikum**

Mai - Oktober 1998 Mohren-Apotheke in Mainz  
November 1998  
- April 1999 Kreiskrankenhaus Starnberg in Starnberg

## Wissenschaftliche Tätigkeit

seit Juli 1999 wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie der TU München  
bei Prof. Dr. Franz Hofmann