

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und
Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Angefertigt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der
Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Franz Hofmann

IRAG als funktionales Element der NO/cGMP Signalkaskade im Gastrointestinaltrakt

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von Petra Smital
aus München

München 2006

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Korreferent: Priv.- Doz. Dr. A. Höflich

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
2 Literaturteil	3
2.1 Darmphysiologie.....	3
2.1.1 Aufbau des Rumpfdarms	3
2.1.2 Magen-Darm-Motorik	4
2.1.3 Innervation des Gastrointestinaltrakts	5
2.1.4 Der Dünndarm	8
2.1.5 Das Colon	10
2.2 Grundlagen der Muskelkontraktion	11
2.2.1 Aufbau der Skelettmuskulatur	12
2.2.2 Aufbau der glatten Muskulatur.....	12
2.2.3 Kontraktiler Apparat der glatten Muskulatur.....	13
2.2.4 Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur	14
2.2.5 Mechanismen der Relaxation der glatten Muskulatur	18
2.3 NO/cGMP Signalweg	19
2.3.1 Bildung von NO.....	20
2.3.2 Bildung von cGMP	21
2.3.3 Rezeptoren von cGMP.....	22
2.3.4 cGMP-abhängige Proteinkinasen	23
2.3.5 Wirkungsmechanismen der cGMP-Kinasen.....	25
2.4 Identifizierung, Struktur und Funktion von IRAG	27
2.5 Ziele dieser Arbeit	29
3 Material und Methoden.....	30
3.1 Versuchstiere	30
3.2 Tierhaltung.....	30
3.3 Untersuchung der Darmpassage mit Bariumsulfat	31
3.4 Körpergewichtsentwicklung	32
3.5 Untersuchung der Stoffwechselfvorgänge	32
3.6 Kraftmessungen am glatten Muskel	32

3.6.1	Substanzen, Lösungen und Stammlösungen.....	33
3.6.2	Präparate	34
3.6.3	Versuchsablauf und Durchführung.....	36
3.7	Versuchsauswertung.....	38
3.8	Statistische Methoden.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Untersuchung physiologischer Parameter der IRAG ^{Δ12/Δ12} Mutante.....	39
4.1.1	Äußeres Erscheinungsbild	39
4.1.2	Sterblichkeit.....	40
4.1.3	Körpergewichtsentwicklung.....	41
4.1.4	Trinkwasserverbrauch und Harnabsatz.....	41
4.1.5	Futtermittelverbrauch und Kotabsatz.....	42
4.1.6	Untersuchung der Darmpassage mit Bariumsulfat.....	43
4.1.7	Eröffnung des Abdomens der IRAG ^{Δ12/Δ12} Maus.....	45
4.2	Funktionelle Analyse isolierter Darmmuskelpräparate	46
4.2.1	Spontanaktivität	46
4.2.2	Vergleich der Stimulus-induzierten Kontraktion.....	50
4.2.3	Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit CCh stimulierten Tonus des glatten Muskels des Darms.....	54
4.2.4	Effekt von 8-Br-cGMP auf mit Kalium Ionen stimulierten glatten Muskel des Darms	62
4.2.5	Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit Thapsigargin stimulierten glatten Muskel im Darm	67
5	Diskussion.....	70
5.1	Physiologische Bedeutung von IRAG	70
5.1.1	Maus-Mutanten mit einem Defekt im NO/cGMP/cGKI Signalweg	70
5.2	Physiologische Bedeutung von IRAG im Gastrointestinaltrakt.....	71
5.2.1	Regulation der Spontanaktivität unterschiedlicher Darmabschnitte.....	71
5.2.2	Effekt von IRAG auf die Relaxation des CCh stimulierten Darmmuskels	72
5.2.3	Effekt von IRAG auf die Relaxation des hormonunabhängig stimulierten Darmmuskels	74
6	Ausblick.....	78
7	Zusammenfassung	80

8	Summary	82
	Literaturverzeichnis	83
	Eigene Publikationen	83
	Zitierte Publikationen	83
	Danksagung	102
	Lebenslauf.....	103

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10^{-6})
ACE	Acetylcholinesterase
ACh	Acetylcholin
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BK _{Ca}	Calcium aktivierter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
cAK	cAMP abhängige Proteinkinase
CAP-Domänen	catabolite activator protein
CCh	Carbachol (Carbamyl Cholin)
CFTR	zystische Fibrose Transmembran-Leitfähigkeitsregulator
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGKI	cGMP-abhängigen Proteinkinase I
cGMP	Guanosinmonophosphat
CNG-Kanäle	Zyklische-Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle
COPD	chronische obstruktive Bronchitis
DAG	Diazylglyzerol
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ENS	enterisches Nervensystem
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GC	Guanylylcyclase
GTP	Guanosintriphosphat
ICC	interstitielle Zellen von Cajal
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPANs	intrinsische primäre afferente Neurone
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat
LGC	ligandengesteuerte Kanäle
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
min	Minute
MLC ₂₀	leichte Kette des Myosin

MLCK	Myosin leichte Ketten Kinase
MLCP	Myosin leichte Ketten Phosphatase
mV	Millivolt
MYPT1	regulatorische Untereinheit der MLCP
n.s.	nicht signifikant
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NANC-Neurone	Nicht adrenerge nicht cholinerge-Neurone
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
PACAP	Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Peptide
PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion
PDBu	Phorbol-13-acetat-12-myristat-13-acetat
PDE	Phosphodiesterase
pGC	partikuläre Guanylylcyclase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C β
RGS	Regulator of G-protein signalling
Rho	kleines GTP-bindendes Protein
rMLC	regulatorische MLC
rMLC-P	phosphorylierte regulatorische MLC
SEM	standard error of mean
SERCA	Sarkoendoplasmatische Reticulum Calcium ATPase
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SMOC	second-messenger gesteuerte Kanäle
SOC	store-operated channel
SOCE	store-operated calcium entry
SR	Sarkoplasmatisches Reticulum
TM	Transmembrandomäne
TRP	Transient Receptor Potential
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wandschichten des Magen-Darm-Trakts	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des diagonalen Netzwerkes der kontraktilelemente einer glatten Muskelzelle	13
Abbildung 3: Regulation der glatten Muskulatur über den Calcium-abhängigen und-unabhängigen Mechanismus	15
Abbildung 4: Zelluläre Synthesewege von cGMP	22
Abbildung 5: Schema für die cGKI-abhängige Relaxierung der glatten Muskulatur	27
Abbildung 6: Proteinstruktur von IRAG	28
Abbildung 7: Erscheinungsbild einer Wildtypmaus (A) und einer IRAG ^{Δ12/Δ12} Maus (B)	39
Abbildung 8: Mittlere Sterblichkeitsrate von Wildtyp-, heterozygoten IRAG ^{+Δ12} - und IRAG ^{Δ12/Δ12} Mäusen	40
Abbildung 9: Mittelwerte ± SEM der Körpergewichtsentwicklung von Wildtyp-, heterozygoten IRAG ^{+Δ12} - und IRAG ^{Δ12/Δ12} Mäusen	41
Abbildung 10: Mittelwerte ± SEM des Wasserverbrauches (A) und des Harnabsatzes (B) von Wildtyp- und IRAG ^{Δ12/Δ12} Mäusen	42
Abbildung 11: Mittelwerte ± SEM des Futtermittelsverbrauches (A) und des Kotabsatzes (B) von Wildtyp- und IRAG ^{Δ12/Δ12} Mäusen	43
Abbildung 12: Röntgenkontrastuntersuchung der Magen-Darm-Passage mit Bariumsulfat beispielhaft an je einer Wildtyp- und einer IRAG ^{Δ12/Δ12} Maus	44
Abbildung 13: Eröffnete Abdominalhöhle einer Wildtypmaus (A) und einer IRAG ^{Δ12/Δ12} Mutante (B)	45
Abbildung 14: Spontanaktivität des Längsmuskels im Colon	47
Abbildung 15: Spontanaktivität des Längsmuskels im Jejunum	48
Abbildung 16: Mittelwerte ± SEM der Effekte von 8-Br-cGMP auf die Spontanaktivität des Längsmuskels im Colon	49
Abbildung 17: Mittelwerte ± SEM der Effekte von 8-Br-cGMP auf die Spontanaktivität des Längsmuskels im Jejunum	50
Abbildung 18: Die stimulierbare Kraftentwicklung des Colons in Form von Originalaufzeichnungen einzelner Wildtypmäuse und in Form von Mittelwerten (± SEM) bei allen untersuchten Mäusen	51
Abbildung 19: Mittelwerte ± SEM der Kraftentwicklung des Jejunums von Wildtyp-, heterozygoten IRAG ^{+Δ12} -, IRAG ^{Δ12/Δ12} - und cGKI ^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit CCh (10 μM) (A), mit Kalium (85 mM) (B) und mit Thapsigargin (1 μM) (C)	53

Abbildung 20: Mittlere Konzentrationswirkungskurve von 8-Br-cGMP am Colon (A) und am Jejunum (B) von Wildtypmäusen	54
Abbildung 21: Wirkung einer Vorinkubation mit 8-Br-cGMP (300 μ M) im Verlauf einer repetitiven Kontraktionsauslösung durch CCh (10 μ M) am Colon	55
Abbildung 22: Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit CCh (10 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon	56
Abbildung 23: Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit CCh (10 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum	58
Abbildung 24: Effekt von cBIMPS (250 μ M) auf den mit CCh (10 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon	59
Abbildung 25: Übersicht der Effekte (Mittelwerte \pm SEM) von 8-Br-cGMP auf den mit CCh vorkontrahierten Längsmuskel des Dünndarms und des Colons aller untersuchter Mauslinien	60
Abbildung 26: Kraftentwicklung (Mittelwerte \pm SEM) des Colons und des Jejunums nach Stimulation mit CCh (10 μ M) und Calyculin A (100 nM)	61
Abbildung 27: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit CCh (10 μ M) und Calyculin A (100 nM) vorkontrahierten Längsmuskel im Darm	62
Abbildung 28: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon	63
Abbildung 29: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum	64
Abbildung 30: Relaxierender Effekt (als Mittelwerte \pm SEM) von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) vorkontrahierten Längsmuskel in unterschiedlichen Darmabschnitten der verschiedenen Mauslinien	65
Abbildung 31: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) und Calyculin A (100 nM) vorkontrahierten Längsmuskel im Darm	66
Abbildung 32: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Thapsigargin (1 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon	68
Abbildung 33: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Thapsigargin (1 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum	69

1 Einleitung

Der kontraktile Tonus der glatten Muskulatur hat eine Schlüsselrolle bei der Regulation verschiedener vitaler Körperfunktionen wie Blutdruck, Blasenentleerung und Darmmotilität inne. Die glatte Muskulatur unterliegt daher einer strengen und aufwendigen Kontrolle durch Hormone und Neurotransmitter. Strukturdefekte und Fehler dieser Regulation sind an einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt. In der Humanmedizin stehen hier vor allem Bluthochdruck, Asthma und Motilitätsstörungen im Gastrointestinaltrakt im Vordergrund. Auch in der Tiermedizin gibt es eine Reihe von Krankheiten, die auf eine Störung der glatten Muskulatur zurückgeführt werden können. Beim Pferd sind hier vor allem die chronische obstruktive Bronchitis (COPD) und Koliken verschiedenster Ursachen zu nennen. Bei Wiederkäuern treten diesbezüglich die Labmagenverlagerung und die Hypocalcaemie (Milchfieber) auf. Aber ebenso der Megaoesophagus des Hundes und das Megacolon (Hirschsprung-Krankheit des Hundes) sind Krankheiten, die auf einen Defekt in der Regulation der glatten Muskulatur zurückzuführen sind. Für die Erforschung und Heilung solcher Krankheiten ist das bessere Verständnis der Signalwege in der glatten Muskulatur von großer Bedeutung. Mit der Entwicklung von transgenen Mausmodellen ist es möglich, diese Signalwege präzise zu analysieren und so als standardisierte Modelle zur Beantwortung von biomedizinischen Fragestellungen zu etablieren.

Unterschiedliche Hormonsysteme kontrahieren und relaxieren den glatten Muskel. Cholinerge und α adrenerge Hormone führen über den Anstieg des zytosolischen Calciums zur Kontraktion, während der NO Signalweg über einen Anstieg der intrazellulären Konzentration von Guanosinmonophosphat (cGMP) die Relaxation vermittelt. Dabei bindet NO an einen spezifischen Rezeptor, die lösliche Guanylylcyclase, und initiiert so über cGMP die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI). Damit wird eine Signalkaskade, die zur Relaxation führt, aktiviert.

Das IP₃-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat (IRAG) ist ein neues Schlüsselprotein in der NO/cGMP/cGKI Signalkaskade. IRAG bildet zusammen mit der cGKI und dem IP₃ Rezeptor Typ I einen trimeren Komplex und hemmt nach Aktivierung der cGKI die Calciumausschüttung aus dem Endoplasmatisches Reticulum (ER). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer IRAG ^{$\Delta 12/\Delta 12$} Deletionsmutante die Funktion

von IRAG innerhalb der NO/cGMP/cGKI Signalkaskade im Gastrointestinaltrakt untersucht.

2 Literaturteil

2.1 Darmphysiologie

Für den Erhalt des Lebens ist die Zufuhr von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser zwingend notwendig. Im Darm wird die aufgenommene Nahrung durchmischt und enzymatisch oder bakteriell in ihre Bestandteile zerlegt. Diese können dann über die Darmwand in den Organismus aufgenommen werden.

2.1.1 Aufbau des Rumpfdarms

Der Aufbau der Darmwand entspricht grundsätzlich dem eines häutig-muskulären Schlauches. Vom Lumen nach außen gehend besteht der Verdauungstrakt aus der Tunica mucosa, der Tela submucosa, der Tunica muscularis (Stratum circulare und Stratum longitudinale) und der Tunica serosa (siehe Abbildung 1). Die Tunica mucosa bildet die Innenauskleidung des Darms und besitzt die Funktion einer Diffusionsbarriere. Die Lamina muscularis mucosae ist eine Besonderheit der Tunica mucosa und verleiht ihr eine Eigenbeweglichkeit. Die Tela submucosa besteht aus lockerem Bindegewebe und dient als Verschiebeschicht gegenüber der darunter liegenden Tunica muscularis. Neben größeren Lymph- und Blutgefäßen, zuständig für den Abtransport von Nährstoffen, beinhaltet sie den Plexus nervorum submucosus, auch Meißner Plexus genannt. Dieser stellt zusammen mit dem Auerbach Plexus einen wichtigen Teil des Nervensystems des Verdauungstrakts dar. Die Tunica muscularis besteht im gesamten Darm aus glatter Muskulatur. Die Muskelschicht wird in die innere Zirkuläre (Stratum circulare) und in eine äußere Längsschicht (Stratum longitudinale) unterteilt und bildet den motorisch wirksamen Teil des Darms. Zwischen den beiden Muskelschichten liegt der zweite wichtige Nervenplexus des enterischen Nervensystems, der Plexus nervorum myentericus, auch bezeichnet als Auerbach Plexus. Im Unterschied zum Dickdarm besitzt die Schleimhaut des Dünndarms (Tunica Mucosa) so genannte Dünndarmzotten. Die Villi intestinales dienen der Oberflächenvergrößerung (Übersicht aus Liebich, 2004).

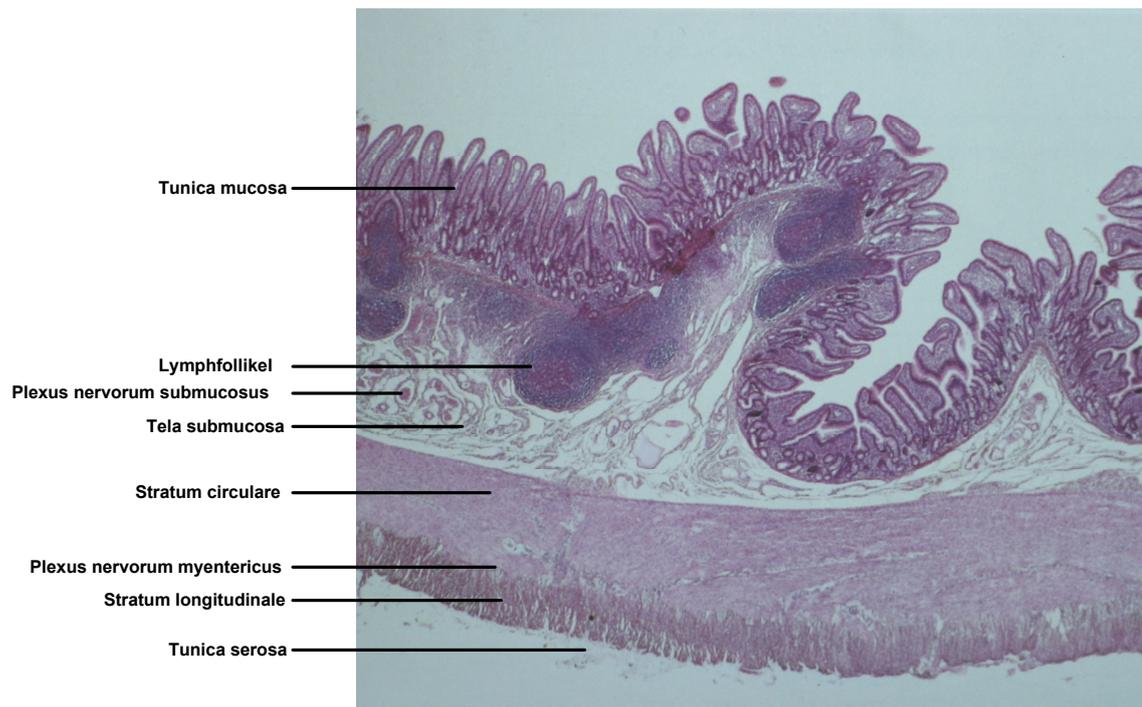


Abbildung 1: Wandschichten des Magen-Darm-Trakts (modifiziert aus König und Liebich, 2004).

2.1.2 Magen-Darm-Motorik

Die Durchmischung, die Propulsion und der portionierte Transport des Darminhaltes stellen die wichtigsten Aufgaben der gastrointestinalen Motorik dar. Dafür sorgt die koordinierte Aktivität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur. Eine Kontraktion der Zirkulärmuskulatur verengt den Darm, während eine Kontraktion der Longitudinalmuskulatur einen Darmabschnitt verkürzt. Diese Aktivität wird durch das enterische Nervensystem über Reflexbögen koordiniert. Wird der Darm gedehnt, schütten descendierende Nerven distal des Stimulus hemmende Transmitter aus. Daraufhin erschlafft die Zirkulärmuskulatur an dieser Stelle und das Darmlumen erweitert sich. Proximal des Stimulus werden dagegen erregende Transmitter ausgeschüttet, die zu einer Kontraktion der Zirkulärmuskulatur und damit zu einer Verengung des Darmlumens führen. Diese zeitlich und räumlich ablaufenden Zyklen („peristaltischer Reflex“) führen zu einem nach anal gerichteten Transport des Darminhaltes (Holzer et al., 2002). Durch die kontinuierliche Ausschüttung von hemmenden Neurotransmittern, insbesondere von NO, kommt es zu einer ständigen „Hemmung“ der Peristaltik (siehe unten). Diese Art der Regulation senkt die Wahrscheinlichkeit von Spasmen. Bei Bedarf kann diese Hemmvorrichtung relativ leicht gelöst werden, die Aktivität erhöht sich, ohne dass

zusätzlich erregende Strukturen eingeschaltet werden müssen. Die Durchmischung des Darminhalts stellt einen stationären Mechanismus dar. Diese Durchmischung wird durch Pendelbewegungen der Longitudinalmuskulatur und durch Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur erreicht. Der Rhythmus dieser Bewegungen wird vor allem durch die von den interstitiellen Zellen von Cajal hervorgerufenen „slow waves“ bestimmt (siehe interstitielle Zellen von Cajal) (Holzer et al., 2002).

2.1.3 Innervation des Gastrointestinaltrakts

Die neuronalen Strukturen im Magen-Darm-Trakt sind überaus komplex. Sie werden vor allem vom enterischen Nervensystem (ENS) gebildet, an dem zusätzlich das vegetative Nervensystem mit Sympathikus und Parasympathikus beteiligt ist (Ekblad und Bauer, 2004). Die Nervenzellen können sowohl außerhalb (extrinsisch) als auch innerhalb (intrinsisch) der Darmwand lokalisiert sein. Viscerale, sympathische und parasympathische Nerven bilden die extrinsischen Nervenbahnen (Holzer et al., 2001). Die Hauptaufgabe dieser Nervenbahnen liegt in der Überwachung. Nur gelegentlich nehmen sie regulierende Aufgaben wahr. Die neuronale Kontrolle gastrointestinaler Funktionen erfolgt weitgehend autonom über ein darmeigenes Nervensystem, das deshalb auch als „Gehirn im Darm“ bezeichnet wird. Die sensorischen und motorischen Nerven der extrinsischen Nervenbahnen gehören meist diesem enterischen Nervensystem an. Es ist damit für die Regulation vieler physiologischer Funktionen verantwortlich. Dieses Nervensystem ist in der Lage, die Verdauungsvorgänge zu programmieren und bedarfsgerecht zu steuern (Holzer et al., 2002).

2.1.3.1 Das enterische Nervensystem

Seit über hundert Jahren ist die Existenz zweier Nervengeflechte im Magen-Darm-Trakt bekannt. Meissner beschrieb 1857 einen zwischen Mucosa und Zirkulärmuskulatur gelegenen Plexus (**Plexus nervorum submucosus**). 1864 konnte Auerbach die Existenz eines weiteren Plexus, der sich zwischen Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur befindet, nachweisen (**Plexus nervorum myentericus**). Zuerst wurde es als ein „diffuses parasympathisches Ganglion“ angesehen. Erst Langley gelang es 1921, das enterische Nervensystem (ENS) vom sympathischen und parasympathischen Nervensystem abzugrenzen.

Aufbau und Funktion des enterischen Nervensystems (ENS)

Der Gastrointestinaltrakt weist das größte Netzwerk an Neuronen außerhalb des Zentralnervensystems auf (Holzer et al., 2001). Mit einer Gesamtzahl von mehreren Millionen intrinsischer Neuronen ist von der Größenordnung her gesehen die Anzahl der Neurone im Gastrointestinaltrakt ähnlich der des Rückenmarks (Furness und Costa, 1987; Karaosmanoglu et al., 1996). Das enterische Nervensystem liegt in der Wand des Gastrointestinaltrakts und dehnt sich vom Ösophagus bis zum M. sphincter ani internus aus. Es besteht aus Nervenzellen, die in Ganglien variierender Größe organisiert sind, und aus interganglionären Nervensträngen, in denen Nervenzellfortsätze verlaufen. Über sie stehen die Nervenzellen miteinander in Kontakt. Dieses neuronale Netz wird in erster Linie vom Plexus nervorum submucosus und vom Plexus nervorum myentericus gebildet (Holzer et al., 2002).

Im enterischen Nervensystem können drei funktionell unterschiedliche, wichtige Zelltypen unterschieden werden. Es handelt sich dabei um intrinsische primäre afferente Neurone (IPANs), Interneurone und efferente Neurone. Diese unterschiedlichen Zelltypen und ca. 25 Neurotransmitter werden benötigt, um die verschiedenen Funktionen des ENS zu steuern (McConalogue und Furness, 1994).

Der wichtigste kontrahierende Neurotransmitter der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts ist Acetylcholin. Dieser bindet an die muscarinergen Rezeptoren und bewirkt so eine Aktivitätssteigerung. Im Gegensatz dazu führen hemmende Neurotransmitter der Muskel-Motoneuronen zu einer Relaxation des Darms. Zu den wichtigsten hemmenden Neurotransmittern zählen NO, Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP), Adenosintriphosphat (ATP) und Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Peptide (PACAP) (Holzer et al., 2001).

Im enterischen Nervensystem fungiert NO als Überträgerstoff der nicht adrenergen, nicht cholinergen (NANC) Neurone. Die genannten Neurone innervieren die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts, des Respirations- und des Urogenitaltrakts und relaxieren die glatte Muskulatur. Dies bezeichnet man als NANC-Hemmung (Holzer et al., 2001). Über die NANC-Hemmung werden die peristaltischen Kontraktionen im Gastrointestinaltrakt reguliert (Bult et al., 1990; Sanders und Ward, 1992). Zielstrukturen der NO-Wirkung sind enterische Neurone, interstitielle Zellen von Cajal und die glatte Muskulatur des Verdauungstrakts (Shuttleworth et al., 1993; Ward und Sanders, 2001).

NO wird aus dem Plexus nervorum myentericus als Antwort auf eine nervale Stimulation freigesetzt. Die NO-Freisetzung wird durch die Aktivität der neuronalen NO-Synthase (nNOS) gesteuert. NO-Inhibitoren verzögern die Magenentleerung und die Darmpassage. Einige Untersuchungen weisen daraufhin, dass eine beeinträchtigte NO-Synthese im Plexus nervorum myentericus ein wichtiger Faktor in der Pathogenese einiger Krankheiten, wie Achalasie, sein könnte (Takahashi, 2003). Neben NO können aber noch andere Faktoren für Störungen im Gastrointestinaltrakt verantwortlich sein. So macht man eine Mutation im Gen des Endothelin-B-Rezeptors für die Entstehung der so genannten Hirschsprungkrankheit verantwortlich (Hosoda et al., 1994). Störungen der nNOS-Expression stehen im Verdacht, an einer Vielzahl von Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts beteiligt zu sein. Mit Hilfe eines Tiermodells konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer Colitis eine beeinträchtigte nNOS-Expression im Plexus nervorum myentericus zeigen (Takahashi, 2003).

Kenntnisse über nervale Verschaltungen im enterischen Nervensystem gewinnen zunehmend an Bedeutung, da klinisch beobachtete gastrointestinale Fehlfunktionen in Zusammenhang mit Störungen innerhalb des ENS gebracht werden.

Eine zentrale Aufgabe des enterischen Nervensystems besteht in der Steuerung der gastrointestinalen Motilität. Diese stellt die Grundlage für Aufnahme, Passage, Verdauung und Resorption der Nahrung, für die Exkretion stuhlpflichtiger Substanzen und für die Aufrechterhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase des Organismus dar (Kunze und Furness, 1999). Des Weiteren spricht man dem ENS Funktionen im Rahmen neuroimmunologischer Vorgänge, bei der Abwehr von Krankheitserregern und an Entzündungsprozessen zu.

Interstitielle Zellen von Cajal (ICC)

Ein Teil der glatten Muskulatur besitzt Zellen, die spontane Membrandepolarisationen auslösen können und eine Schrittmacherfunktion übernehmen (Hanani und Freund, 2000). Diese Zellen kommen vor allem im glatten Muskel der Hohlorgane des Gastrointestinaltrakts vor. Neuere Ergebnisse zeigen, dass sie auch in Gefäßmuskelzellen zu finden sind (Povstyan et al., 2003). Ein spontaner Einstrom von Kationen führt nach Überschreiten eines Schwellenwertes zur Auslösung eines Aktionspotentials. Diese Aktivität stammt aus Schrittmacherzellen, den so genannten interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) (Faussone-Pellegrini, 2005). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Cajal im Gastrointestinaltrakt sternförmige Zellen, die einen prominenten Nukleus und

variköse Ausläufer aufwiesen. Diese Zellen lagen zwischen Nervenendigungen und Effektorzellen und bildeten eine Art Netzwerk. Cajal postulierte, dass diese Zellen eine besondere Art von Neuronen seien, die eine Rolle bei der Neurotransmission spielen. Sie wurden später nach ihrem Erstbeschreiber als interstitielle Zellen von Cajal (ICC) bezeichnet. Die ICC sind durch gap junctions mit den glatten Muskelzellen elektrisch gekoppelt und bestimmen so die Spontanaktivität. Sie erzeugen aufgrund ihrer Schrittmacherfunktion die so genannten „slow waves“. Auf diese Weise wird eine synchrone Kontraktion des Muskelgewebes erreicht. ICC sind spezialisierte glatte Muskelzellen und liegen im Plexus nervorum myentericus. Sie gelten als Bindeglied zwischen den autonomen Nerven und der glatten Muskulatur und sind für die Regulation der intestinalen Motilität verantwortlich. (Holzer et al., 2002). Andere Studien lieferten Hinweise darauf, dass die ICC eine entscheidende Schaltstelle bei der NO-vermittelten Relaxation darstellen (Burns et al., 1996; Ward et al., 1998).

2.1.4 Der Dünndarm

2.1.4.1 Aufbau und Funktion des Dünndarms

Der Dünndarm ist ein schlauchförmiges Organ, das der Verdauung, dem Weitertransport und der Resorption der verdauten Nahrung dient. Er gliedert sich in drei Teile Duodenum, Jejunum und Ileum.

Durch die Bewegung des Dünndarms wird der Chymus mit den Verdauungssäften durchmischt. Das Zusammenwirken des Magensaftes und der Dünndarmsekrete bewirkt den Verdauungsprozess. Eine entscheidende Rolle spielt aber auch die Gallenflüssigkeit (ein Sekret der Leber) und die in der Nahrung enthaltenen Enzyme. Galle enthält Gallensalze, die als Emulgatoren wirken, indem sie Fett in kleinste Kügelchen dividieren. Nur so kann das Fett von den Lipaseenzymen (fettspaltende Enzyme) im Bauchspeicheldrüsensaft aufgespaltet werden. Die Dünndarmmotilität verteilt den Speisebrei postprandial über die resorbierende Mucosa und sorgt für eine gute Durchmischung (Weisbrodt, 1987). Die Dünndarmschleimhaut stellt das flächenmäßig größte lymphatische Organ des Körpers dar und besitzt eine Vielzahl von Aufgaben. Zu diesen gehören die Sekretion des enzymatischen Dünndarmsaftes und die Synthese und Abgabe von Schleim. Dieser hat die Aufgabe, die Zellen der inneren Darmschleimhaut zu schützen. Die Schleimproduktion und -abgabe erfolgt noch ausgeprägter als im Magen. Die Schleimhaut produziert zusätzlich Gewebshormone und ist für die Reabsorption

von gespaltenen Endprodukten verantwortlich. Sie ist nicht nur in zahlreiche Falten gelegt, sondern mit Millionen von Zotten besetzt. Das vergrößert ihre Oberfläche immens. Auf den Falten sitzen die Verdauungszellen (Darmepithelzellen oder Enterozyten), die ihrerseits fein strukturierte Falten (Mikrozotten) haben. Die Mikrozotten enthalten die Verdauungsenzyme. Sie saugen die Nahrungsbestandteile auf, spalten sie und stellen sie dem Organismus über die Lymphgefäße und das Blut zur Verfügung (Übersicht aus Liebich, 2004).

2.1.4.2 Motorik des Dünndarms

Die bereits erwähnten interstitiellen Zellen von Cajal lassen Schrittmacherpotentiale entstehen und rufen so genannte „slow waves“ der glatten Muskulatur hervor (Thomsen et al., 1998). Diese langsamen Wellen nehmen vom Duodenum bis Ileum stufenweise ab. Die Schrittmacherpotentiale der ICC führen zur Erregung der Muskelzellen und zum Entstehen so genannter Erregungspotentiale („spike potentials“). Diese werden über offene Verbindungen zwischen den Muskelzellen, dem so genannten Nexus, weitergegeben (Seki und Komuro, 2001).

Man kann am Dünndarm fünf verschiedene Kontraktionsformen unterscheiden. Peristaltische Wellen, stationäre Segmentationskontraktionen, aborale Riesenkontraktionen, stationäre oder wandernde Kontraktionsgruppen und als Phase III bezeichnete Kontraktionsmuster.

Als peristaltische Wellen bezeichnet man ringförmige Kontraktionen, die von oral nach anal laufen, und den Abtransport des Chymus bewirken. Die anderen Kontraktionsformen werden aus peristaltischen Wellen zusammengesetzt. Die stationären Segmentationskontraktionen dienen der Segmentation und der Durchmischung des Darminhalts. Riesenkontraktionen sind Kontraktionen mit großer Amplitude und einer langen Kontraktionsdauer, die langsam nach aboral fortschreiten. Die Kontraktionen schnüren das Darmlumen vollständig ab, was eine sehr gründliche Reinigung dieses Segmentes bewirkt. Das enterische Nervensystem steuert durch die Freisetzung von Transmittern die Motorik (siehe oben). Durch diese Stoffe verlaufen die slow waves der glatten Muskulatur unterschwellig. Nur wenn dieser hemmende Mechanismus nicht mehr in Kraft ist, können einzelne Darmsegmente durch das enterische Nervensystem erregt werden (Übersicht aus von Engelhardt und Breves, 2004).

2.1.5 Das Colon

2.1.5.1 Aufbau und Funktion des Colons

Der Dickdarm stellt den letzten Abschnitt des Gastrointestinaltrakts dar. Wenn der Nahrungsbrei im Dickdarm angekommen ist, ist die enzymatische Verdauung weitestgehend abgeschlossen. Die Wirkung der intestinalen bzw. pankreatischen Dünndarmsekrete nimmt kontinuierlich ab. Die weitere Verdauung wird von Darmbakterien und Protozoen übernommen, die in der Lage sind, Proteine und Kohlenhydrate zu spalten. Eine der wichtigsten Aufgaben des Colons liegt in der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts des Organismus. Die Zellen des Colonepithels können je nach Stoffwechsellage des Organismus Wasser und Elektrolyte ins Darmlumen abgeben oder aus diesem, im Austausch gegen Kalium und Bicarbonat, resorbieren. Je nach Stoffwechsellage wird dies mit Hilfe von verschiedenen Second-Messenger-Systemen gesteuert.

Die Mucosa des Colons besitzt im Gegensatz zum Dünndarm keine Zotten, sondern ausschließlich Krypten (Glandulae intestinales). Früher ging man davon aus, dass die Colonekrypten den Ort der Sekretion und das Oberflächenepithel der Mucosa den Ort der Resorption darstellen (Welsh et al., 1982). Heute weiß man, dass die Krypten in der Lage sind, sowohl zu sezernieren als auch zu resorbieren (Diener et al., 1989; Köckerling und Fromm, 1993; Singh et al., 1995). Die Abgabe von Schleim aus den Becherzellen dient als Gleitmittel für den Kot (Übersicht aus Liebich, 2004).

Wenn die Nahrung den Dickdarm erreicht, sind die meisten Nährstoffe verdaut worden. Fast die gesamte Flüssigkeit, die aus dem Dünndarm in das Colon gelangt, wird dort resorbiert. Dünndarmerkrankungen führen häufig zu einer Steigerung des ileozökalen Flüssigkeitsübertritts. Das Colon ist in der Lage, überschüssige Flüssigkeit bis zu einer gewissen Grenze zu resorbieren. Wird diese überschritten, kommt es zu einer klinisch-manifesten Diarrhö. Die zweite wichtige Aufgabe des Colons besteht neben der Resorption vor allem in der Sekretion. Die vom Colon abgegebene Flüssigkeit ist plasmisoton, Mucin-, HCO_3^- - und K^+ -reich (Binder et al., 1991; Binder und Sandle, 1994).

2.1.5.2 Motorik des Colons

Im Colon gibt es nur zwei verschiedene Motilitätsphasen. Die Bewegungen sind entweder gerichtet oder ungerichtet (Sarna et al., 1984). Die peristaltischen Wellen sind im Gegensatz zum Dünndarm nicht nur nach aboral gerichtet, sondern es tritt auch eine retrograde, oral gerichtete Peristaltik auf (Sarna, 1985). Für die Resorption des Wassers

und damit der Kotbildung ist vor allem die Durchmischung des Darminhaltes von großer Bedeutung. Hierbei spielen vorwiegend vier Kontraktionsformen eine Rolle:

- peristaltische und antiperistaltische Wellen
- aboral wandernde Kontraktionsformen
- Haustrenbewegung
- aboral wandernde Riesenkontraktionen

Peristaltische und antiperistaltische Wellen bewirken im Colon eine gute Durchmischung des Darminhaltes. Diese Wellen besitzen aber im Colon, im Unterschied zum Dünndarm, nur eine sehr geringe Einschnürtiefe. Dadurch wird der Chymus nicht mehr vollständig getrennt. Durch die verbleibende Öffnung entsteht ein starker Rückstrom, was eine kräftige Durchmischung bewirkt. Die aboral wandernden Segmentationskontraktionen des Colons dienen hier vor allem zur Unterteilung des Kotes. Sie bestehen aus lang anhaltenden ringförmigen Einschnürungen, die sich langsam in aboraler Richtung fortbewegen. Die Haustrenbewegung tritt häufig zusammen mit Segmentationskontraktionen auf und dient der Umwälzung des Kotes oder dem gezielten Transport von Flüssigkeit in aboraler Richtung. Aboral wandernde Riesenkontraktionen sind, ähnlich wie am Dünndarm, vor allem durch große Kontraktionsstärke, Dauer und durch langsame Geschwindigkeit gekennzeichnet. Diese Riesenkontraktionen wandern über das gesamte Colon bis zum Anus und führen zur Defäkation (Karaus und Sarna, 1987) (Übersicht aus von Engelhardt und Breves, 2004).

2.2 Grundlagen der Muskelkontraktion

Hinsichtlich Bau, Funktion und Erregung kann man zwei Muskeltypen unterscheiden, zum einen die quer gestreifte und zum anderen die glatte Muskulatur. Skelett- und Herzmuskulatur zählen zu der quer gestreiften Muskulatur. Die glatte Muskulatur wird auch als Eingeweidemuskulatur bezeichnet. Während die Skelettmuskulatur willkürlich ist, das heißt dem Willen eines Individuums unterliegt, ist die glatte Muskulatur nicht durch den Willen beeinflussbar. Die Herzmuskulatur stellt eine Mischform aus beiden dar. Sie zählt zwar zu der quer gestreiften Muskulatur, ist aber nicht durch den Willen zu beeinflussen.

2.2.1 Aufbau der Skelettmuskulatur

Die auch als Skelettmuskelfaser bezeichnete Zelle entsteht durch die Verschmelzung von mehreren einzelnen Zellen und ist mit 10 bis 100 μm Dicke und einigen cm Länge deutlich größer als die glatte Muskelzelle. Die Muskelzelle wird von einer Zellmembran, dem Sarcolemm, umhüllt. Die im Sarcoplasma liegenden kontraktilen Proteine Aktin und Myosin bilden die Myofibrillen. Eine Muskelfaser enthält einige hundert dieser Myofibrillen. Die Kontraktionsfähigkeit der Muskelzellen basiert auf der regelmäßigen Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente sowie auf der Anordnung und Verschiebbarkeit der Myofibrillen. Das ATP-abhängige Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente führt zur Verkürzung des Muskels und damit zur Kontraktion (Übersicht aus von Engelhardt und Breves, 2004).

2.2.2 Aufbau der glatten Muskulatur

Die Muskulatur der inneren Organe, wie z.B. Gefäße und Uterus, aber auch des Gastrointestinaltrakts, erscheint im Lichtmikroskop homogen und wird deshalb auch glatte Muskulatur genannt. Die glatten Muskelzellen sind mit einer Breite von 3 bis 6 μm und einer Länge von 100 bis 500 μm deutlich kleiner als die Muskelzellen des Skelettmuskels. Die Aktin- und Myosinfilamente sind nicht in Myofibrillen angeordnet, sondern bilden einen nur grob geordneten kontraktilen Apparat (siehe Abbildung 2). Im glatten Muskel verlaufen die Myosinfilamente nicht parallel zueinander, sondern sind als ein diagonales Netzwerk innerhalb der Zelle angeordnet. Am Myosinfilamentsystem des glatten Muskels kann man drei Filamenttypen unterscheiden: Dünne Aktinfilamente, dicke Myosinfilamente und Intermediärfilamente. Dieser Filamenttyp ist im Gegensatz zu den beiden anderen Filamenttypen nicht an der Kontraktion beteiligt (Somlyo und Somlyo, 1994; Pavalko et al., 1995; Sjuve et al., 1998).

Das Sarkoplasmatische Reticulum (SR), welches ein dichtes Netzwerk bildet und den wichtigsten intrazellulären Calciumspeicher der Zellen darstellt, ist im glatten Muskel im Vergleich zum Skelettmuskel relativ schwach ausgeprägt. Die Membranen des SR sind für Calciumionen undurchlässig und Calcium-spezifische ATPasen (SERCAs) pumpen diese unter Bildung eines etwa 10.000-fachen Konzentrationsgefälles in das SR. Im SR werden Calciumionen teilweise an Proteine wie Calretikulin und Calsequestrin gebunden. Eine SERCA-Blockade verhindert die Wiederbefüllung der intrazellulären Speicher mit Calcium und führt so indirekt zu einer langsamen Speicherentleerung. Das pflanzliche Alkaloid Thapsigargin wurde Ende der 80er Jahre des

vorigen Jahrhunderts aus der Pflanze *Thapsia garganica* isoliert und als SERCA-Inhibitor beschrieben (Takemura et al., 1989).

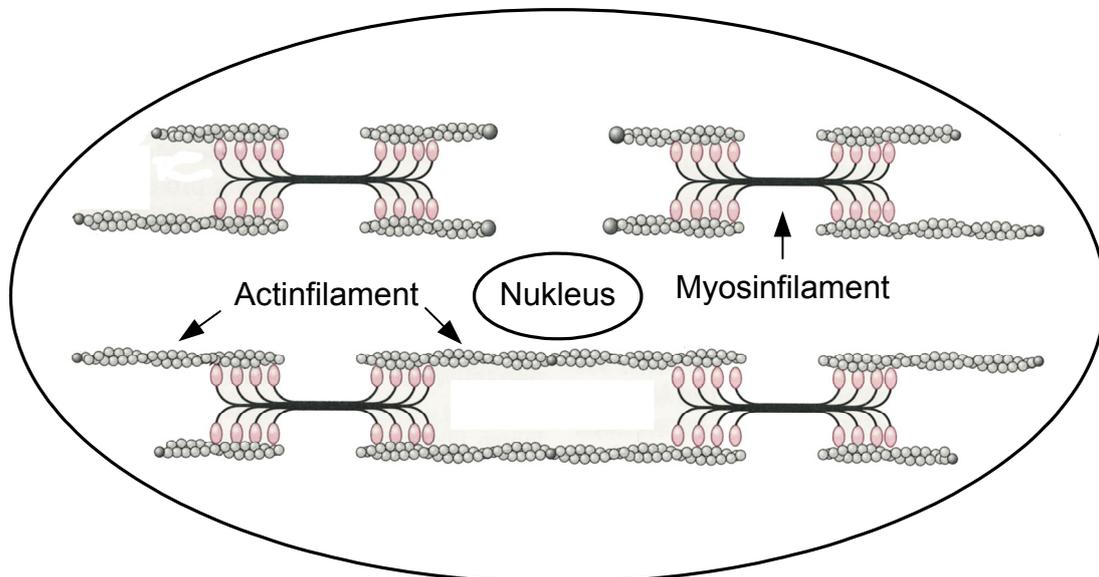


Abbildung 2: Schematische Darstellung des diagonalen Netzwerkes der kontraktilen Elemente einer glatten Muskelzelle (modifiziert nach von Engelhardt und Breves, 2004).

2.2.3 Kontraktiler Apparat der glatten Muskulatur

Die Kontraktion der glatten Muskulatur erfolgt wie auch im Skelettmuskel durch einen ATP-abhängigen Querbrückenzyklus, der durch eine so genannte Gleitfilamenttheorie beschrieben wird. Die Verkürzung der Muskulatur erfolgt durch das zyklische Ineinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten. Die Kontraktion der glatten Muskulatur ist im Vergleich zum Skelettmuskel 100- bis 1.000-mal langsamer. Dafür entwickelt der glatte Muskel bei einem sehr viel geringeren Energieaufwand eine höhere Kraft. Der geringe Myosingehalt führt im Gegensatz zum Skelettmuskel zu einer deutlich geringeren Geschwindigkeit, aber auch zu einer erhöhten Sparsamkeit. Im Vergleich zum Skelettmuskel besitzt er fünfmal weniger Myosin als ein quer gestreifter Muskel. (Übersicht aus von Engelhardt und Breves, 2004).

Die dünnen Aktinfilamente bestehen hauptsächlich aus Aktin und Tropomyosin. Das Tropomyosin windet sich um das Aktin und ist im Verhältnis von 1:7 vorzufinden. Das Tropomyosin des glatten Muskels hat eine Bindungsstelle für Troponin, obwohl dieses Protein des Skelettmuskels im glatten Muskel nicht vorkommt (Somlyo und Somlyo, 1991). Calponin und Caldesmon, Aktin- und Myosin-bindende

Proteine sind weitere Bestandteile des dünnen Filaments, die an der Kontraktion beteiligt sind.

Ein dickes Myosinfilament besteht aus zwei schweren Ketten, diese werden von zwei globulären Köpfen und einem Schwanz gebildet. Die Kopfreion besteht aus zwei leichten Ketten (Somlyo und Somlyo, 1991). Die regulatorische leichte Kette des Myosins (MLC₂₀) spielt durch seine Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktion (siehe Kontraktion der glatten Muskulatur). Die essentielle leichte Kette des Myosins ist an der Regulation der ATPase-Aktivität des Myosins (Huang et al., 1999) und an der Regulation der Kontraktionsgeschwindigkeit beteiligt (Malmqvist und Arner, 1991).

2.2.4 Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur

Generell wird die Kontraktilität des glatten Muskels durch die intrazelluläre Calciumkonzentration und durch die Modulation der Calciumsensitivität der kontraktilelemente reguliert (Berridge et al., 2000; Somlyo und Somlyo, 2000; Pfitzer, 2001; Schlossmann et al., 2003). Glatte Muskelzellen können weniger Calcium als z. B. Skelettmuskeln speichern und sind deshalb auf einen Calciumeinstrom angewiesen. Calciumkanäle in der Plasmamembran oder in den Membranen des Sarkoplasmatischen Reticulums werden elektrisch durch Depolarisation, biochemisch durch Bindung eines Liganden oder mechanisch aktiviert. Dies führt über verschiedene Signaltransduktionskaskaden zu einer vorübergehenden Öffnung der Calciumkanäle und zum Einstrom von Calciumionen, entlang des Konzentrationsgefälles in das Zytoplasma.

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt beim glatten Muskel, wie bei allen anderen Muskeln, zur Kontraktion (Sanders, 2001). Im Skelettmuskel wird das Ausmaß der Kontraktion direkt über die Höhe der Calciumkonzentration gesteuert. Bei der glatten Muskulatur hingegen bewirkt Calcium die Aktivierung eines Enzyms, die Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK), die daraus die Stärke der Kontraktion bestimmt (siehe Abbildung 3). Dadurch werden die Muskelkontraktionsmechanismen in Gang gesetzt. Nach der Erhöhung der Calciumkonzentration werden Calciumionen sowohl in die sarkoplasmatischen und mitochondrialen Speicher wieder aufgenommen als auch in den extrazellulären Raum abgegeben (Sanders, 2001).

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kann auf zwei verschiedenen Wegen ausgelöst werden. Jede Erregung der glatten Muskulatur ist in der Regel eine Mischung aus beiden Kopplungsarten.

2.2.4.1 Elektromechanische Kopplung

Bei der elektromechanischen Kopplung wird ein Signal, Depolarisation oder Aktionspotential in eine Kontraktion des Muskels umgesetzt. Im Skelettmuskel entsteht das Signal an der motorischen Endplatte. An dieser löst Acetylcholin durch die Bindung an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren eine Depolarisation aus, die unter Beteiligung von spannungsabhängigen Calciumkanälen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und somit zur Kontraktion führt. Im glatten Muskel sind bisher nur geringe Depolarisationen nach Rezeptorstimulationen gezeigt worden (10-15 mV) (Janssen, 2002), obwohl mehrere Studien rezeptoraktivierte Ionenkanäle nachweisen konnten. Daher spielt die elektromechanische Kopplung im glatten Muskel, im Gegensatz zum Skelettmuskel, eher eine untergeordnete Rolle.

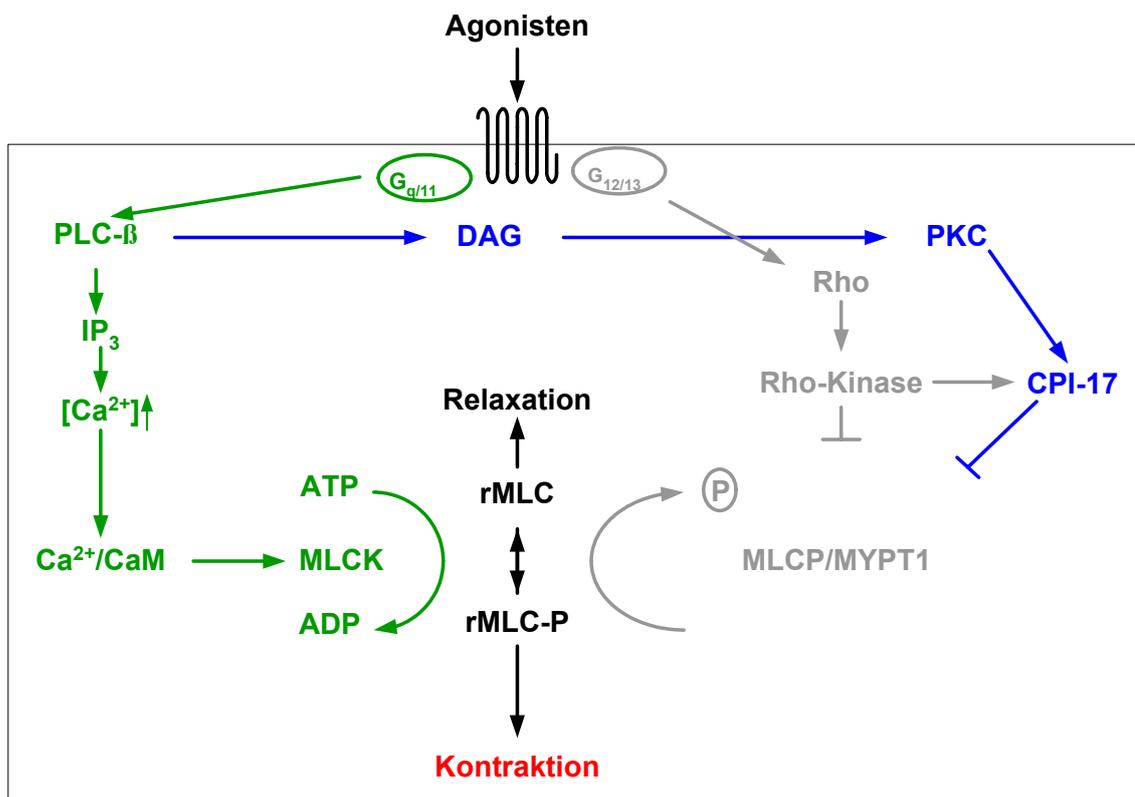


Abbildung 3: Regulation der glatten Muskulatur über den Calcium-abhängigen (dunkelgrüne Beschriftung) und -unabhängigen (graue Beschriftung) Mechanismus. Calmodulin (CaM), Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃), Myosinkinase (MLCK), Myosinphosphatase (MLCP), regulatorische Untereinheit der Myosinphosphatase (MYPT1), regulatorische Myosin leichte Kette (rMLC), Phospholipase C (PLC), Diacylglycerol (DAG), Proteinkinase C (PKC), kleines GTP-bindendes Protein (Rho); Agonisten sind z.B. Noradrenalin oder Carbachol (CCh). Die Regulation von MLCP über CPI-17/PKC ist blau dargestellt.

2.2.4.2 Pharmakomechanische Kopplung

Die Pharmakomechanische Kopplung beschreibt Kontraktionen durch Pharmaka, Neurotransmitter oder Hormone, die weitgehend ohne eine Depolarisation der Muskelzelle stattfinden (Allen und Walsh, 1994; Somlyo et al., 1999). Die für die Kontraktion nötige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration stammt aus der Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern. Dabei kommt es nach Rezeptorstimulation zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), das Calciumkanäle in der Membran des SR öffnet.

Eine andere Möglichkeit, die intrazelluläre Calciumkonzentration zu erhöhen, ist die Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen, die zu einem Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum führt. Diese Hypothese wird durch neuere Studien, bei denen nach genetischer Inaktivierung des Calciumkanals Funktionsstörungen der glatten Muskulatur festgestellt wurden, belegt (Moosmang et al., 2003; Wegener et al., 2004).

2.2.4.3 Calcium-abhängige Kontraktion

Durch die Bindung eines Agonisten, wie z.B. Carbachol (CCh), Noradrenalin oder Bradykinin, an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (G_q oder G₁₁), kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) (Berridge et al., 2000; Bootmann et al., 2001; Pfitzer, 2001). Diese bewirkt die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diazylglyzerol (DAG). Durch die Bindung von IP₃ an einen Calciumkanal in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER), den IP₃ Rezeptor Typ I, kommt es zum Ausstrom von Calcium aus den intrazellulären Speichern in das Zytosol (siehe Abbildung 3). Parallel oder anstelle dessen kann eine Hormonstimulation zur Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle führen. Diese Kanäle tragen zu einer Kontraktion unterschiedlichen Ausmaßes bei, die vom Muskeltyp abhängig ist (Moosmang et al., 2003; Wegener et al., 2004).

Die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC₂₀) am Serin 19, durch die Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK), ist der Auslöser für die Kontraktion der glatten Muskulatur (siehe Abbildung 3) (Hofmann et al., 2000; Feil et al., 2003). Die MLCK wird nach dem intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration durch Bindung eines Calcium-Calmodulin-Komplex aktiviert (Walsh, 1994). Dadurch wird die regulatorische MLC (rMLC) phosphoryliert und aktiviert. Die phosphorylierte regulatorische MLC (rMLC-P) bindet dann am Aktinfilament, ermöglicht die Interaktion von Aktin

und Myosin und führt damit zur Kontraktion des Muskels. Die reversible Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins ist entscheidend an der Regulation der glattmuskulären Kontraktion beteiligt. Die Dephosphorylierung der MLC₂₀ durch die Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP) führt zur Relaxation der glatten Muskulatur. Voraussetzung für die Dephosphorylierung ist das Absinken der Calciumkonzentration.

2.2.4.4 Calcium-unabhängige Kontraktion, Calciumsensibilisierung

Der Tonus der glatten Muskulatur wird nicht ausschließlich durch Anstieg und Absinken der zyttoplasmatischen Calciumionenkonzentration reguliert, sondern unterliegt einer Reihe weiterer modulatorischer Einflüsse (Pfitzer, 2001). Zusätzlich zur Calcium-abhängigen Kontraktion gibt es die Möglichkeit der Calcium-unabhängigen Kontraktion des glatten Muskels (Pfitzer, 2001). Von Calciumsensibilisierung spricht man, wenn es bei gleich bleibender Calciumkonzentration zu einer Muskelkontraktion kommt. Grundlage für die Calciumsensibilisierung ist vor allem die Hemmung der Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP). Die MLCP besteht aus drei Untereinheiten, der katalytischen Untereinheit, der regulatorischen Untereinheit (MYPT1) und einer kleinen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 20 kD (Hartshorne et al., 1998). Die große regulatorische Untereinheit der MLCP sorgt für die Lokalisierung des Holoenzym am Myosin und wird daher auch als myosin phosphatase target subunit 1, kurz MYPT1, bezeichnet. Sie wird in einer Vielzahl von Geweben in unterschiedlichen Isoformen exprimiert (Hartshorne et al., 1998). Ihre zwei Phosphorylierungsstellen (Threonin 695 und Threonin 850) könnten einen Angriffspunkt für die Regulation darstellen. Die genaue Funktion der kleinen Untereinheit ist noch nicht bekannt, man nimmt aber an, dass sie an der Regulation oder an der intrazellulären Lokalisation der MLCP beteiligt ist (Hirano et al., 1997). Bis heute sind zwei Signalwege bekannt, die die Hemmung der MLCP bewirken.

Hemmung der MLCP durch die Rho-assoziierte Kinase

Der wichtigste sensitivitätssteigernde und damit kontraktilitäts-fördernde Mechanismus liegt in der G-Protein-abhängigen Inhibition der MLCP. Die Inhibition wird durch Phosphorylierung der regulatorischen MLCP-Untereinheit durch die Rho-Kinase erreicht (Pfitzer, 2001; Deng et al., 2001). Die Stimulation der Rezeptoren durch Agonisten führt zu einer Aktivierung von G-Proteinen (G₁₂/G₁₃) und nachfolgend zu einer Aktivierung von Rho. Rho ist eine monomere GTPase, die in permeabilisierten

glatten Muskelzellen zu einer Calcium-unabhängigen Zunahme der Kontraktionskraft führt (Gong et al., 1996). Die Rho-Kinase wird durch die GTP-gebundene Form von Rho aktiviert. Diese Aktivierung bewirkt die Phosphorylierung von MYPT1, woraufhin die Myosinphosphatase inhibiert wird (Kimura et al., 1996) (siehe Abbildung 3). Daraus kann man schließen, dass die Phosphorylierung der MYPT1 durch die Rho-Kinase direkt zur Hemmung der MLCP führt (Bonnevier und Arner, 2004). Durch die weiter fortschreitende Phosphorylierung der MLC steigt die Konzentration von rMLC-P an und der Muskel kontrahiert (siehe Abbildung 3).

Proteinkinase C (PKC)

Die Aktivierung der PKC stellt einen weiteren Mechanismus dar, der zur Hemmung der MLCP führt. Die Bindung eines Agonisten an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor bewirkt die Aktivierung der Phospholipase C β . Diese veranlasst die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol. Die Proteinkinase C (PKC) wird von Diacylglycerol und Phorboläster (PDBu) aktiviert. Die aktivierte PKC führt einerseits zur Phosphorylierung der MLC₂₀ und zur Kontraktion des glatten Muskels (Itho et al., 1993). Andererseits inhibiert es die MLCP über das Protein CPI-17, dass in seiner aktiven, phosphorylierten Form die regulatorische Untereinheit der MLCP hemmt (Etho et al., 1995) (siehe Abbildung 3). Die Phosphorylierung von CPI-17 erfolgt am Threonin 38 *in vitro* durch die PKC (Kitazawa et al., 2000). Phorboläster rufen durch Aktivierung der PKC eine Kontraktion glatter Muskelzellen hervor, die durch Phosphorylierung von CPI-17 vermittelt wurde (Somlyo und Somlyo, 2000). Die physiologische Funktion von CPI-17 im Darm ist noch nicht geklärt (Bonnevier und Arner, 2004). Eine Schwierigkeit bei der Analyse von CPI-17 ist, dass neben der PKC auch die Rho-Kinase und einige andere Proteinkinasen zu einer Phosphorylierung von CPI-17 führen können (Koyama et al., 2000; Somlyo und Somlyo, 2003).

2.2.5 Mechanismen der Relaxation der glatten Muskulatur

Die Relaxation erfolgt aufgrund zweier Mechanismen: durch das Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration oder durch die Calciumdesensibilisierung des glatten Muskels. Energieabhängige Calciumpumpen befördern nach der Erregung das Calcium wieder aus der Zelle. Sinkt die intrazelluläre Calciumkonzentration unter einen Schwellenwert ($<1 \mu\text{M}$), führt dies zur Dissoziation des Calcium-/Calmodulin-MLCK-Holoenzym und damit zu einer Inaktivierung der MLCK. Das Aktivitätsgleichgewicht

zwischen der MLCK und der MLCP verschiebt sich zugunsten der MLCP. Dadurch kommt es zu einer Dephosphorylierung der rMLC und damit zur Relaxation des Muskels. Bei niedrigen Calciumkonzentrationen erschlaffen die Muskelfasern, unter Anbindung von ATP an die Myosinköpfchen.

Die Calciumdesensibilisierung des glatten Muskels kann durch eine Inaktivierung der MLCK oder durch die Aktivierung der MLCP stattfinden. Die MLCK besitzt ihrerseits zwei Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung der MLCK senkt deren Affinität gegenüber dem Calcium-Calmodulin-Komplex. Dadurch wird die Aktivität der MLCK vermindert (Stull et al., 1993). Die genaue Bedeutung dieses Wegs ist allerdings bis heute unklar. Eine Aktivierung der MLCP ist jedoch bereits gezeigt worden. In Präparaten konnte dieses Enzym direkt durch cGMP/cGKI aktiviert werden (Sauzeau et al., 2000). Dieser Weg wurde in einigen glattmuskulären Präparaten beschrieben (Pfitzer et al., 1986). cGMP aktiviert die cGKI α und diese phosphoryliert MYPT1 der MLCP (Wu et al., 1996). Dadurch wird die MLC dephosphoryliert und der Querbrückenzyklus abgebrochen. Des Weiteren wird zusätzlich diskutiert, dass die cGKI Rho inaktiviert und aus diesem Grunde die MLCP länger aktiv bleibt (Schlossman und Hofmann, 2005). Außerdem ist die PKG in der Lage, die Calciumsensibilisierung durch Hemmung von RhoA zu bremsen (Sauzeau et al., 2000). Die Calciumdesensibilisierung kann aber auch eine Folge der Phosphorylierung von Telokin sein (Walker et al., 2001). Dabei handelt es sich um ein C-terminales Fragment der MLCK und verhindert deren Aktivierung.

2.3 NO/cGMP Signalweg

Seit über 100 Jahren werden organische Nitrate zur Behandlung von koronaren Herzerkrankungen eingesetzt. Aber erst in den 1980er Jahren konnte der Wirkmechanismus der Nitrate aufgeklärt werden. In der Endothelschicht der Blutgefäße wurde ein gefäß-erweiternder Stoff entdeckt. 1987 konnte festgestellt werden, dass der so genannte EDRF („endothelium-derived relaxing factor) mit dem biologisch freigesetzten Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Somit wurde die Wirksamkeit der Nitrate auf die Freisetzung von NO zurückgeführt.

Stickstoffmonoxid ist ein sehr kleines (30 Da) gasförmiges Molekül und wird in verschiedenen Zellen, z. B. Endothelzellen, Thrombocyten, Makrophagen und Nervenzellen, als Antwort auf eine Vielzahl von physiologischen Signalen synthetisiert. Sein Wirkungsspektrum umfasst verschiedene Mechanismen, die unter anderem bei der

Regulation des Blutdrucks, der Thrombocytenaktivität, der Sinneswahrnehmung, der Immunantwort und eventuell bei so komplexen Leistungen wie Lernen und Gedächtnis beteiligt sind. Die Tatsache, dass der gasförmige Botenstoff Stickstoffmonoxid ubiquitär im Organismus verbreitet ist, hat unter anderem zur Entdeckung seiner zentralen Funktion in der Physiologie und Pathophysiologie des Gastrointestinaltrakts geführt (Sanders und Ward, 1992).

Im vegetativen und im enterischen Nervensystem fungiert NO als ein Neurotransmitter der NANC-Neurone (siehe Kapitel 2.1.3.1).

Für die Motilität im gesamten Gastrointestinaltrakt ist die NO-vermittelte Relaxation von zentraler Bedeutung (siehe 2.3.5.1). Fehlende NO-Synthese oder Defekte in der NO-abhängigen Signalkaskade führen zu schweren Funktionsstörungen (z.B. Achalasie, hypertrophe Pylorusstenose). Diese Funktionsstörungen kommen in der Regel durch mangelnde Erschlaffung der gastrointestinalen Muskulatur zustande (Pfeifer et al., 1998).

2.3.1 Bildung von NO

Im Organismus katalysieren NO-Synthasen die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin. In zwei aufeinander folgenden Monooxygenase-Reaktionen wird L-Arginin zu L-Citrullin oxidiert. Hierbei wird aus dem terminalen Guanidinstickstoff der Aminosäure L-Arginin unter Verbrauch von Sauerstoff NO frei (Loscalzo und Welch, 1995; Ignarro et al., 1999). Elektronendonator ist die reduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphats, NADPH. Aus der Familie der NO-Synthasen kann man drei Isoformen unterscheiden, die alle als Homodimere vorliegen. Dabei handelt es sich um die induzierbare Calcium-unabhängige NO-Synthase (iNOS) und zwei Calcium-abhängige, konstitutive Formen (eNOS und nNOS) (Alderton et al., 2001). iNOS werden vor allem in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert und produzieren wesentlich höhere NO-Konzentrationen als die konstitutiven NO-Synthasen. Im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr, aber auch bei Entzündungsreaktionen, wird die Expression der iNOS durch bestimmte Faktoren induziert. Bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxine) und Zytokine, wie Interleukin-1, IFN- γ und TNF- α , können als einige dieser Faktoren bezeichnet werden (Nathan und Xie, 1994; Alderton et al., 2001). Die Hemmung der iNOS erfolgt über Faktoren wie Glucocorticoide und ANP (Radomski et al., 1990; Di Rosa et al., 1990; Kierner und Vollmar, 1998). Im Gegensatz

zu den Calcium-abhängigen konstitutiven Formen spielen die iNOS innerhalb der NO/cGMP Signalkaskade keine Rolle.

Als konstitutive Form der NOS kommen in Endothelzellen und Thrombocyten die endotheliale oder eNOS und in Nervenzellen die neuronale oder nNOS vor und sind für die Synthese von NO als Signalmolekül innerhalb der NO/cGMP Signaltransduktion verantwortlich. Diese beiden Isoformen sind Calcium-abhängig (Förstermann et al., 1991). Die Stimulation der nNOS und der eNOS erfolgt durch die Bildung eines Calcium-/Calmodulin-Komplexes (Bredt und Snyder, 1990). Demzufolge kann die Aktivierung von Signalwegen, die eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration herbeiführen können, auch eine Stimulation der NO-Synthasen bewirken.

NO dient sowohl der intra- (autokrin) wie auch der interzellulären (parakrin) Kommunikation. Diese wird durch die Eigenschaft der freien Diffusion ermöglicht. NO kann aufgrund der geringen Molekülgröße und des lipophilen Charakters ungehindert durch die Zellmembranen diffundieren und eine Vielzahl von Wirkungen auslösen. Aufgrund seiner geringen Stabilität ist dies aber zeitlich und räumlich sehr stark eingeschränkt. Eine dieser Wirkungen ist die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC).

2.3.2 Bildung von cGMP

Schon Ende der 1970er Jahre konnte festgestellt werden, dass NO-freisetzende Substanzen eine stimulierende Wirkung auf die enzymatische cGMP-Synthese haben (Kimura et al., 1975; Arnold et al., 1977; Böhme et al., 1978). Zyklisches cGMP wird von zwei verschiedenen Enzymen, der löslichen (sGC) und der partikulären Guanylylcyclase (pGC), aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet (siehe Abbildung 4). Die NO-sensitiven Guanylylcyclasen (GC) liegen in der Regel im Zytosol vor und werden deshalb auch als lösliche GC oder sGC („soluble GC“) bezeichnet. Mittlerweile konnte allerdings die Membranassoziation einer der Isoformen der sGC eindeutig gezeigt werden (Russwurm et al., 2001; Zabel et al., 2002). Die partikulären Guanylylcyclasen hingegen sind Transmembranproteine. Anders als die membrangebundenen Isoenzyme liegt die zytosolische Guanylylcyclase als Heterodimer vor (Kamisaki et al., 1986). Das hämhaltige Protein konnte 1981 erstmals aus der Rinderlunge isoliert und als NO-sensitives GC identifiziert werden. Nach der Bindung von NO an die prosthetische Häm-Gruppe der Guanylylcyclase wird das Enzym aktiviert und dadurch cGMP gebildet. NO ist in der Lage, die Guanylylcyclase bis zu 200-fach zu stimulieren

(Gerzer et al., 1981). Der Abbau von cGMP geschieht hingegen durch so genannte Phosphodiesterasen (PDE).

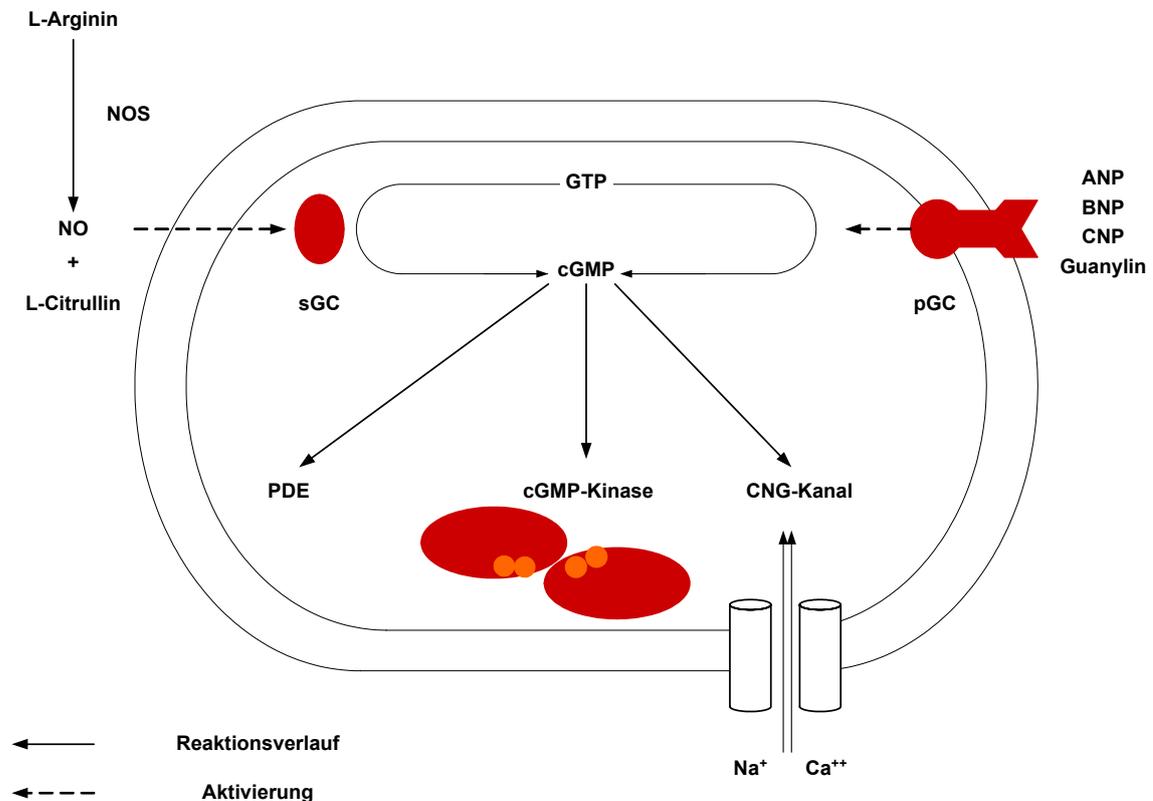


Abbildung 4: Zelluläre Synthesewege von cGMP. Aus L-Arginin wird, katalysiert von der NO-Synthase (NOS), NO und L-Citrullin gebildet. NO aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC), die die Bildung von cGMP aus GTP vermittelt. cGMP kann zudem von der partikulären Guanylylcyclase (pGC) nach Aktivierung durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) oder Guanylin gebildet werden. Zielproteine für cGMP sind Phosphodiesterasen (PDE), cGMP-abhängige Kinasen (cGK) und Zyklo-nukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) (modifiziert nach Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke, 2005).

Die Aktivierung der Guanylylcyclase verläuft im Fall der sGC über Stickstoffmonoxid, bei den drei Isoformen der partikulären Guanylylcyclasen (pGC) durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) und Guanylin (Friebe und Koesling, 2003; Kuhn, 2003) (siehe Abbildung 4). Der sekundäre Botenstoff cGMP beeinflusst verschiedene Enzyme und leitet so das NO-Signal im Körper in verschiedene Zellen weiter.

2.3.3 Rezeptoren von cGMP

Bis zum heutigen Zeitpunkt kennt man drei verschiedene Zielstrukturen von cGMP: die cGMP-kontrollierte PDE, cGMP-abhängige Ionenkanäle und cGMP-abhängige Protein-kinasen (siehe Abbildung 4). Die Aktivierung oder Hemmung der cAMP-spezifischen

Phosphodiesterasen (PDE) stellt einen Angriffspunkt von cGMP dar (Sonnenburg und Beavo, 1994). Diese verringern mittels Hydrolyse die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Münzel et al., 2003). Die cGMP-spezifische PDE 5 ist ein zytosolisches Enzym und wird vorwiegend in der Lunge, in glatter Gefäßmuskulatur, in Thrombocyten, im Corpus Caverosum und in der Niere gebildet. Der cGMP-bindende, regulatorische Bereich befindet sich im N-terminalen Teil der PDE 5 und besteht aus zwei GAF-Domänen (GAF-A und GAF-B). (Aravind und Ponting, 1997; Anantharaman et al., 2001; Kanacher et al., 2002). Neben den GAF-Domänen befindet sich in der Nähe des N-Terminus auch eine Phosphorylierungsstelle (Ser-102). Die PDE 5 kann selektiv durch den Wirkstoff Sildenafil (Viagra) gehemmt werden (Booille et al., 1996). Der therapeutische Effekt von Sildenafil besteht in der synergistischen Wirkung auf die NO/cGMP-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur des Corpus Caverosum und der zuführenden Arterien (Ballard et al., 1998; Corbin und Francis, 1999).

Zyklische-Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) in der Retina oder im olfaktorischen System können durch cGMP geöffnet werden. Diese Kanäle sind für die Signalverarbeitung im Seh- bzw. im Riechprozess von großer Bedeutung (Biel et al., 1998). Des Weiteren führt cGMP zur Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Pfeifer et al., 1999; Ruth, 1999; Hofmann, 2005). Diese Proteinkinasen hemmen unter anderem die Thrombocytenaggregation (Massberg et al., 1999) und führen zur Relaxation des glatten Muskels (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000). Bei sehr hohen Konzentrationen von cGMP können allerdings auch durch Kreuzreaktion die cAMP-abhängigen Proteinkinasen (cAK) aktiviert werden (Kim et al., 2000; Schmidt et al., 2002).

2.3.4 cGMP-abhängige Proteinkinasen

In vielen Geweben sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK) der wahrscheinlich wichtigste Effektor für cGMP. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen wurden zuerst in Athropoden beschrieben (Kuo und Greengard, 1970). Nur wenig später fand man in Säugetieren eine zytosolische, die cGKI (Hofmann und Sold, 1972), und eine membranständige Form, die cGKII (de Jonge, 1981). Während die cGKI als lösliches Enzym vorliegt, ist die cGKII über eine N-Myristoylierung in der Plasmamembran verankert (Hofmann et al., 2000; Feil et al., 2003).

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen gehören zu den Familien der Serin-/Threonin-Kinasen. In Säugetierzellen konnten zwei verschiedene Gene für die cGKI und die

cGKII identifiziert werden (Hofmann, 2005). Der Genlocus für die cGKII befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 4. Die cGKI α und β entstehen durch alternatives Splicing des für den Aminoterminus codierenden Bereichs auf dem Chromosom 10 (human) (Francis et al., 1988; Lohmann et al., 1997; Ruth et al., 1997). Der einzige strukturelle Unterschied der cGKI α und cGKI β liegt in den ersten 89-104 Aminosäuren. Bei den cGKs handelt es sich um Homodimere, deren monomere Untereinheiten ein Molekulargewicht von 76 bis 78 kDa (cGKI) bzw. von 86 kDa (cGKII) aufweisen (Sandberg et al., 1989; Wernet et al., 1989). Da sie zu der Familie der Serin-/Threonin-Kinasen gehören, übertragen sie ein γ -Phosphat von ATP auf ein Serin oder Threonin ihrer Substrate (Hofmann et al., 2000). In der Grundstruktur der Kinasen kann man drei funktionelle Untereinheiten unterscheiden, eine aminoternale, eine regulatorische und eine katalytische Domäne (Hofmann, 2005). Der Aminoterminus kann in eine Isoleucin/Leucinzipper-Region und eine Linker-Region unterteilt werden und ermöglicht die Homodimerisierung der Enzyme und die Interaktion mit anderen Proteinen (Atkinson et al., 1991; Surks et al., 1999; Ammendola et al., 2001). Der Aminoterminus der cGKI besitzt drei Funktionen, die Dimerisierung durch die Isoleucin-/Leucinzipper-Region, die Autoinhibierung der katalytischen Domäne bei Abwesenheit von cGMP und die intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms (Atkinson et al., 1991; Hofmann et al., 1992; Hofmann, 2005).

Die Bindung von cGMP an zwei Bindungstaschen pro regulatorischer Domäne führt zur Aktivierung der cGK (Kuhn, 2003). Die beiden aufeinander folgenden cGMP-Bindungsstellen gehören zu der Familie der CAP-Domänen (catabolite activator protein). Die katalytische Domäne beinhaltet eine Mg^{2+} -ATP und eine Substrat-Bindungsstelle (Hofmann, 2005). cGMP bewirkt eine Konformationsänderung und legt damit die katalytischen Zentren frei.

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen konnten in einer Vielzahl von Geweben und Zellen nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration der cGKI α findet sich in Lunge, Herz und Cerebellum, während die cGKI β überwiegend in glattmuskulären Geweben, wie Aorta, Blutgefäße, Intestinum, Trachea sowie in Thrombocyten nachgewiesen werden konnte (Lincoln et al., 1988; Keilbach et al., 1992; Schlossmann und Hofmann, 2005).

Die cGKII wird vor allem in verschiedenen Hirnregionen, in der intestinalen Mucosa sowie in der Niere, der Lunge und in den Chondrozyten exprimiert (Lohmann et al., 1997; Schlossmann und Hofmann, 2005).

2.3.5 Wirkungsmechanismen der cGMP-Kinasen

Die physiologische Bedeutung der cGMP-Kinasen ist entsprechend ihrer Lokalisationen sehr vielfältig. Die membrangebundene cGKII greift in die Regulation der intestinalen Sekretion durch die Phosphorylierung des CFTR Chloridkanals (zystische Fibrose Transmembran-Leitfähigkeitsregulator) ein, wodurch sie die Ausscheidung von Chlorid und Wasser im Intestinum erhöht (Gambaryan et al., 1996; Pfeifer et al., 1996; Lohmann et al., 1997; Vaandrager et al., 1997; Vaandrager et al., 1998). Darüber hinaus beeinflusst sie die Reninfreisetzung in der Niere (Wagner et al., 1998). Da cGKII defiziente Mäuse ein verkürztes Knochenwachstum zeigen, scheint es nahe liegend, dass die cGKII Einfluss auf die enchondrale Ossifikation nimmt (Pfeifer et al., 1996; Miyazawa et al., 2002; Chikuda et al., 2004). Die cGKI hemmt unter anderem die Aggregation von Thrombocyten (Horstrup et al., 1994; Massberg et al., 1999), und unterdrückt die Migration und die Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen (Yu et al., 1997; Komalavilas et al., 1999). Eine entscheidende Bedeutung nimmt die cGKI bei der Relaxation des glatten Muskels ein. Dies konnte anhand von Mausmutanten, denen die cGKI fehlt, gezeigt werden. Diese Mäuse weisen neben einer geringen Lebenserwartung einen erhöhten Blutdruck und gastrointestinale Störungen, wie eine verzögerte Magen-Darm-Passage, auf (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000).

2.3.5.1 CGKI-vermittelte Relaxation des glatten Muskels

Seit der Generierung der cGKI defizienten Maus ist bekannt, dass die cGKI maßgeblich an der Relaxation der glatten Muskulatur beteiligt ist (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000). Dabei greift die cGKI in eine Vielzahl von zellulären Prozessen ein. Sie ist nicht nur über die Senkung der zytosolischen Calciumkonzentration, sondern auch über Calcium-unabhängige Mechanismen an der Relaxation der glatten Muskulatur beteiligt (Bonnevier et al., 2004). Im Folgenden soll ein Überblick über die bekannten Wirkmechanismen der cGKI gegeben werden (siehe Abbildung 5).

Ein möglicher Weg ist die Phosphorylierung von Rho (kleines GTP-bindendes Protein) durch die cGKI. Der dadurch gestörte GDP/GTP- Austausch bewirkt eine anhaltende Inaktivität der Rho-Kinase, infolgedessen die MLCP aktiv bleibt (siehe Abbildung 3). Dies führt zu einer reduzierten Sensitivität des kontraktilen Apparates für intrazelluläres Calcium (Somlyo und Somlyo, 2000; Pfitzer, 2001).

Ein weiterer Mechanismus ist die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit der MLCP (MYPT1) durch die α -Isoform der cGKI. Durch diese Phosphorylierung

wird die MLCP aktiviert und eine weitere Phosphorylierung der rMLC über die MLCK verhindert (siehe Abbildung 3) (Wooldridge et al., 2004; Schlossmann und Hofmann, 2005).

Ein weiteres Target der cGKI ist das so genannte RGS-2. RGS steht für „Regulators of G-protein signalling“. Die cGKI phosphoryliert das RGS-2 und führt zu dessen Bindung an das Gq-Protein und einer erhöhten GTPase-Aktivität (Tang et al., 2003; Schlossmann und Hofmann, 2005). RGS-Proteine erhöhen die Aktivität des G-Proteins. Dadurch wird die Halbwertszeit des an das G-Protein gebundene GTP verringert (Hepler, 1999; Hepler, 2003).

Ein weiterer Angriffspunkt für die cGKI ist die Phospholipase C β_3 . Durch die Phosphorylierung der Phospholipase C β_3 reguliert die cGKI direkt die Synthese von IP $_3$ (Ruth et al., 1993; Xia et al., 2001; Schlossmann und Hofmann, 2005). Es ist allerdings nach wie vor unklar, inwieweit die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Relaxation des glatten Muskels hat.

Durch spannungsabhängige Calciumkanäle fließt Calcium aus dem Extrazellulärraum in das Innere der Zelle. Die Phosphorylierung der Calcium aktivierten Kaliumkanäle (BK $_{Ca}$) durch die cGKI erhöht deren „Offenwahrscheinlichkeit“ und bewirkt eine Hyperpolarisation der Membran. Dadurch werden Calciumkanäle geschlossen und der Calciumeinstrom in die Zelle vermindert, wodurch die Calciumkonzentration sinkt (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999; Hofmann et al., 2000). Neuere Studien am glatten Muskel der Blase bestätigen die Funktion der BK $_{Ca}$ Kanäle bei der Regulation des Muskeltonus. Das Fehlen dieser Kanäle in der glatten Muskulatur der Blase führt zu einer erhöhten basalen Kontraktilität und damit zu einer Überfunktion der Blase und zu Inkontinenz (Meredith et al., 2004).

Die cGKI reguliert einerseits den Calciumausstrom aus dem ER, andererseits die Wiederaufnahme von Calcium in das ER, ausgelöst durch die spezifische Calcium ATPase. Nach der Aktivierung von Phospholamban, ausgelöst durch die cGKI, wird die Affinität der SERCA für Calcium und die Aufnahme von Calcium in die intrazellulären Speichervehikel des ER erhöht (Raeymaekers et al., 1988; Koller et al., 2003).

Der IP $_3$ -Rezeptor selbst wird ebenfalls von der cGKI phosphoryliert (Komalavilas und Lincoln, 1996). Es ist aber noch nicht geklärt, ob diese Phosphorylierung direkt auf die Calciumfreisetzung aus dem ER Einfluss nimmt (Haug et al., 1999).

Ein kürzlich neu identifiziertes Substrat der cGMP-Kinase I ist das IP₃-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG (siehe auch 2.4). Die cGKI β phosphoryliert IRAG und liegt dann mit IRAG und dem IP₃-Rezeptor Typ I in einem trimeren Komplex an der Membran des ER vor. Durch die Phosphorylierung von IRAG wird der Calciumausstrom aus dem ER gehemmt, wodurch die zytosolische Calciumkonzentration sinkt (Schlossmann et al., 2000; Ammendola et al., 2001; Geiselhöringer et al., 2004a).

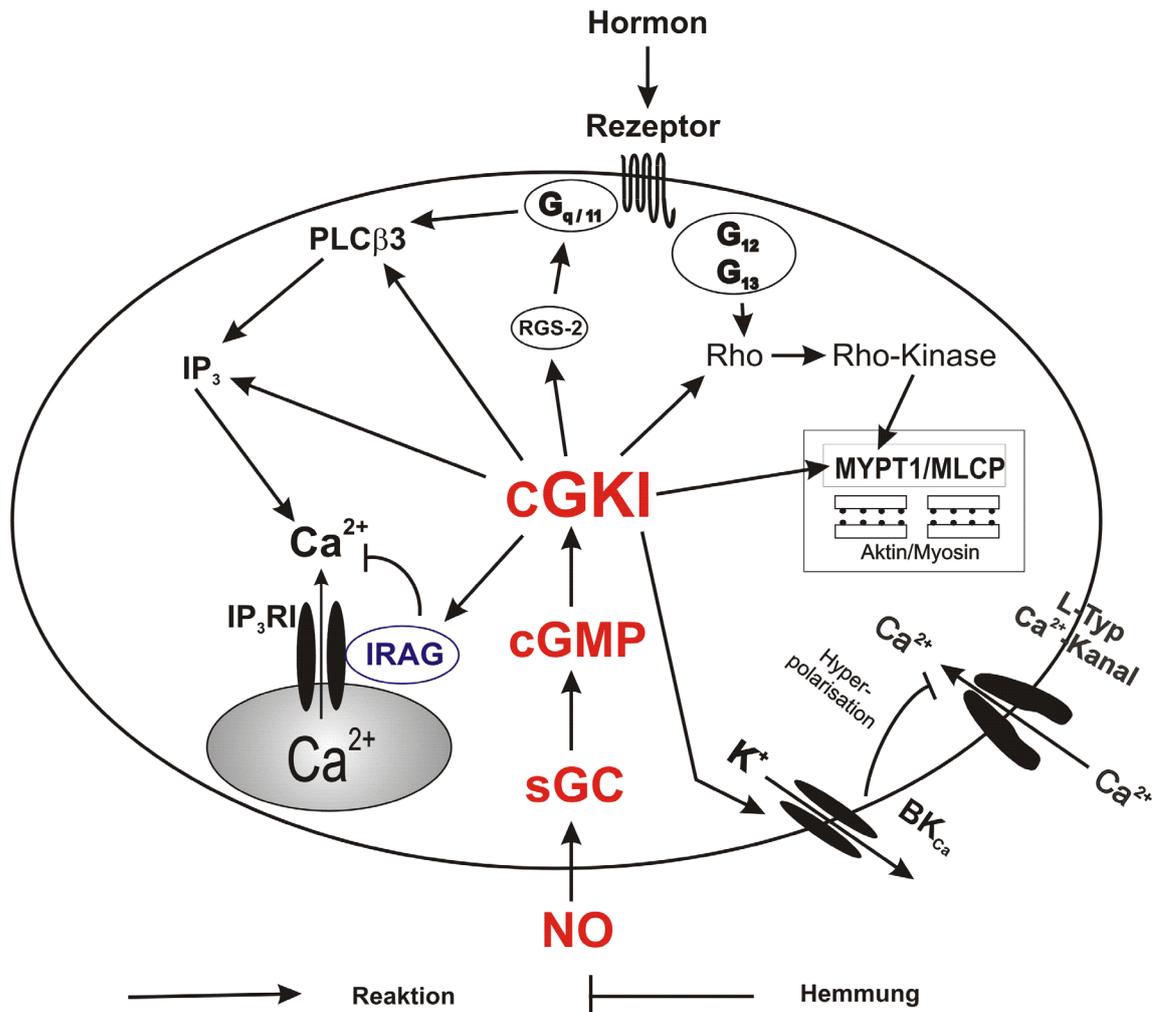


Abbildung 5: Schema für die cGKI-abhängige Relaxierung der glatten Muskulatur. BK_{Ca}, RGS-2, IRAG, MYPT1, PLCβ3, IP₃ und Rho sind Substratproteine der cGKI, deren Phosphorylierung eine Relaxierung der glatten Muskulatur zur Folge haben können.

2.4 Identifizierung, Struktur und Funktion von IRAG

Bereits 1974 wurde beschrieben, dass in den Membranen des glatten Muskels Substratproteine der cGK vorhanden sind (Casnellie und Greengard, 1974). Vor ein paar Jahren konnte eines dieser cGKI-Substratproteine identifiziert werden. Dieses als IRAG

(IP₃-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat) bezeichnete Protein wurde in mikrosomalen Membranen des Musculus trachealis des Rindes durch Affinitätschromatographie nachgewiesen (Schlossmann et al., 2000). IRAG wird von der cGKI cGMP-abhängig phosphoryliert und liegt zusammen mit dem IP₃-Rezeptor Typ I und der β-Isoform der cGKI als ein trimerner Komplex vor. Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnten fünf cGMP-abhängige Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (siehe Abbildung 6). Es existieren zwei Isoformen: IRAGa und IRAGb. Der Unterschied zwischen den beiden Isoformen liegt darin, dass IRAGa eine zusätzliche, aus 52 Aminosäuren bestehende, N-terminale Sequenz besitzt. Für beide Isoformen konnte eine C-terminale Transmembrandomäne (TM) mit Hilfe von Hydropathie-Analyse identifiziert werden.

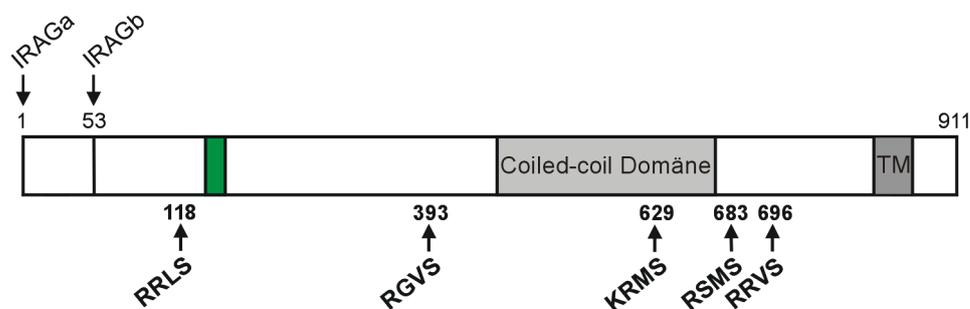


Abbildung 6: Proteinstruktur von IRAG. ↓: Die beiden Spleißvarianten IRAGa und IRAGb. ↑: Aminosäurepositionen und Konsensussequenzen der fünf identifizierten Phosphoserine für die Phosphorylierung durch die cGKIβ. Grünes Rechteck: Interaktionsstelle mit der cGKIβ. TM: Transmembrandomäne.

Durch diese C-terminale TM wird IRAG in der Membran des ER verankert. Die zentral liegende Coiled-coiled Domäne von IRAG enthält die Interaktionsstelle mit dem IP₃-Rezeptor Typ I. Die Interaktionsstelle von IRAG mit der cGKI liegt im N-terminalen Bereich des Proteins und ist ca. 33 Aminosäuren lang. Diese Interaktionsstelle interagiert ausschließlich mit der „Leucinzipper“-Region der cGKIβ, aber nicht der cGKIα oder mit der cGKI_{II} (Ammendola et al., 2001). IRAG kommt ähnlich wie die cGKIβ, vor allem in glattmuskulären Geweben, wie Aorta, Uterus, Blase und im Gastrointestinaltrakt vor (Geiselhöringer et al., 2004a). Mittlerweile konnte IRAG auch noch in anderen Geweben oder Zellen, wie Thrombocyten oder Thalamus, nachgewiesen werden (Geiselhöringer et al., 2004a).

Aufgrund der Komplexbildung von IRAG mit der cGKI und dem IP₃-Rezeptor Typ I wurde angenommen, dass IRAG an der Regulation der IP₃-vermittelten Calciumfreisetzung beteiligt ist. In der Tat hemmt IRAG in COS-7-Zellen nach Aktivierung durch

die cGKI β , die IP₃-induzierte Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern (Schlossmann et al., 2000). IRAG ist ebenfalls in isolierten glatten Muskelzellen der murinen Aorta bzw. des humanen Colons an der NO/cGMP- induzierten Hemmung der Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern beteiligt (Geiselhöringer et al., 2004b; Fritsch et al., 2004).

2.5 Ziele dieser Arbeit

Die bisherigen Befunde deuten daraufhin, dass IRAG eine wichtige Rolle bei der Regulation der Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern spielt und damit auch an der Relaxation der glatten Muskulatur beteiligt sein könnte. Die genaue Funktion von IRAG im glatten Muskel ist noch nicht bekannt. Mit Hilfe der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Maus, einer Mausmutante, der ein intaktes IRAG fehlt, sollte im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Rolle von IRAG bei der Regulation des kontraktile Tonus im glatten Muskel untersucht werden. Da sich der Phänotyp dieser Maus vor allem im Gastrointestinaltrakt ausbildet, waren die unterschiedlichen Darmabschnitte von besonderer Bedeutung. Hierzu sollte durch Kraftmessungen die unterschiedliche Funktion von IRAG in den verschiedenen Darmabschnitten untersucht werden. Mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen und Röntgenkontrastuntersuchungen sollten auch die Auswirkungen des fehlenden Gens auf den Stoffwechsel, die Nahrungsaufnahme und die gastrointestinale Motorik detaillierter erfasst werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten normale und genetisch veränderte Mauslinien aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München. Für die Versuche wurden Wildtyp, heterozygote $IRAG^{+/\Delta 12}$ -, homozygote $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse und $cGKI^{-/-}$ Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Bei der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus handelt es sich um eine Deletionsmutante, bei der das Exon 12 des IRAG Gens deletiert wurde. Dieses Exon codiert für 47 AS im N-terminalen Bereich der Coiled-coiled Domäne. Dadurch wird die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP_3 -Rezeptor Typ I zerstört. Demzufolge ist das gebildete Protein um etwa 5 kD kleiner als bei Wildtypmäusen (Geiselhöringer et al., 2004a). Die $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ -, die heterozygoten $IRAG^{+/\Delta 12}$ - und die Wildtypmäuse sind auf dem genetischen Hintergrund SV129 gezüchtet. Die für die Messungen verwendeten Tiere waren im Alter zwischen neun und 25 Wochen. Die drei bis fünf alten Wildtyp $cGKI$ und $cGKI^{-/-}$ Geschwisterpaare sind ebenfalls auf dem genetischen Hintergrund SV129 gezüchtet. Bei dieser Maus handelt es sich um einen vollständigen Knockout, bei dem beide Isoformen der $cGKI$ (Isoform α und β) nicht mehr exprimiert werden (Tierversuchs-Genehmigung AZ: 211-2531-120/99 vom 10.02.04).

3.2 Tierhaltung

Alle Experimente genügen den aktuellen Tierschutzbestimmungen. Die Versuchstiere werden in einem Tierraum unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur beträgt 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%. Eine Beleuchtungsanlage sorgt für einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tierräume werden ausschließlich mit Schutzkleidung, bestehend aus Kittel, Überschuhe, Haube, Mundschutz und Handschuhen, betreten. Die Mäuse werden in Makrolon-Käfigen (maximal fünf adulte Tiere in einem Typ II-Käfig, maximal 12 adulte Tiere in einem Typ-III Käfig), gehalten. Als Einstreu dienen autoklavierte Weichholzspäne (Altromin). Die Einstreu der Käfige wird einmal in der Woche gewechselt. Bei Bedarf erhalten die Mäuse Nistmaterial („Nestlets“ Emsicon). Wasser und Futter steht den Tieren zur freien Verfügung (pelletierte Standarddiät Altromin 1314 Ratte/Maus).

Zur Zucht werden i.d.R. jeweils zwei geschlechtsreife Weibchen (Alter fünf bis 30 Wochen) zu einem geschlechtsreifen Männchen (Alter sechs Wochen bis 1 1/2 Jahre) gesetzt. Im Alter von vier Wochen werden die Jungtiere von der Mutter abgesetzt und nach Männchen und Weibchen getrennt. Die Genotypisierung der Tiere erfolgt mittels einer Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR). Zu diesem Zweck wird den Mäusen im Alter von ca. fünf bis zehn Tagen eine Zehe kupiert und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt (Werner, 2002).

3.3 Untersuchung der Darmpassage mit Bariumsulfat

Auf Grund des ausgeprägten Phänotyps im Magen-Darm-Trakt der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus wurde mittels Röntgenkontrastuntersuchungen die Nahrungspassage untersucht. Röntgenkontrastmittel erhöhen den Kontrast von Organen und Organsystemen. Sie werden verwendet, um Gewebe ähnlicher Röntgendichte besser differenzieren und um Funktionsstudien durchführen zu können. Röntgenkontrastmittel müssen prinzipiell für den Körper unschädlich sein und via naturalis wieder ausgeschieden werden. Die Kontrasterhöhung kann durch Substanzen sehr geringer oder sehr hoher Absorption erfolgen. Durch das Kontrastmittel wird die Absorption der Röntgenstrahlen im Inneren des Darms verändert, so dass er sich im Röntgenbild deutlicher hervorhebt. Bariumsulfat ist ein Positiv-Kontrastmittel und liegt als Suspension (BaSO₄) vor. Positive Kontrastmittel sind für Röntgenstrahlen weniger durchlässig als Weichteilgewebe und daher erscheinen die Organe im Bild weiß. Zur Versuchsvorbereitung werden die Tiere ca. zwei Wochen vor der Untersuchung an eine Manschette gewöhnt, mit deren Hilfe das Tier am Röntgentisch fixiert wird. Diese Baumwollmanschette soll ein übermäßiges Zappeln der Tiere verhindern. Vier bis sechs Stunden vor Beginn der Untersuchung wird den Tieren die Nahrung entzogen, Wasser steht die ganze Zeit ad libitum zur Verfügung. Im nicht narkotisierten Zustand wird den Mäusen mit Hilfe einer Schlundsonde 0,3 ml Röntgenkontrastmittel (Bariumsulfat, Micropaque®, Guerbet, Sulzbach, Germany) verabreicht. Nach 2, 30 und 60 Minuten werden Röntgenaufnahmen angefertigt. Zur Analyse werden jeweils IRAG^{Δ12/Δ12}- und Wildtyp- Geschwisterpärchen herangezogen. Die Untersuchung selbst fand an der Klinik für Chirurgie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München statt. Als Röntgengerät kam der Siregraph D2 von Siemens zum Einsatz, bei der Belichtungsmaschine handelte es sich um einen Polymar 70. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit Agfa ADC Kompakt sofort nach der Belichtung. Als Platten wurden MADCCMD played verwendet.

3.4 Körpergewichtsentwicklung

Die Entwicklung des Körpergewichts wird durch ein Wiegeprotokoll aufgezeichnet. Mit Hilfe einer Präzisionswaage kann das Körpergewicht der Mäuse auf 0,1 g genau erfasst werden. Die Tiere wurden ab einem Alter von zwei Wochen bis zu einem Alter von ca. 28 Wochen zweimal pro Woche gewogen und das Gewicht dokumentiert.

3.5 Untersuchung der Stoffwechselfvorgänge

Die Untersuchung der Stoffwechselfunktionen soll Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des Körpergefüges und vor allem über die Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen liefern. Für diese Untersuchungen wird eine Versuchsmaus für einen Tag der Woche in einen speziell angefertigten Bilanzkäfig gesetzt. Durch ein am Boden befindliches Gitter wird die Kollektion von Exkrementen ermöglicht und zum anderen wird eine Verschleppung der Futterreste durch die Tiere im Käfig unterbunden. Unter dieses Gitter kann ein Blotpapier (GB 002 von Schleicher und Schuell) durch einen Schlitz im Käfig geschoben werden. Nach einer Stunde wird dieses wieder entfernt. Der entstandene Harnfleck wird dann ausgeschnitten und gewogen. Der Vorgang wird am nächsten Tag wiederholt.

Zur Ermittlung des Wasserverbrauchs werden die Trinkflaschen an zwei aufeinander folgenden Tagen zur selben Zeit gewogen. Die Differenz ergibt den Tages-Wasserverbrauch der einzelnen Tiere.

Analog wird der Futterverbrauch ermittelt. Das Futter wird beim Umsetzen und nach 24 Stunden erneut gewogen. Auch hier ergibt die Differenz aus beiden Messungen den Tages-Futterverbrauch der Tiere.

Durch das im Käfig vorhandene Gitter kann die in 24 Stunden entstandene Kotmenge gesammelt und dann die Tageskotmenge ermittelt werden.

3.6 Kraftmessungen am glatten Muskel

Isometrische Kraftmessungen stellen eine gute Methode dar, um die physiologische Bedeutung des cGKI Substratproteins IRAG für die Relaxation der glatten Muskulatur zu untersuchen. Da der Phänotyp dieser Maus sich vor allem im Gastrointestinaltrakt ausbildet, wird Darmgewebe für die Untersuchungen herangezogen. Zur Untersuchung kamen das Colon und die einzelnen Dünndarmabschnitte. Die isometrische

Kraftentwicklung von Muskelpräparaten wird mit einem induktiven Kraftmesser (Myograph601, Danish Myo Technology www.dmt.dk) und einem Datenerfassungssystem aufgezeichnet. Als Präparate wurden Längssegmente aus dem Colon, Ileum, Jejunum und Duodenum verwendet. Zusätzlich sollten im Rahmen dieser Untersuchung auch Ringsegmente des Colons erforscht werden.

3.6.1 Substanzen, Lösungen und Stammlösungen

Alle verwendeten Chemikalien und Salze wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit verwendet.

3.6.1.1 Lösungen

In den Versuchen wurde Tyrodelösung mit der in der nachfolgenden Tabelle beschriebenen Zusammensetzung verwendet.

Zusammensetzung der CO₂ Tyrode und der K⁺ 85 mM Tyrode:

CO ₂ Tyrode		K ⁺ 85 mM Tyrode	
NaCl	136,9 mM	NaCl	57 mM
KCl	5,4 mM	KCl	85 mM
CaCl ₂	1,8 mM	CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1,05 mM	MgCl ₂	1,05 mM
NaHCO ₃	11,9 mM	NaHCO ₃	11,9 mM
NaH ₂ PO ₄	0,42 mM	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
Glucose	5,6 mM	Glucose	5,6 mM

Die Lösungen wiesen nach Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) einen pH von 7,4 auf. Alle Versuche wurden in CO₂ Tyrode durchgeführt. Die K⁺ 85 mmol/l Tyrode hingegen wurde zur Stimulation der Kontraktion durch Depolarisierung benutzt.

3.6.1.2 Substanzen

Die folgenden Substanzen wurden bezogen von:

- Calyculin A
Alexis (alexis-d@alexis-corp.com)
- cBIMPS
Biolog (www.biolog.de)
- Carbamylcholin-hydrochlorid (Carbachol, CCh)
Sigma (www.sigma-aldrich.com)
- 8-Br-cGMP
Biolog (www.biolog.de)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
Sigma (www.sigma-aldrich.com)
- Lanthan-Chlorid
Sigma (www.sigma-aldrich.com)
- IBMX (3 Isobutyl-1methylxanthine)
Sigma (www.sigma-aldrich.com)
- Thapsigargin
Alexis, (alexis-d@alexis-corp.com)

Alle nicht aufgeführten Substanzen wurden von Sigma bezogen

3.6.1.3 Stammlösungen

CCh wird als 1 M Stammlösung in Aqua bidest gelöst. Eine 100 mM Stammlösung von 8-Br-cGMP wird in doppelt destilliertem Wasser angesetzt. CCh wird bei 4°C, 8-Br-cGMP wird bei -20°C aufbewahrt.

Alle organischen Substanzen wurden in DMSO gelöst und in der entsprechenden Konzentration zugegeben. cBIMPS und Thapsigargin wurden in DMSO als Stammlösung unterschiedlicher Konzentrationen gelöst und bei -20°C aufbewahrt. DMSO alleine hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter.

3.6.2 Präparate

Die Mäuse werden durch transzervicale Dislokation euthanasiert und auf dem Rücken fixiert. Das Fell über dem Abdomen wird mit 80%-igem Ethanol desinfiziert.

Die Eröffnung des Abdomens erfolgt in der Medianen. Das Darmkonvolut wird nach links extraperitoneal verlagert, bis der jeweilig zu untersuchende Teil des Darms gut darzustellen ist.

3.6.2.1 Präparation des Colon Längsmuskels

Die Gesamtlänge des Colons beträgt bei einer adulten Maus ca. 9 cm. Das Colon besteht aus einem ascendierenden, einem transversalen und einem deszendierenden Teil, der ohne klare Trennung in das Rectum übergeht. Nach Eröffnung der Bauchhöhle und Freilegen des Colons wird es am cranialen bzw. caudalem Ende durchtrennt. Nachdem das Gekröse und die Blutgefäße großzügig entfernt sind, wird das Colon in eine mit Tyrode gefüllte Präparierschale gelegt. Die in der Schale befindliche Tyrodelösung ist vorher auf 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) erwärmt und mit Carbogen begast worden. Nach sorgfältiger Befreiung des Colons von noch vorhandenem Bindegewebe, Bändern, Gekröse und Blutgefäßen wird es vorsichtig mit Hilfe einer Spritze gespült, bis es vollkommen leer ist. Der Darm wird dann in ca. 5 mm lange Stücke segmentiert. Durch die beiden Enden eines jeden Stückes wird mit Hilfe einer Pinzette ein handelsüblicher Nähfaden gezogen und mit zwei Knoten befestigt. Mit diesem Faden wird an jedem Ende eine Schlaufe geformt, durch die das Präparat an den Kraft-Aufnehmern fixiert wird.

3.6.2.2 Präparation des Ringmuskels am Colon

Das Colon wird entsprechend der Präparation des Längsmuskels aus der Abdominalhöhle entnommen. Nachdem Fett und überschüssiges Gewebe entfernt und das Colon von Kot befreit ist, wird es in ca. 3 bis 4 mm große Segmente unterteilt. Durch das Darmlumen der einzelnen Segmente wird jeweils chirurgisches Nahtmaterial (Seide, schwarz, geflochten, Metric 1 von der Firma Vökel) vorsichtig hindurch gezogen. Die Seidenfäden werden anschließend an der langen Seite des Präparates verknotet. Mit Hilfe der mit den Seidenfäden geformten Schlaufe werden die Präparate an den L-förmigen Kraftaufnehmern befestigt.

3.6.2.3 Präparation des Längsmuskels am Duodenum

Nach Eröffnung der Bauchhöhle und Identifizierung des Magens wird das Duodenum ca. 1 bis 2 cm nach dem Pylorus durchtrennt. Die Plica Duodenocolica, die Colon und Duodenum verbindet, dient zur Identifizierung des distalen Endes des Duodenums. Nach dem Durchtrennen des Duodenums am Ende dieser Plica und der groben

Entfernung des Gekröses, der Blutgefäße und des Bindegewebes wird das Duodenum ebenfalls in eine mit warmer Tyrodelösung gefüllten Präparierschale gelegt. Darüber hinaus wird mit den Präparaten genauso verfahren wie mit den Längsmuskelpräparaten des Colons.

3.6.2.4 Präparation des Längsmuskels des Ileums

Die Identifikation des relativ kurzen aber, kräftigen, auch als Hüft darm bezeichneten, Ileums geschieht mit Hilfe der antimesenterial befestigten Plica ileocaecalis. Diese Plica definiert die Ausmaße dieses Darmabschnittes. Nach der Entnahme des Darmabschnittes wird mit dem Präparat genauso verfahren wie mit den vorher beschriebenen Präparaten.

3.6.2.5 Präparation des Längsmuskels am Jejunum

Das Jejunum stellt den längsten Dünndarmabschnitt dar. Dieser befindet sich zwischen Duodenum und Ileum und wird demnach genauso identifiziert. Die Präparation der einzelnen Darmsegmente erfolgt genauso wie bereits bei den anderen Längsmuskelpräparaten beschrieben.

3.6.3 Versuchsablauf und Durchführung

3.6.3.1 Colon Längsmuskel

Die Kraftmessungen erfolgen durch Befestigung der Colonpräparate horizontal in einem mit 5 ml Tyrode gefüllten Organbad an den L-förmigen Kraft-Aufnehmern (Myograph601, Danish Myo Technology www.dmt.dk). Die Tyrode in den Organbädern wird die gesamte Versuchsdauer bei 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) gehalten und mit Carbogen begast. Die Colonpräparate werden mechanisch auf ca. 10 mN vorgedehnt. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustands werden die Präparate mit CCh, Kalium, oder Thapsigargin stimuliert. Die dadurch induzierte Kontraktion wird als Bezugspunkt auf 100% gesetzt. Carbachol (CCh) besitzt eine ausgeprägte Wirkung auf glattemuskuläre Organe im Abdomen, speziell im Verdauungsapparat, und wird deshalb zu Stimulation, z. B. bei postoperativen Atonien, verwendet. CCh ist ein Acetylcholin-Analogon, das auf die Acetylcholin-Rezeptoren wirkt, aber anders als Acetylcholin (ACh) verzögert durch die Acetylcholinesterase (ACE) abgebaut wird. Zum Auswaschen des CChs (10 μM) bzw. des Kaliums (85 mM) wird sechsmal mit je 5 ml Tyrode gespült. Anschließend wird erneut mit Hormon bzw. Kalium stimuliert. Die dritte in dieser Arbeit

verwendete Stimulationsart ist die Hemmung der SERCA durch Thapsigargin. Dieser SERCA-Inhibitor führt zu einer langsamen Entleerung der intrazellulären Speicher und damit zum Anstieg der Calciumkonzentration in der Zelle, da das im Zytosol vorhandene Calcium nicht in die Speicher zurückgepumpt werden kann. Zusätzlich kommt es zur Öffnung der so genannten store operated channels (SOCs). Durch diese kommt es zum Einstrom von Calcium in das Zytosol (SOCE). Nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes (nach ca. 20 min) werden verschiedene Inhibitoren zugegeben. Zur Relaxation wurde 8-Br-cGMP verwendet. Das cGMP-Analogon kam zum Einsatz, da es einerseits aufgrund seiner Lipophilie die Zellmembran passieren kann, andererseits aber auch von den Phosphodiesterasen nicht so leicht abgebaut wird (Ruth et al., 1991). Zur Definierung des Nullwertes und als Positiv-Kontrolle wurden die Präparate mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100 μ M) am Ende jedes Versuches maximal erschlafft. IBMX ist eine Substanz, die sehr permeabel für die Zellmembran ist und dadurch leicht in die Zelle gelangen kann.

Bei den Versuchen zur repetitiven Stimulation werden die Präparate 4-mal mit CCh stimuliert, wobei zwischen den einzelnen Schritten CCh immer wieder ausgewaschen wird. Zwischen der dritten und vierten Stimulation wird mit 8-Br-cGMP für ca. 20 min vorinkubiert.

3.6.3.2 Colon Ringmuskel

Die 5 ml Tyrode in den Organbädern wird ebenfalls auf 37°C erwärmt und die gesamte Versuchsdauer mit Carbogen begast. Die Vordehnung der Präparate beträgt diesmal zwischen 4 und 7 mN. Nach Einstellung des Gleichgewichtszustandes werden die Präparate ebenfalls mit CCh stimuliert. Zum Auswaschen des CChs wird sechsmal mit je 5 ml Tyrode gespült und anschließend erneut mit CCh stimuliert. Nachdem der „Steady State“-Zustand erreicht ist, wird 8-Br-cGMP hinzugegeben. Auch hier wird zur Bestimmung des Nullpunktes mit IBMX eine maximale Erschlaffung hervorgerufen.

3.6.3.3 Dünndarm Längsmuskel

Mit den Präparaten aller drei Dünndarmabschnitte wird genauso verfahren wie mit den Längsmuskelpräparaten des Colons. Die mechanische Vordehnung der Präparate liegt hier zwischen 5 und 10 mN.

3.7 Versuchsauswertung

Die isometrische Kraftentwicklung wird mit einem induktiven Kraftmesser (Myograph601, Danish Myo Technology www.dmt.dk), der an einen Computer angeschlossen ist, aufgezeichnet. Die Relaxation wird als Prozent der initialen Kraftentwicklung nach CCh, Kalium, bzw. Thapsigargin Zugabe errechnet. Für alle untersuchten Parameter werden das arithmetische Mittel und SEM (standard error of mean) errechnet. In Säulendiagrammen sind die Mittelwerte der Resultate verschiedener Substanzwirkungen in Prozent der Kontrolle sowie ihr SEM dargestellt. Das Auswerten der Versuche erfolgt mit Hilfe von OriginPro 6.1. Zur Erstellung der Graphiken wird das Programm GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet.

3.8 Statistische Methoden

Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Original-Aufzeichnungen, Foto oder als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistische Unterschiede werden mit Hilfe des Student t-Test untersucht. Der Student t-Test dient zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normal verteilten Grundgesamtheiten. Sternchen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten an. Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in p angegeben, wobei $p < 0,05$ signifikant (*), $p < 0,01$ sehr signifikant (**) und $p < 0,001$ (***) hoch signifikant bedeutet. Die Signifikanz-Rechnungen werden mit Hilfe von GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt, wobei n die Anzahl der untersuchten Präparate angibt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung physiologischer Parameter der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$

Mutante

Das IP_3 -Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG nimmt in der NO/cGMP/cGKI Signalkaskade eine wichtige Funktion ein. Es stellt das Bindeglied zwischen dem IP_3 -Rezeptor Typ 1 und der cGKI dar. Die kürzlich generierte $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mutante, bei der die Interaktionsstelle mit dem IP_3 -Rezeptor Typ I gestört ist, erlaubt es, die Funktion dieses Proteins näher zu untersuchen. Die $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse sind lebensfähig, zeigen aber massive Veränderungen im gesamten Gastrointestinaltrakt.

4.1.1 Äußeres Erscheinungsbild

Im Alter von acht Wochen gab es keinen Unterschied im Erscheinungsbild von Kontroll- und $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen. Nach einem Zeitraum von ca. zwei Monaten verändert sich das äußere Erscheinungsbild der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse. Sie zeigen ein gestörtes Allgemeinbefinden, Apathie, Bewegungsunlust und eine Kyphose (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: Erscheinungsbild einer Wildtypmaus (A) und einer $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus (B).

Diese Befunde weisen auf Störungen im abdominalen Bereich hin. Nach einem Zeitraum von zwölf Monaten zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Sterblichkeit der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse (siehe Abbildung 8).

4.1.2 Sterblichkeit

Die statistische Analyse ergab eine signifikant höhere Sterblichkeit der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse. Nach sechs Monaten sind ca. 50% der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse gestorben. Zwischen den Wildtypmäusen und den heterozygoten $IRAG^{+/\Delta 12}$ Mäusen konnte in Bezug auf die Sterblichkeit kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (siehe Abbildung 8).

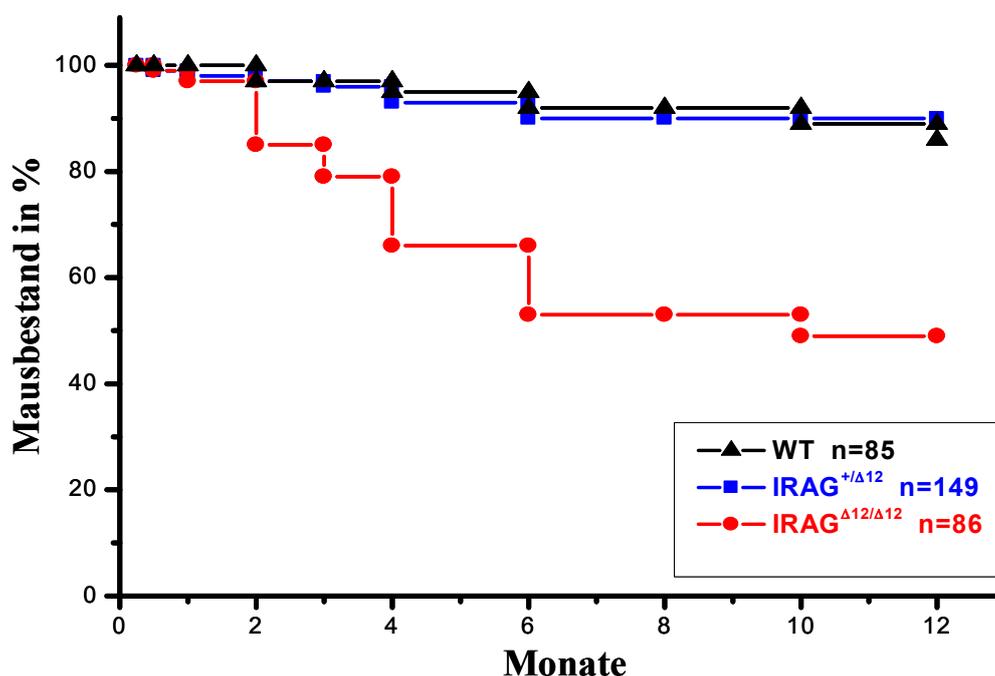


Abbildung 8: Mittlere Sterblichkeitsrate von Wildtyp-, heterozygoten $IRAG^{+/\Delta 12}$ - und $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen. Die Anzahl n der untersuchten Mäuse ist in der Legende für die jeweilige Mauslinie angegeben.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden Parameter untersucht, die Aufschluss über die Ursache der erhöhten Sterblichkeit der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse geben könnten. Parameter für die Entwicklung eines Organismus stellen unter anderem das Gewicht, die tägliche Wasser- bzw. Nahrungsaufnahme und die täglich abgegebene Kot- bzw. Harnmenge dar. Diese Parameter wurden für die drei Mauslinien in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt.

4.1.3 Körpergewichtsentwicklung

Für die Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung wurden über mehrere Monate Mäuse unterschiedlichen Alters zweimal pro Woche gewogen. Die Anzahl n der untersuchten Mäuse betrug zwischen zehn und 20 Stück für jede Lebenswoche. Bei der Untersuchung der Gewichtszunahme konnte mit Hilfe des Student-t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Maustypen festgestellt werden. Auch im Alter von vier bis fünf Monaten, bei der die erhöhte Sterblichkeit schon auffiel, waren alle untersuchten Tiere annähernd gleich schwer. Dies gilt sowohl für die männlichen als auch für die weiblichen Tiere (siehe Abbildung 9).

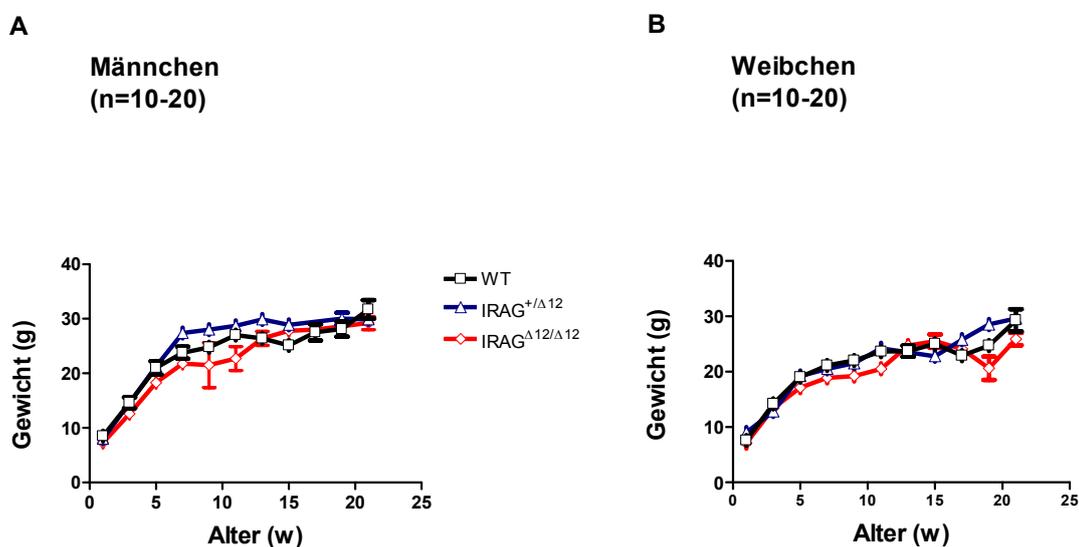


Abbildung 9: Mittelwerte \pm SEM der Körpergewichtsentwicklung von Wildtyp-, heterozygoten IRAG^{+/-Δ12}- und IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen ($n=10-20$). In A ist die Gewichtsentwicklung der Männchen, in B die Gewichtsentwicklung der Weibchen, in Abhängigkeit vom Alter der verschiedenen Maustypen dargestellt.

4.1.4 Trinkwasserverbrauch und Harnabsatz

Sollen Gewebe und Organe ihre physiologischen Funktionen erfüllen, müssen sie von einem wässrigen Milieu umgeben sein. Jeder Organismus gibt jedoch auf unterschiedlichen Wegen Wasser ab. Diese Verluste muss das Individuum ausgleichen, um seine Körperfunktionen aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grunde wurden als weitere Parameter der tägliche Trinkwasserverbrauch und der tägliche Harnabsatz der IRAG^{Δ12/Δ12}-Mutanten gemessen. Es wurden jeweils drei Wildtypmäuse und drei IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse einmal pro Woche über einen Zeitraum von acht Monaten untersucht. Im Alter von 25

Wochen war der Trinkwasserverbrauch bei den Wildtypmäusen signifikant größer als bei den $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen. Die abgegebene Harnmenge der beiden Mausgruppen hingegen blieb die gesamte Versuchsdauer nahezu gleich (siehe Abbildung 10).

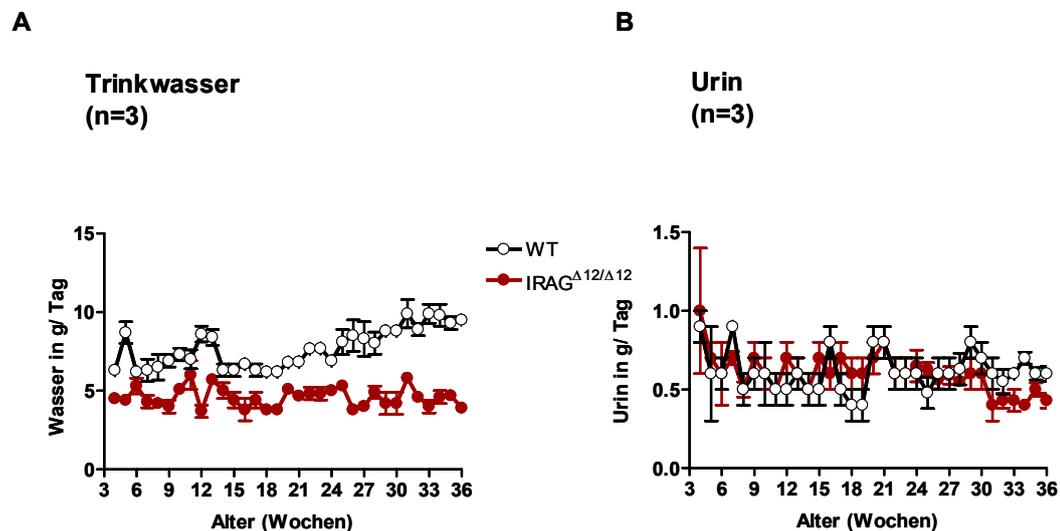


Abbildung 10: Mittelwerte \pm SEM des Wasserverbrauches (A) und des Harnabsatzes (B) von Wildtyp- und $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen ($n=3$). Die schwarze Kurve gibt den zeitlichen Verlauf des Wasserverbrauches bzw. des Harnabsatzes bei den Wildtypmäusen, die rote Kurve bei den $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen wieder.

Da die Anzahl der untersuchten Mäuse aber mit $n=3$ relativ gering ist, sollte man dieses Ergebnis als eine weiter zu untersuchende Tendenz werten.

4.1.5 Futtermittelverbrauch und Kotabsatz

Neben der Wasseraufnahme und dem Harnabsatz geben vor allem Futteraufnahme und Kotabsatz Auskunft über die Funktionsfähigkeit eines Organismus. Deshalb wurde die Futteraufnahme und der Kotabsatz, sowohl bei den Kontroll- als auch bei den $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen untersucht. Für diese Experimente wurden dieselben Mäuse, die schon zu den vorausgegangenen Versuchen herangezogen wurden, verwendet. Um Anhaltspunkte über die Funktion des Gastrointestinaltrakts zu gewinnen, wurde die Kotmenge an einem Tag der Woche über 24 Stunden quantifiziert. Der Anstieg des Futtermittelverbrauchs um die 21. Woche ist wahrscheinlich auf eine Futterumstellung zurückzuführen. Die geringere Energiedichte des neuen Futters könnte das Fressverhalten beider Mausgruppen erklären. Ab einem Alter von ca. acht Wochen zeigte sich eine signifikant geringere Kotalausscheidung der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse. Im Gegensatz dazu blieb

die Futteraufnahme der beiden untersuchten Mausgruppen nahezu gleich (siehe Abbildung 11).

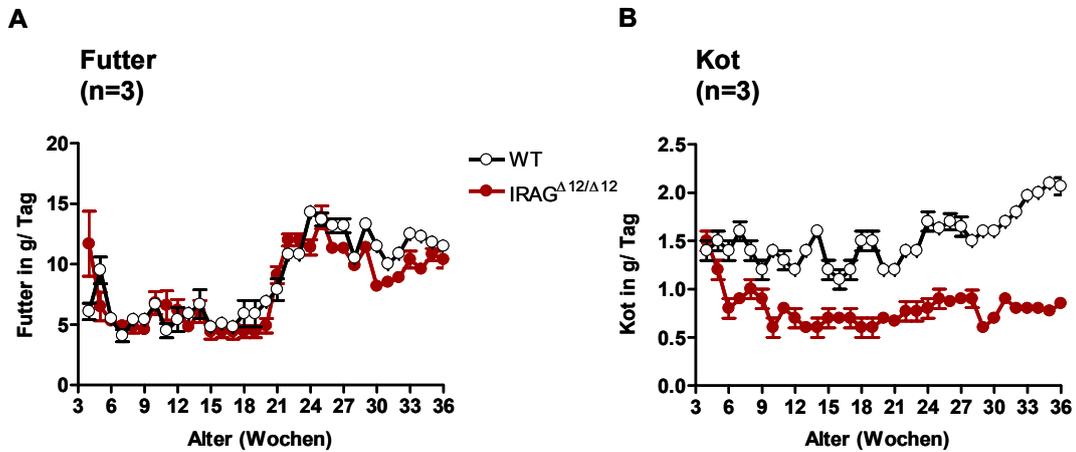


Abbildung 11: Mittelwerte \pm SEM des Futterverbrauches (A) und des Kotabsatzes (B) von Wildtyp- und $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen ($n=3$). Die schwarze Kurve gibt den zeitlichen Verlauf des Futterverbrauchs bzw. des Kotabsatzes bei den Wildtypmäusen, die rote Kurve bei den $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen wieder

Wie schon bei den vorherigen Untersuchungen wurden hier drei Mäuse pro Mauslinie untersucht. Aufgrund der geringen n-Zahl kann man auch hier bei der Bewertung der Ergebnisse nur von Tendenzen sprechen. Trotzdem gibt dieses Ergebnis einen Hinweis auf Probleme der Futterpassage im Magen-Darm-Trakt der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus. Zur genaueren Analyse wurde deshalb die Darmpassage mit Hilfe von Röntgenkontrastmitteln untersucht.

4.1.6 Untersuchung der Darmpassage mit Bariumsulfat

Zur Visualisierung der Darmpassage wurde den Mäusen mit Hilfe einer Magenschlundsonde das Kontrastmittel Bariumsulfat verabreicht und der Passageverlauf zu den Zeiten 2, 30 und 60 Minuten nach Applikation durch Erstellung eines Röntgenbildes verfolgt (siehe Abbildung 12). Bei Bariumsulfat handelt es sich um ein Positiv-Kontrastmittel, deshalb erscheinen die mit Bariumsulfat gefüllten Organe im Bild weiß. In der Abbildung 12 A ist der Kontrastmittelverlauf nach 2 Minuten dargestellt. Bei den Wildtypmäusen ist nach diesem Zeitraum kein Kontrastmittel mehr im Oesophagus vorhanden. Das Bariumsulfat befindet sich bereits im gesamten Magen und am Beginn des Duodenums. Bei der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mutante hingegen kann man deutlich einen

sackförmig erweiterten und mit Bariumsulfat gefüllten Oesophagus, einen so genannten Megaesophagus, erkennen (Kraft et al., 1998). Ferner ist der Magen nur teilweise und das Duodenum noch gar nicht mit Kontrastmittel gefüllt. Während bei der Wildtypmaus im oberen Gastrointestinaltrakt nach 30 min kein Bariumsulfat mehr zu erkennen ist, kann man bei der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus noch deutlich Bariumsulfat im Magen und im Oesophagus feststellen (siehe Abbildung 12 B).

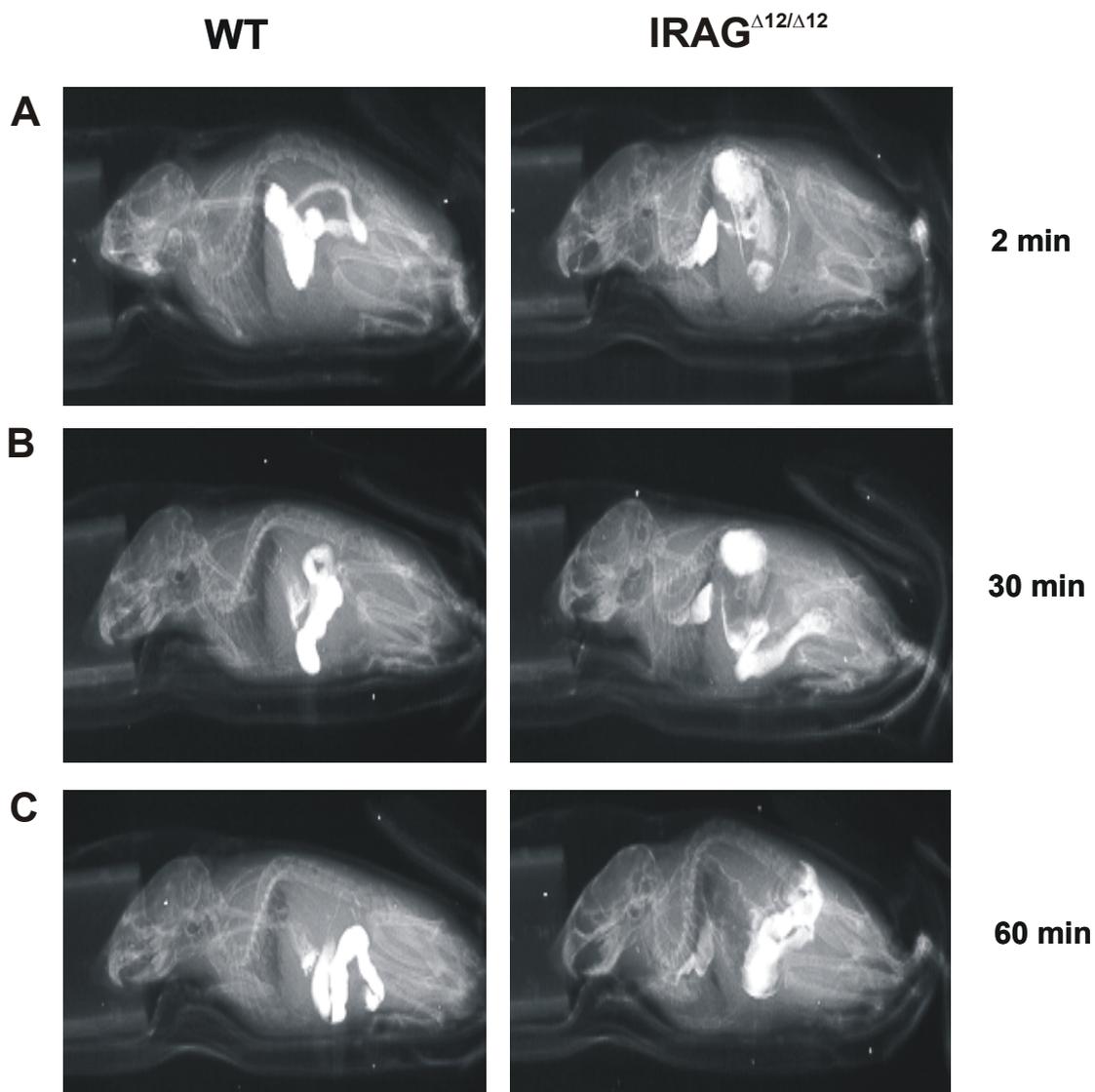


Abbildung 12: Röntgenkontrastuntersuchung der Magen-Darm-Passage mit Bariumsulfat beispielhaft an je einer Wildtyp- und einer $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus. Den Mäusen wurde 0,3 ml Bariumsulfat mit Hilfe einer Magenschlundsonde verabreicht. Die Organe, die Bariumsulfat enthalten, erscheinen im Bild weiß. Jeweils 12 Mäuse pro Mauslinie wurden 2 min (A), 30 min (B) und 60 min (C) nach der Bariumsulfat-Applikation geröntgt.

Nach 60 min ist bei der Wildtypmaus Bariumsulfat nur noch in den verschiedenen Dünndarmabschnitten und am Beginn des Dickdarms zu sehen. Bei der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mutante hingegen kann man sogar nach 60 min noch Bariumsulfat im Oesophagus erkennen (siehe Abbildung 12 C). Das meiste Bariumsulfat befindet sich jetzt im Duodenum und am Beginn des Jejunums. Der Dickdarm ist jedoch immer noch vollkommen frei von Kontrastmittel. Dieser Befund deutet auf eine verzögerte Magen-Darm-Passage der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus hin.

4.1.7 Eröffnung des Abdomens der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus

Die Verzögerung der Magen-Darm-Passage in der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mutante lässt auf eine Funktionsstörung der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts schließen. Aus diesem Grund wurde die Abdominalhöhle untersucht.

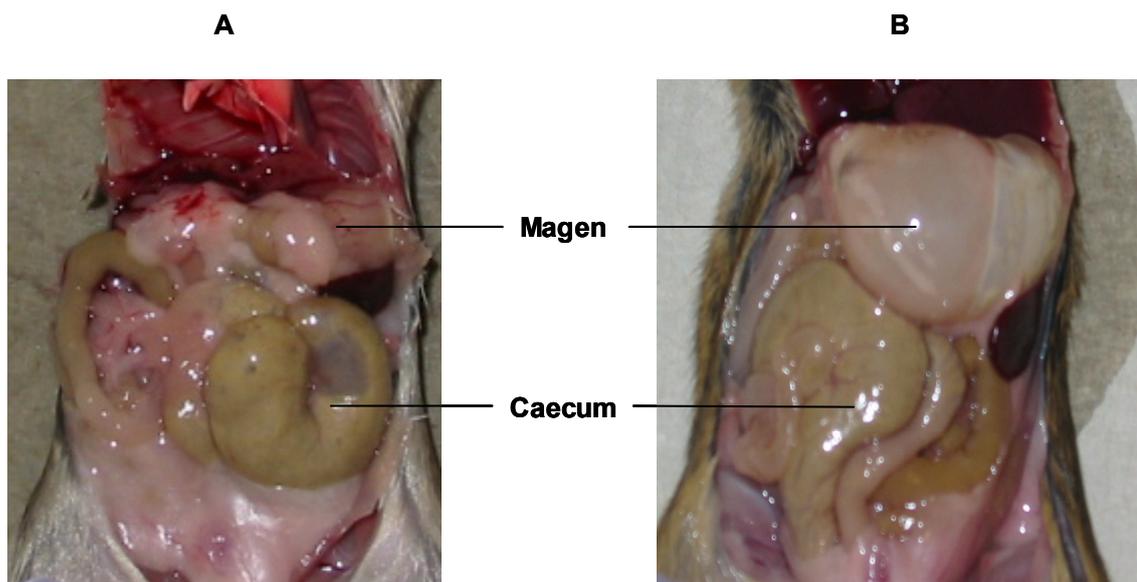


Abbildung 13: Eröffnete Abdominalhöhle einer Wildtypmaus (A) und einer $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mutante (B).

Eröffnet man die Bauchhöhle, fällt zunächst auf, dass das retroperitoneale Fettgewebe nur noch sehr wenig ausgeprägt ist und dass alle Organe des Gastrointestinaltrakts stark dilatiert sind. Der extrem vergrößerte Magen, der sich auf der linken Körperseite vorwölbt (siehe Abbildung 13), ist mit Flüssigkeit, verkrustetem Futter und Haaren gefüllt. Wahrscheinlich ist die starke Dilatation des Magens verantwortlich für die Verlagerung des Caecums von der linken Hälfte der Abdominalhöhle in die rechte Hälfte. Überdies wird das Caecum gedreht. Das Corpus caeci wird von dorsal nach ventral verlagert.

Auffallend ist ebenfalls die starke Füllung des gesamten Darmkonvolutes (siehe Abbildung 13).

4.2 Funktionelle Analyse isolierter Darmmuskelpräparate

Da die bisherigen Befunde auf eine Störung des Magen-Darm-Trakts in den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen schließen lassen, wurde die glatte Muskulatur des Darmtraktes mit Hilfe von isometrischen Kraftmessungen untersucht. Als Versuchstiere dienten neben den Wildtyp-, den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen und den heterozygoten IRAG^{+/Δ12} Mäusen auch cGKI^{-/-} Mäuse mit den dazugehörigen Kontrollmäusen. Bei den cGKI defizienten Mäusen sind beide Isoformen der cGKI ausgeschaltet. Da diese Mäuse bereits in einem Alter von vier bis sechs Wochen sterben, waren diese Tiere bei den Untersuchungen sehr viel jünger als die anderen Versuchstiere. Um Unterschiede auf Grund des geringen Alters der cGKI^{-/-} Mäuse auszuschließen, wurden als weitere Kontrollmäuse Geschwister zu den cGKI^{-/-} Mäusen untersucht.

4.2.1 Spontanaktivität

4.2.1.1 Spontanaktivität des Längsmuskels im Colon

Nach der Präparation des Längsmuskels wurden spontane Kontraktionen in allen Präparaten beobachtet (siehe Abbildung 14 A und B). Die Spontanaktivität setzt sich aus rhythmischen Kontraktionen zusammen. Diese Kontraktionen werden anhand der Frequenz und der Amplitude untersucht. Die Abbildung 14 C und D zeigt, dass es zwischen den fünf verschiedenen Mauslinien keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Amplitude und Frequenz des Längsmuskels im Colon gibt. Die Frequenz reicht von 12 (± 1,1) Kontraktionen bis zu 8 (± 1,0) Kontraktionen pro fünf Minuten. Die Amplituden der Kontraktionen lagen zwischen 0,2 (± 0,019) N/g und 0,25 (± 0,024) N/g (n=15-106). Die Untersuchung des Ringmuskels im Colon ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp und den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen in der Spontanaktivität (keine graphische Darstellung).

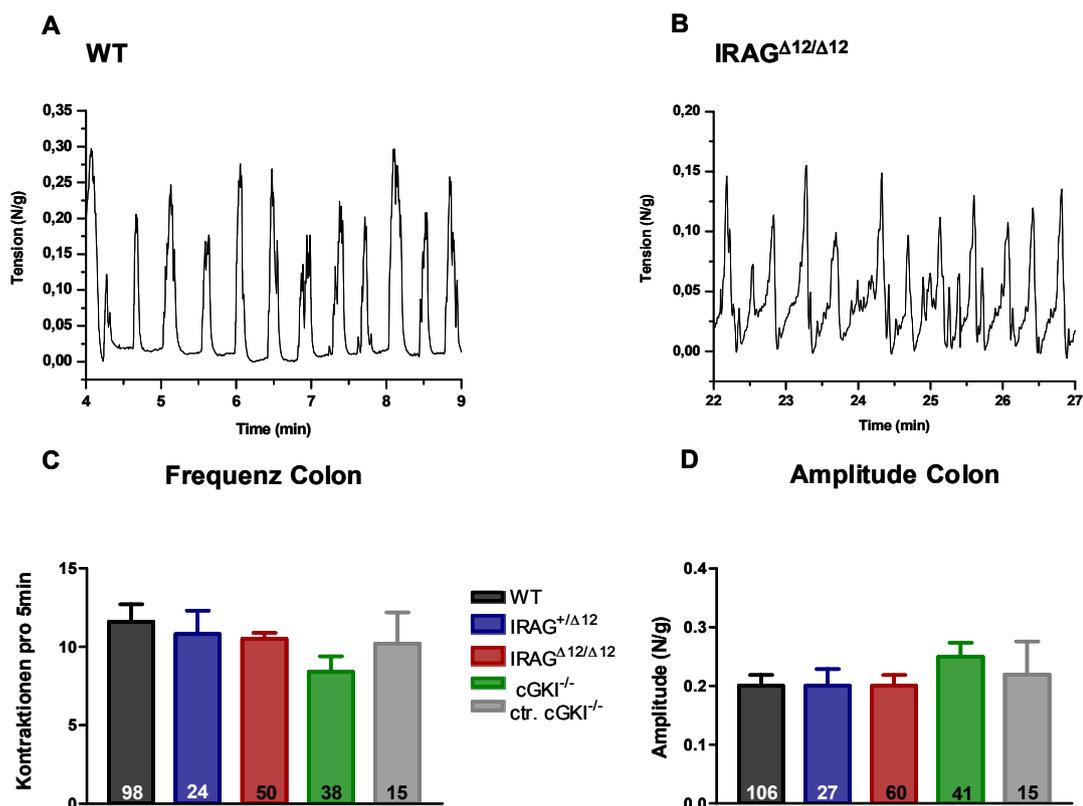


Abbildung 14: Spontanaktivität des Längsmuskels im Colon. In **A** und **B** sind die Originalaufzeichnung einer Wildtypmaus bzw. einer IRAG^{Δ12/Δ12} Maus gezeigt. In **C** ist die Frequenz und in **D** die Amplitude der verschiedenen Präparate gezeigt. Die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM sind angegeben. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken abgebildet.

4.2.1.2 Spontanaktivität des Längsmuskels im Jejunum

Da der Dünndarm ebenso wie der Dickdarm ein spontanaktives Gewebe ist, sind mögliche Unterschiede bei den untersuchten Mauslinien hier ebenfalls von Interesse. Wie im Colon wurden auch hier die Amplitude und die Frequenz des Muskels aus den verschiedenen Mauslinien untersucht. Aus der Abbildung 15 kann man entnehmen, dass keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Amplitude und Frequenz zwischen den einzelnen Mauslinien festzustellen waren. Die Frequenz reicht von 32 (\pm 1) Kontraktionen pro Minute bis zu 34 (\pm 1) Kontraktionen pro Minute ($n=16-162$). Die Amplitude lag zwischen 0,25 N/g (\pm 0,01) bis zu 0,30 N/g (\pm 0,05). Die drei Dünndarmabschnitte, Duodenum, Jejunum und Ileum, wurden getrennt voneinander untersucht. Da sich zwischen ihnen keine signifikanten Unterschiede zeigten, wurde nur das Jejunum als Beispiel für einen Dünndarmabschnitt aufgeführt.

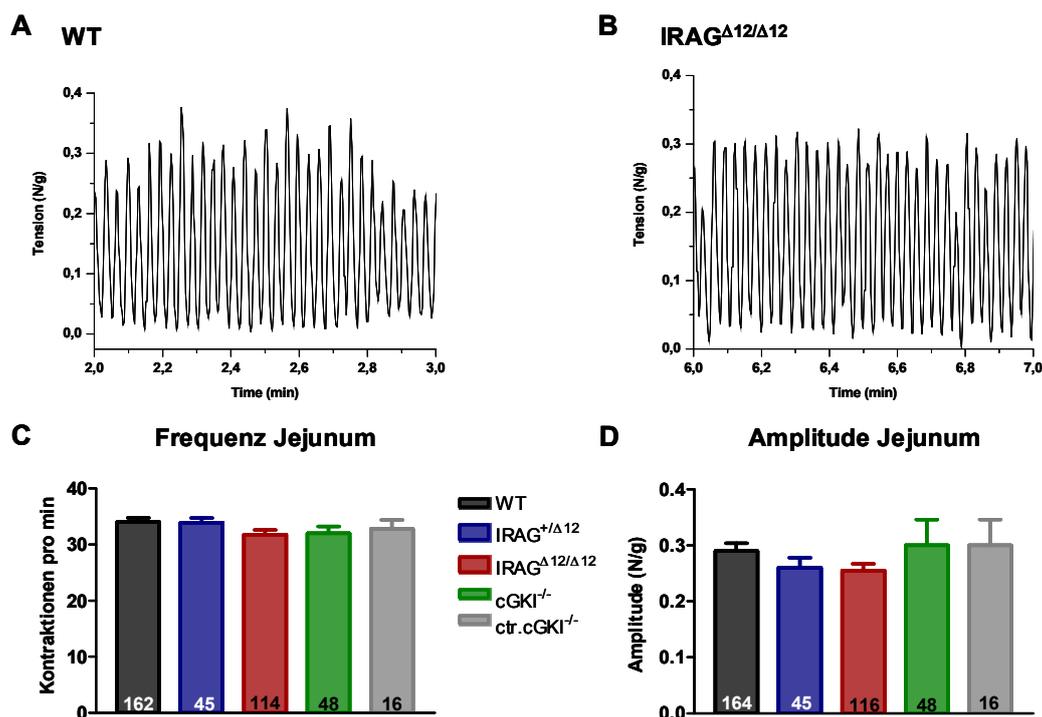


Abbildung 15: Spontanaktivität des Längsmuskels im Jejunum. In **A** ist die Registrierung der Spontanaktivität einer Wildtypmaus-Präparation gezeigt, in **B** die einer IRAG $\Delta 12/\Delta 12$ Mutante. In **C** und **D** sind die Mittelwerte \pm SEM in Bezug auf Amplitude und Frequenz der jeweiligen Präparate dargestellt. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben.

4.2.1.3 Effekt von 8-Br-cGMP auf die Spontanaktivität im Längsmuskel des Colons

Um den Einfluss des NO/cGMP/cGKI Signalwegs auf die Generierung der Spontanaktivität zu bestimmen, wurde cGMP (300 μ M) auf den unstimulierten glatten Muskel des murinen Colons gegeben. Für die Versuche kam das membranpermeable cGMP-Analogon 8-Br-cGMP zum Einsatz. Aus der Abbildung 16 kann man ersehen, dass 8-Br-cGMP eine deutliche Wirkung auf die Spontanaktivität der Colonpräparate hat. Die Frequenz wird in allen drei untersuchten Mauslinien deutlich um ca. 35% reduziert. Zwischen den untersuchten Mauslinien konnte allerdings kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der Spontanaktivität des Colons, nach der Gabe von 8-Br-cGMP, festgestellt werden. Wie in der Abbildung 16 zu sehen ist, bewegt sich die Frequenz bei allen drei untersuchten Mauslinien zwischen 65% (\pm 9%) und 68% (\pm 6%) der Kontrolle ($n=4-6$). Die Auswertung der Colonpräparate in Bezug auf die Amplitude erbrachte ebenfalls eine deutliche 8-Br-cGMP-Wirkung. Bei allen drei untersuchten Mauslinien bewirkt 8-Br-cGMP eine deutliche Reduktion der Amplitude ($n=4-6$).

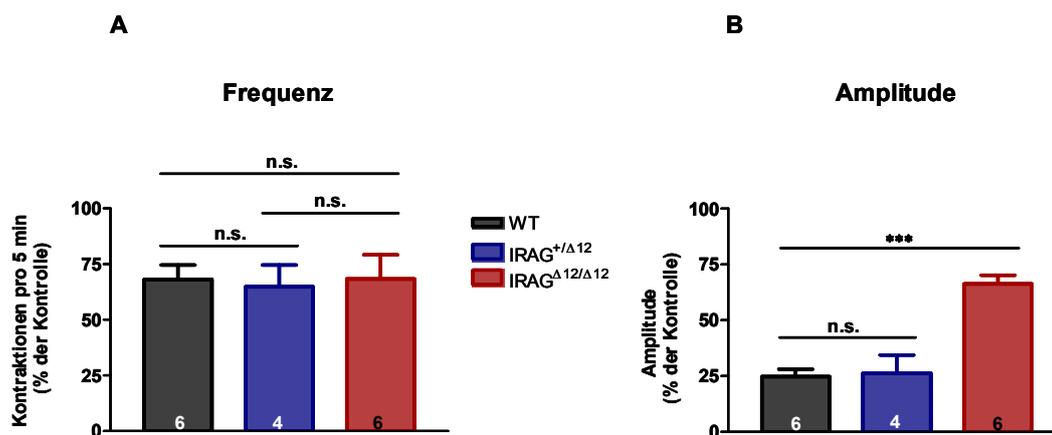


Abbildung 16: Mittelwerte \pm SEM der Effekte von 8-Br-cGMP auf die Spontanaktivität (A: Frequenz, B: Amplitude) des Längsmuskels im Colon von Wildtyp-, heterozygoten IRAG^{+/ Δ 12}- und IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mäusen. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben. n. s. steht für nicht signifikant, * steht für hoch signifikant ($p < 0,001$).**

In den Wildtypmäusen und in den heterozygoten IRAG^{+/ Δ 12} Mäusen werden die Amplituden auf 25% (\pm 3%) und auf 26% (\pm 8%) der Kontrolle reduziert. In der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mutante hingegen beträgt die Amplitude auch nach der Zugabe von 8-Br-cGMP 66% (\pm 4%) der Kontrolle (n=6). 8-Br-cGMP zeigt demnach bei allen drei untersuchten Mauslinien eine deutliche Wirkung, sowohl auf die Amplitude als auch auf die Frequenz der Colonpräparate. Im Gegensatz zu der Frequenz sieht man jedoch einen hoch signifikant schwächeren Effekt von 8-Br-cGMP auf die Amplitude des IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Colons.

4.2.1.4 Effekt von 8-Br-cGMP auf die Spontanaktivität des Längsmuskels im Jejunum

Im Dünndarm der Wildtypmäuse bewirkte 8-Br-cGMP ebenfalls eine Reduktion von Frequenz und Amplitude, wie in der Abbildung 17 ersichtlich ist. Die Frequenz des Wildtyp-Jejunums sinkt deutlich auf 50% der Kontrolle (\pm 2%) (n=16). Ebenso verhält es sich mit der Amplitude. Diese sinkt ebenfalls auf 50% der Kontrolle (\pm 7%) (n=16). In der cGKI^{-/-} und in der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Maus hat 8-Br-cGMP keinen Einfluss auf die Spontanaktivität der Jejunumpräparate. Ebenso verhält es sich mit der Frequenz dieser Präparate beider Mauslinien (n= 7-8). Das gleiche Ergebnis kann bei der Auswertung der Amplitude erzielt werden. Hier findet sich bei beiden Mauslinien kein signifikanter Unterschied (n= 7-8). Im Gegensatz zu den Wildtypmäusen hat 8-Br-cGMP demnach

keinen Einfluss auf die Frequenz und die Amplitude der Jejunumpräparate bei der IRAG^{Δ12/Δ12} bzw. bei der cGKI^{-/-} Maus.

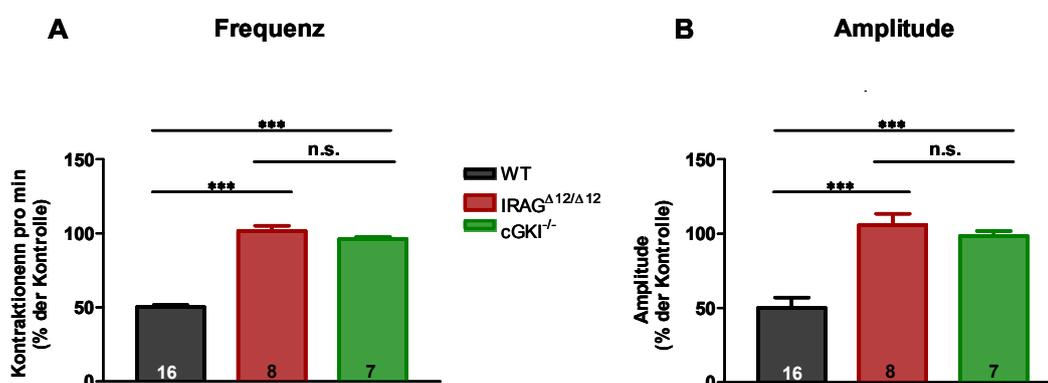


Abbildung 17: Mittelwerte \pm SEM der Effekte von 8-Br-cGMP auf die Spontanaktivität (A: Frequenz, B: Amplitude) des Längsmuskels im Jejunum von Wildtyp-, IRAG^{Δ12/Δ12}- und cGKI^{-/-} Mäusen. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben. n. s. steht für nicht signifikant, *** steht für hoch signifikant ($p < 0,001$).

Bei dieser Versuchsreihe wurden die drei Dünndarmabschnitte getrennt untersucht. Da es aber zwischen Duodenum, Jejunum und Ileum keine signifikanten Unterschiede gab, werden nur die Ergebnisse des Jejunums aufgeführt.

4.2.2 Vergleich der Stimulus-induzierten Kontraktion

4.2.2.1 Kraftentwicklung des Colons

Bei dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Mutation im IRAG- bzw. im cGKI-Gen die Fähigkeit des Längsmuskels verändert, Kraft nach einer Stimulation zu entwickeln. Als Stimulus wurden eine Hormonstimulation, eine Hormon-unabhängige Depolarisation und die Entleerung der intrazellulären Speicher durch Thapsigargin verwendet. Die Depolarisation erfolgt durch die Erhöhung des extrazellulären Kaliums.

Die Hormonstimulation am longitudinalen Muskel des Colons bewirkt einen raschen Kraftanstieg. Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums fällt die Kraft ab, bis sie ein Plateau erreicht. In der Abbildung 18 A ist die Wirkung des Acetylcholin-Analogons Carbachol (CCh) auf den Längsmuskel des murinen Colons zusammengefasst.

Der Vergleich der unterschiedlichen Mausgruppen bezüglich des Carbachol vermittelten Effekts war im ungepaarten t-Test nicht signifikant. Die Amplitude des Maximums lag zwischen 0,85 N/g ($\pm 0,1$) und 0,7 N/g ($\pm 0,19$) ($n=13-92$). Die Stimulation des Ringmuskels des murinen Colons mit Carbachol brachte ein analoges Ergebnis. Die durch Carbachol induzierte Kraft war in den Wildtyp- und in den IRAG $^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen nahezu gleich (keine graphische Darstellung).

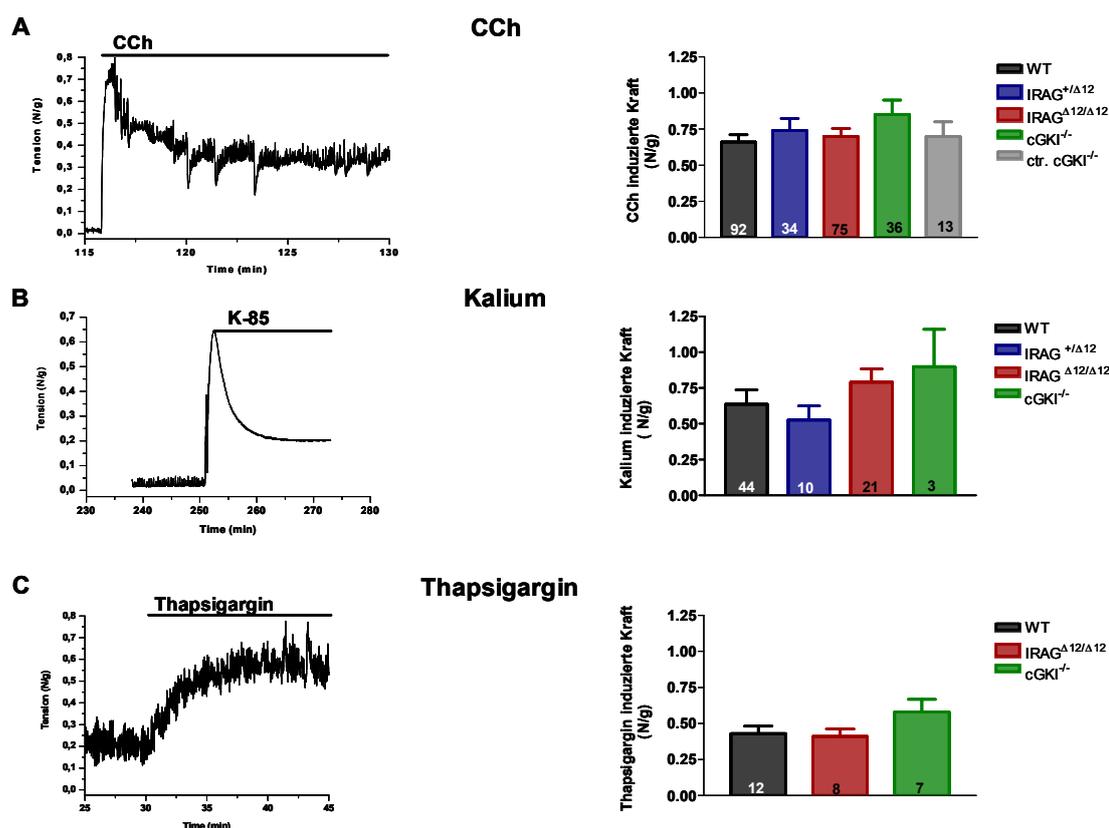


Abbildung 18: Die stimulierbare Kraftentwicklung des Colons in Form von Originalaufzeichnungen einzelner Wildtypmäuse und in Form von Mittelwerten (\pm SEM) bei allen untersuchten Mäusen. Der schwarze Balken repräsentiert die Einwirkdauer der verschiedenen Substanzen (CCh (10 μ M) (A), Kalium (85 mM) (B) und Thapsigargin (1 μ M) (C). Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben.

Eine Depolarisation der Zellmembran mit Kalium (85 mM) bewirkt sowohl in Dickdarm- als auch in Dünndarmpräparaten eine schnelle phasische Kontraktion. Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums fällt die Kraft steil ab und bleibt dann im Plateau. Bei der Stimulation mit Kalium (85 mM) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Mauslinien (siehe Abbildung 18 B) ($n=44-3$). Die Depolarisation der Membran führte zu einem Kraftanstieg, mit einer durchschnittlichen

Amplitude von 0,6 N/g ($\pm 0,1$) in den Wildtypmäusen, 0,5 N/g ($\pm 0,1$) in den IRAG^{+/ Δ 12} Mäusen, 0,8 N/g ($\pm 0,09$) in den IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} und 0,9 N/g ($\pm 0,26$) in den cGKI^{-/-} Mäusen. Der Ringmuskel des Colons wurde ebenfalls mit Kalium (85 mM) stimuliert. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mäusen festzustellen (keine graphische Darstellung).

Die Stimulation der Dickdarmpräparate mit Hilfe von Thapsigargin (1 μ M) führt zu einer Kontraktion, die nach etwa 15 min ihr Maximum entwickelt. Diese Stimulationsart zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Mauslinien (n=7-12) (siehe Abbildung 18 C). Der Kraftanstieg reicht von 0,41 N/g ($\pm 0,05$) in den IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mäusen bis zu 0,58 N/g ($\pm 0,09$) in den cGKI^{-/-} Mäusen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kraftentwicklung im Colon aller untersuchten Mauslinien bei den drei verwendeten Stimulationsarten jeweils nahezu gleich stark ist.

4.2.2.2 Kraftentwicklung des Jejunums

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob die Mutation im IRAG- bzw. im cGKI-Gen Folgen für die Stimulierbarkeit des Längsmuskels im Jejunum hat.

Analog zum Colon wurde Carbachol in einer Konzentration von 10 μ M verwendet. Auch im Jejunum induziert das Acetylcholin-Analogon keine signifikanten Unterschiede in der Kraftentwicklung bei den verschiedenen Mauslinien. Die Abbildung 19 A zeigt die durch Carbachol induzierte Kraftentwicklung bei den fünf untersuchten Mauslinien. Ebenso wie im Colon kann man im Jejunum zwei Phasen der Hormon induzierten Kontraktion unterscheiden: Eine schnelle phasische, die dann bis zu einem Plateau in eine tonische Phase absinkt. Die phasische Kraft reicht von 0,51 N/g ($\pm 0,034$) bis hin zu 0,67 N/g ($\pm 0,1$) (n=12-61).

Ähnlich wie im Dickdarm verläuft auch im Jejunum die Depolarisation mit Kalium ohne signifikante Unterschiede in der Kraftentwicklung bei den untersuchten Mauslinien (Abbildung 19 B). Die Depolarisation wurde auch hier durch eine 85 mM Kalium Tyrode hervorgerufen. Der Kraftanstieg reicht von 0,7 N/g ($\pm 0,08$) bis hin zu 0,55 N/g ($\pm 0,06$) (n=13-50).

Für eine dritte Stimulation wurde am Dünndarm ebenfalls der SERCA-Inhibitor Thapsigargin (1 μ M) verwendet. Analog zum Colon brachte der direkte Vergleich der drei Gruppen bezüglich des Thapsigargin vermittelten Effektes auch bei dieser

Stimulationsart keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Mauslinien (Abbildung 19 C). Die Kraftentwicklung im Jejunum der verschiedenen Mauslinien reicht von 0,6 N/g ($\pm 0,05$) bis 0,74 N/g ($\pm 0,1$) (n=7-12).

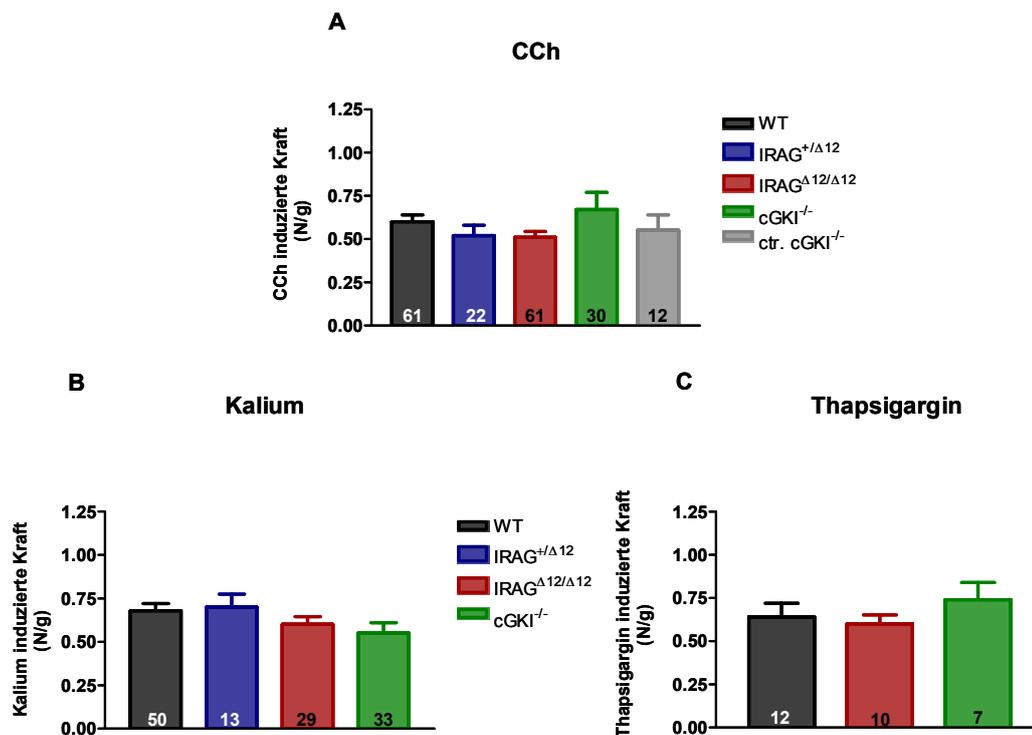


Abbildung 19: Mittelwerte \pm SEM der Kraftentwicklung des Jejunums von Wildtp-, heterozygoten IRAG^{+/ Δ 12}-, IRAG ^{Δ 12/ Δ 12}- und cGKI^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit CCh (10 μ M) (A), mit Kalium (85 mM) (B) und mit Thapsigargin (1 μ M) (C). Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben.

Im Jejunum wie auch in den beiden anderen Dünndarmabschnitten wurden dieselben Stimulationsarten wie im Colon untersucht. Da es aber auch diesmal keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Dünndarmabschnitten gab, wird hier nur das Jejunum gezeigt.

4.2.3 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit CCh stimulierten Tonus des glatten Muskels des Darms

4.2.3.1 Konzentrationswirkungskurve von 8-Br-cGMP

Um das Wirkungsoptimum von 8-Br-cGMP im Dick- und Dünndarm zu ermitteln, wurden Konzentrationswirkungskurven an Colon- und Jejunumpräparaten erstellt. Die jeweiligen Darmabschnitte wurden zuerst mit Carbachol (10 μ M) stimuliert und dann mit verschiedenen Konzentrationen von 8-Br-cGMP relaxiert. 8-Br-cGMP wurde in Konzentrationen von 100 nM bis 1 mM zugegeben. Mit Hilfe der Konzentrationswirkungskurve kann man erkennen, dass die beiden Gewebe nahezu identisch auf cGMP reagieren (Abbildung 20 A und B). Die an Wildtypmäusen erhaltenen Konzentrationswirkungskurven waren nicht signifikant unterschiedlich. Die EC_{50} lag im Colon und im Jejunum bei 3 bzw. 11 μ M. Die Anzahl der untersuchten Präparate lag zwischen vier und zwölf Stück.

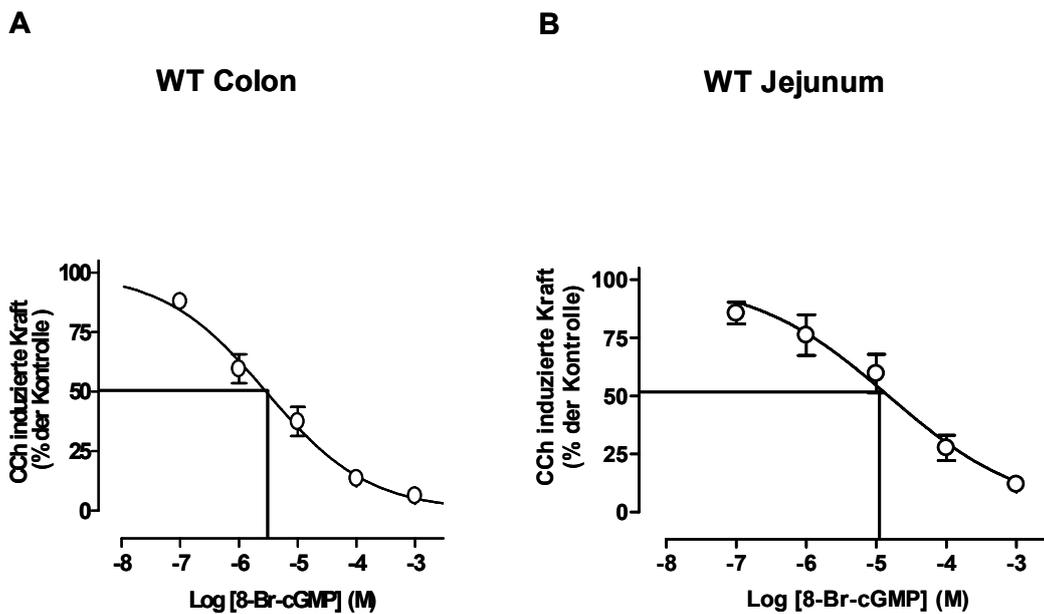


Abbildung 20: Mittlere Konzentrationswirkungskurve von 8-Br-cGMP am Colon (A) und am Jejunum (B) von Wildtypmäusen ($n=4-12$). Mittelwerte \pm SEM sind angegeben.

4.2.3.2 Wirkung einer Vorinkubation mit 8-Br-cGMP im Verlauf einer repetitiven Kontraktionsauslösung durch CCh am Colon

Durch die Vorinkubation von 8-Br-cGMP kann man dessen Wirkung auf den schnellen ersten Teil der CCh induzierten Kontraktion (Peak) untersuchen. Die Präparate wurden

repetitiv mit CCh stimuliert. Zwischen der ersten und zweiten Stimulation wurde CCh wieder ausgewaschen und keine weitere Substanz zugegeben. Nach dem Waschen zwischen der dritten und vierten Stimulation wurde 8-Br-cGMP zugegeben. Die Vorinkubation mit 8-Br-cGMP führte in den Colonpräparaten der Wildtypmäuse zu einer deutlichen Unterdrückung der Kontraktion (siehe Abbildung 21 A). Die Kontraktion der Präparate der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus nach der Vorinkubation mit 8-Br-cGMP hingegen ist beinahe identisch mit den vorangegangenen Kontraktionen (siehe Abbildung 21 B). In Abbildung 21 C ist das Verhältnis zweier aufeinander folgender Kraftmaxima nach CCh-Stimulation bzw. nach CCh-Stimulation mit vorangegangener Vorinkubation von 8-Br-cGMP angegeben.

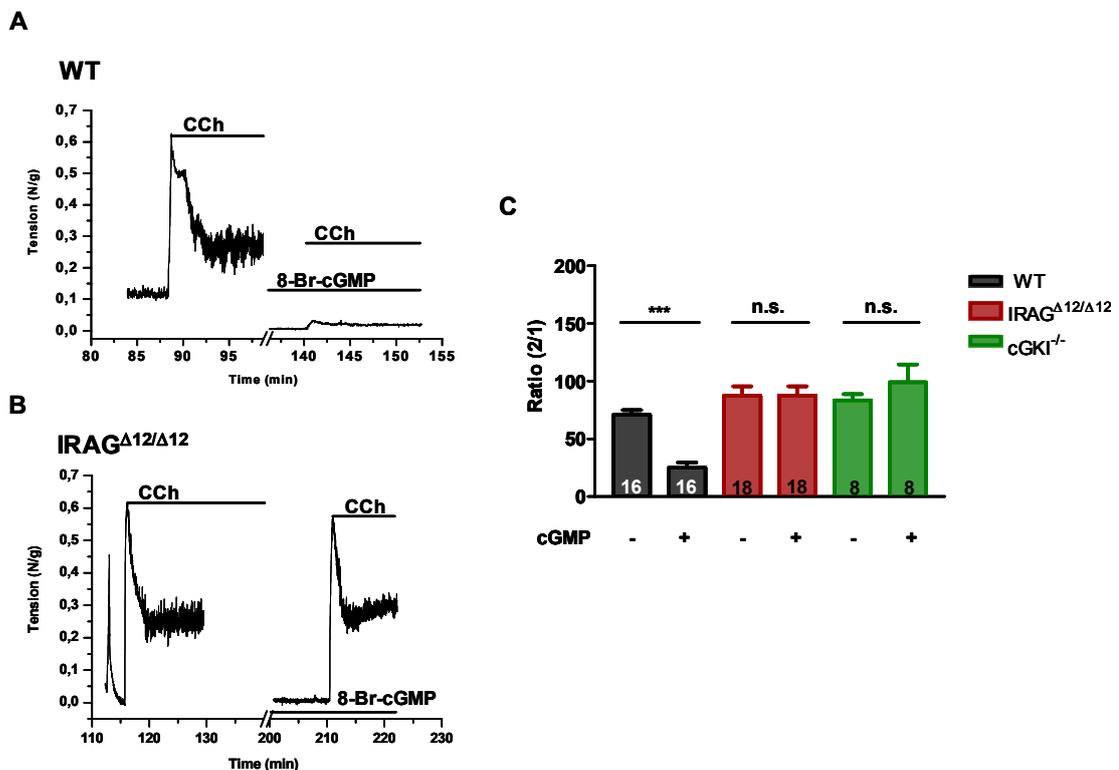


Abbildung 21: Wirkung einer Vorinkubation mit 8-Br-cGMP (300 μM) im Verlauf einer repetitiven Kontraktionsauslösung durch CCh (10 μM) am Colon. In A ist die Originalaufzeichnung eines Wildtyppräparates, in B die Originalaufzeichnung eines IRAG^{Δ12/Δ12} Präparates dargestellt. Der schwarze Balken repräsentiert die Inkubationszeit von 8-Br-cGMP bzw. von CCh. In C sind Mittelwerte ± SEM des Verhältnisses der aufeinander folgenden Kraft-Maxima nach CCh-Stimulation gezeigt. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben. n. s. steht für nicht signifikant, *** steht für hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen eindeutig, dass sowohl in der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus, mit jeweils 88% (± 8%) Ratio, als auch in der cGKI^{-/-} Maus, mit 84% (± 5%)-

bzw. 99% ($\pm 15\%$)- Ratio, die Kontraktion durch die Vorinkubation mit 8-Br-cGMP nur sehr gering bzw. nicht unterdrückt wurde ($n=8-18$). In den Präparaten der Wildtypen hingegen ist mit 70% ($\pm 4\%$) bzw. 25% ($\pm 4\%$) Ratio eine deutliche Reduktion der nachfolgenden Kontraktion zu erkennen ($n=16$).

4.2.3.3 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit CCh vorkontrahierten Längsmuskel im Colon

Um die Funktion von IRAG bei der Relaxation des glatten Muskels näher zu charakterisieren, wurden die Effekte von cGMP im vorkontrahierten glatten Muskel der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen untersucht. Dazu wurden die Präparate mit Carbachol stimuliert. Die Abbildung 22 A, B und C zeigt beispielhaft eine Messung des Hormon induzierten Tonus am Colon einer Maus der drei Mauslinien.

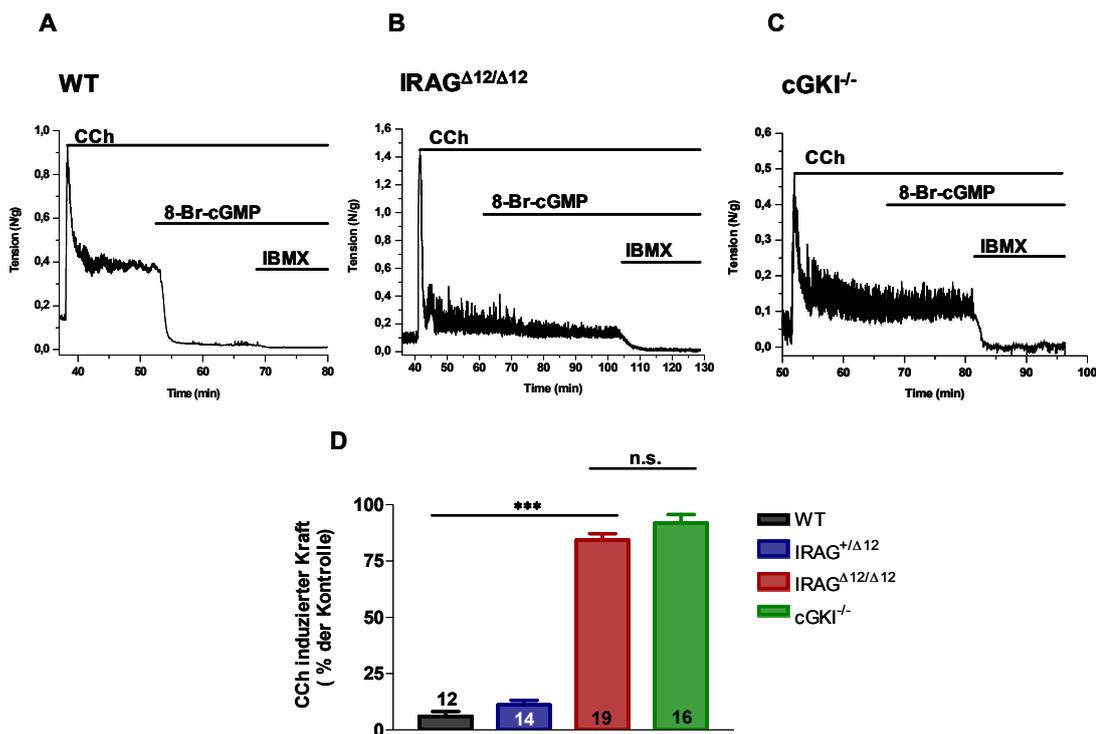


Abbildung 22: Effekt von 8-Br-cGMP (300 mM) auf den mit CCh (10 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon. In A bis C sind die Originalregistrierungen von Kraftmessungen an glattmuskulären Präparaten des Colons, einer Wildtypmaus, einer $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus und einer $cGKI^{-/-}$ Maus gezeigt. Die schwarzen Balken stehen für die Einwirkzeit der verschiedenen Substanzen. Um die Präparate vollständig zu relaxieren, wurde der unspezifische Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100 μ M) verwendet. In D sind die Mittelwerte \pm SEM aller Versuche dargestellt. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben, wobei n. s. für nicht signifikant und *** für hoch signifikant ($p < 0,001$) steht.

In den Wildtypmäusen und in den heterozygoten $IRAG^{+/\Delta 12}$ Mäusen wird der durch Carbachol induzierte Tonus sehr stark auf 6% ($\pm 2\%$) bzw. 11% ($\pm 2\%$) Restkraft relaxiert (n=12-14). In den Colonpräparaten der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse hatte 8-Br-cGMP dagegen einen sehr geringen Effekt (84% ($\pm 3\%$) Restkraft) auf den Hormon induzierten Tonus (n=19). Ebenso verhält es sich in den $cGKI^{-/}$ Mäusen. Hier wird der Hormon induzierte Tonus nur auf 92% ($\pm 4\%$) relaxiert (n=16). Dieser hoch signifikante Unterschied zwischen den Wildtypmäusen und den $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen ist in der Abbildung 22 D statistisch dargestellt. Ein ähnliches Ergebnis zeigen die Untersuchungen am Ringmuskel des Colons. Der direkte Vergleich der Wildtyp- und der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse bezüglich des 8-Br-cGMP vermittelten Effektes erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Mauslinien (keine graphische Darstellung).

4.2.3.4 Effekt von cGMP auf den mit CCh vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum

Um den Effekt von 8-Br-cGMP auf den Hormon induzierten Tonus am Dünndarm untersuchen zu können, wurden die Präparate auch hier mit Carbachol (10 μ M) stimuliert. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes wurde das cGMP-Analogen 8-Br-cGMP zugegeben. In der Abbildung 23 (A bis C) sind Originalaufzeichnungen von drei Mäusen der untersuchten Mauslinien gezeigt. Die Wirkung von 8-Br-cGMP auf die Präparate des $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Jejunums ist deutlich zu erkennen, im Gegensatz zu den Ergebnissen am Colon. Im Jejunum von Wildtypmäusen relaxiert 8-Br-cGMP den Hormon induzierten Tonus auf 23% ($\pm 3\%$) Restkraft (n=9) (siehe Abbildung 23 D). In den heterozygoten $IRAG^{+/\Delta 12}$ Mäusen wird der Tonus ebenfalls auf 23% Restkraft ($\pm 2\%$) (n=6) und im Jejunum der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus auf 39% ($\pm 3\%$) Restkraft reduziert (n=19). Im Vergleich Wildtyp, heterozygote $IRAG^{+/\Delta 12}$ und $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus, wird das Jejunum der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus signifikant schwächer durch 8-Br-cGMP relaxiert. In der $cGKI^{-/}$ Maus hingegen erhält man im Jejunum ein ähnliches Ergebnis wie in den Präparaten des Colons. Hier wird der Hormon induzierte Tonus nur sehr gering auf 93% ($\pm 4\%$) Restkraft reduziert (n=9) (siehe Abbildung 23 D).

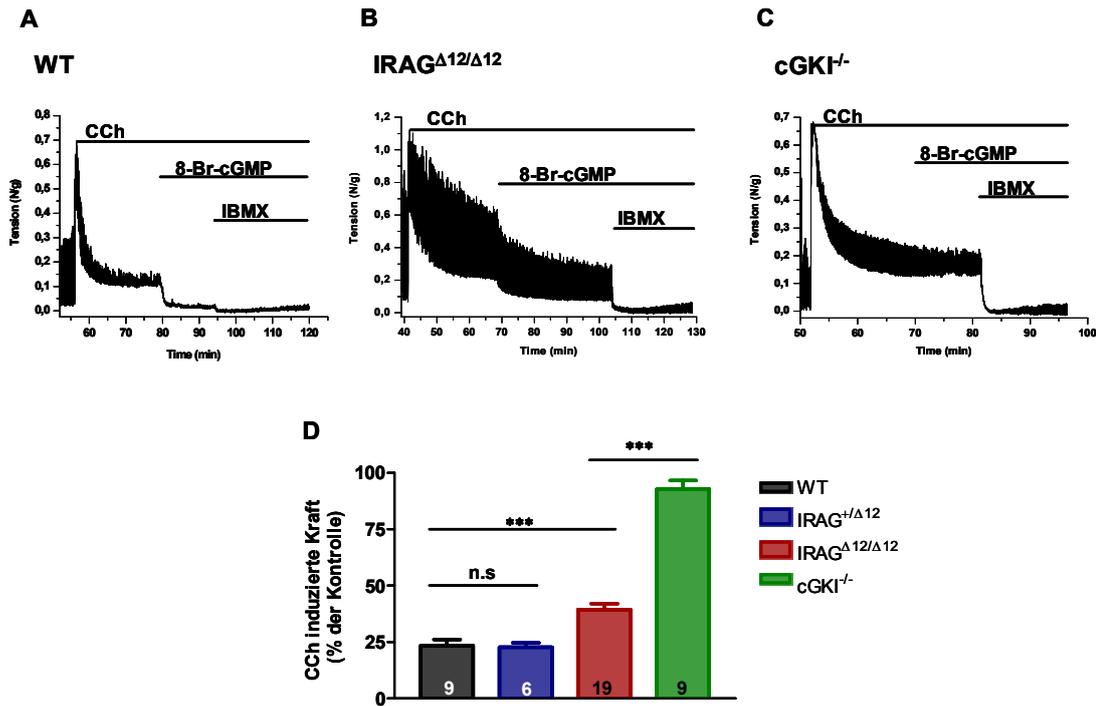


Abbildung 23: Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit CCh (10 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum. In A bis C sind die Originalregistrierungen von Kraftmessungen an glattmuskulären Präparaten des Jejunums, einer Wildtypmaus, einer IRAG^{Δ12/Δ12} Maus und einer cGKI^{-/-} Maus gezeigt. Die schwarzen Balken stehen für die Einwirkzeit der verschiedenen Substanzen. Um die Präparate vollständig zu relaxieren, wurde der unspezifische Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100 μ M) verwendet. In D sind die Mittelwerte \pm SEM aller Versuche dargestellt. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben, wobei n. s. für nicht signifikant und *** für hoch signifikant ($p < 0,001$) steht.

4.2.3.5 Effekt von cBIMPS auf den mit CCh vorkontrahierten Längsmuskel im Colon

Es besteht die Möglichkeit, dass IRAG nicht nur am Signalweg von cGMP, sondern auch an dem von cAMP beteiligt ist. cAMP ist ebenso wie cGMP ein sekundärer Botenstoff und aktiviert die cAMP-abhängigen Proteinkinasen. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurden Versuche mit dem membrangängigen cAMP-Analogen cBIMPS durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Colonpräparate mit Carbachol (10 μ M) stimuliert und dann dieser Tonus mit cBIMPS (250 μ M) relaxiert. Der Hormon induzierte Tonus wird in allen drei Mauslinien durch cBIMPS deutlich relaxiert (siehe Abbildung 24 A bis C). Die Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuche in der Abbildung 24 D zeigt, dass im direkten Vergleich der drei untersuchten Gruppen der cBIMPS vermittelte Effekt nicht signifikant ist. Der induzierte Tonus wird in den heterozygoten IRAG^{+/Δ12} Mäuse auf 10% (\pm 4%) (n=4), in den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen auf 11% (\pm 4%) (n=4) und in den cGKI^{-/-} Mäusen auf 20% (\pm 6,3%) Restkraft (n=4)

relaxiert. Somit scheint IRAG am relaxierenden Effekt von cAMP nicht beteiligt zu sein.

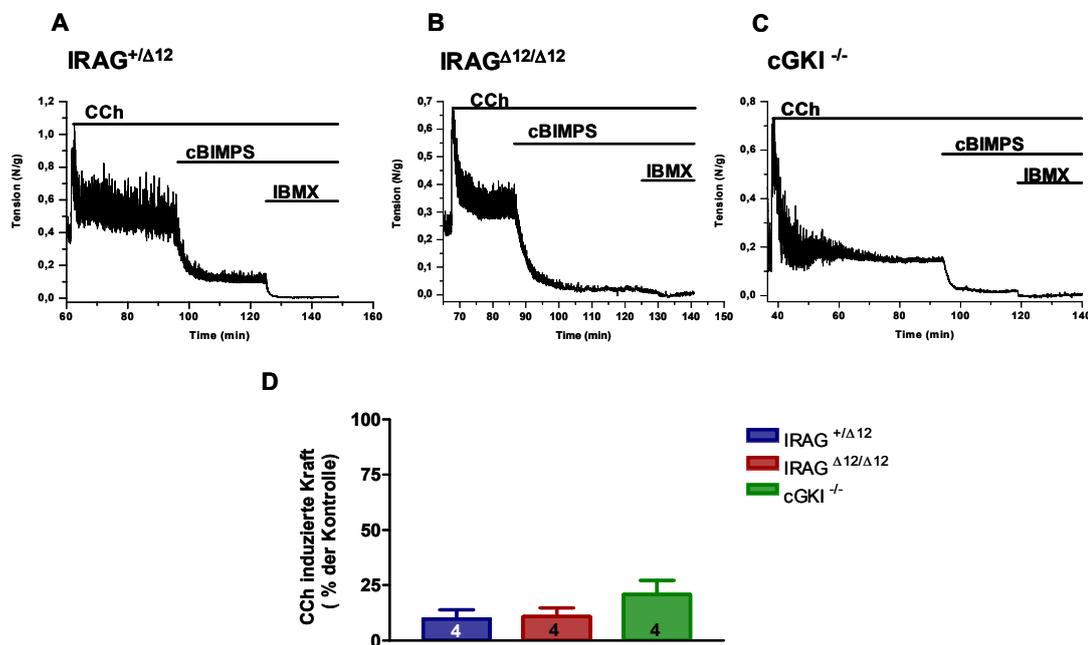


Abbildung 24: Effekt von cBIMPS (250 μ M) auf den mit CCh (10 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon. In den Abbildungen A bis C sind die Originalregistrierungen einer heterozygoten IRAG^{+/Δ12}-, einer IRAG^{Δ12/Δ12}- und einer cGKI^{-/-} Maus gezeigt. Die schwarzen Balken stehen für die Einwirkzeit der verschiedenen Substanzen. Um die Präparate vollständig zu relaxieren, kam der unspezifische Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100 μ M) zum Einsatz. In D sind die Mittelwerte \pm SEM aller Versuche dargestellt. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben.

4.2.3.6 Übersicht der Effekte von 8-Br-cGMP auf den mit CCh vorkontrahierten Längsmuskel des Dünndarms und des Colons

Die Abbildung 25 zeigt, dass 8-Br-cGMP die Darmsegmente von Wildtyp- und IRAG^{+/Δ12} Mäusen gleich stark relaxiert. Der Ausfall eines IRAG-Gens hat damit keinen Einfluss auf die Wirkung von cGMP (kein Gendosis-Effekt). In keinem Präparat der cGKI^{-/-} Mäuse bewirkt 8-Br-cGMP eine Relaxation. Dieser Befund zeigt, dass der relaxierende Effekt von 8-Br-cGMP wesentlich von der cGKI vermittelt wird. Ähnlich sieht es bei den Colonpräparaten der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse aus. Auch hier erzielt 8-Br-cGMP nahezu keinen Effekt. Somit scheint IRAG hier essentiell für den relaxierenden Weg von cGMP zu sein. Dagegen relaxiert cGMP in den Dünndarmpräparaten der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse über 50% des Hormon induzierten Tonus. Gegenüber den Dünndarmpräparaten der Wildtypmäuse (Restkraft ca. 20%) ist dieser Effekt in den

IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen aber deutlich abgeschwächt. Dies zeigt, dass IRAG hier nur einen geringen Einfluss auf die Wirkung von 8-Br-cGMP hat.

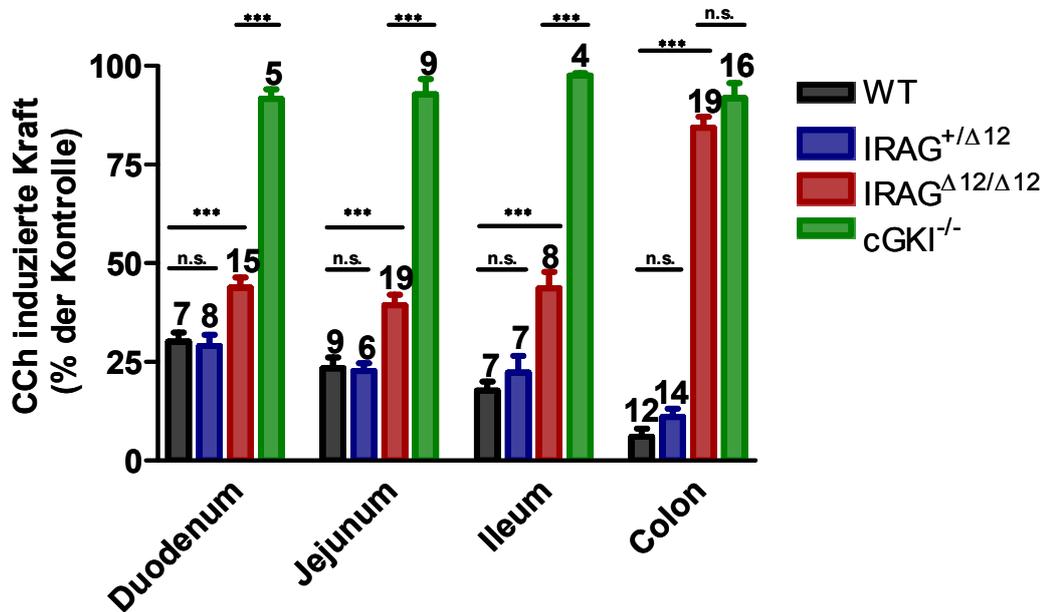


Abbildung 25: Übersicht der Effekte (Mittelwerte \pm SEM) von 8-Br-cGMP auf den mit CCh vorkontrahierten Längsmuskel des Dünndarms und des Colons aller untersuchter Mauslinien. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist über den Balken angegeben. Wobei n. s. für nicht signifikant und *** für hoch signifikant ($p < .001$) steht.

4.2.3.7 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit CCh und Calyculin A vorkontrahierten Längsmuskel im Darm

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass IRAG eine besondere Rolle bei der cGMP abhängigen Relaxation im Colon, aber nicht im Jejunum spielt. Daraus lässt sich folgern, dass nur im Colon die Hemmung der IP₃ vermittelten Calcium-Freisetzung der hauptsächliche Wirkmechanismus von cGMP ist. Eine cGMP/cGKI-vermittelte Aktivierung der Myosin Phosphatase kann als möglicher Mechanismus der cGMP-abhängigen Relaxation im Jejunum in Frage kommen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der Phosphatase-Inhibitor Calyculin A die cGMP-abhängige Relaxation in diesem Gewebe beeinflusst. Die Vorinkubation mit Calyculin A (100 nM) bewirkt eine zusätzliche Kraftentwicklung um ca. 100% im Colon und im Jejunum (siehe Abbildung 26). Da Phosphatase-Inhibitoren am glatten Muskel kontrahierend wirken, ist der Kraftanstieg ein Zeichen für die Wirksamkeit des Stoffes. Die Originalaufzeichnungen der Kraftentwicklung zeigen, dass die Applikation von 8-Br-cGMP eine deutliche

Relaxation im Colon (wie unter Kontrollbedingungen), aber keine Relaxation im Jejunum (siehe Abbildung 27 A und B) bewirkt.

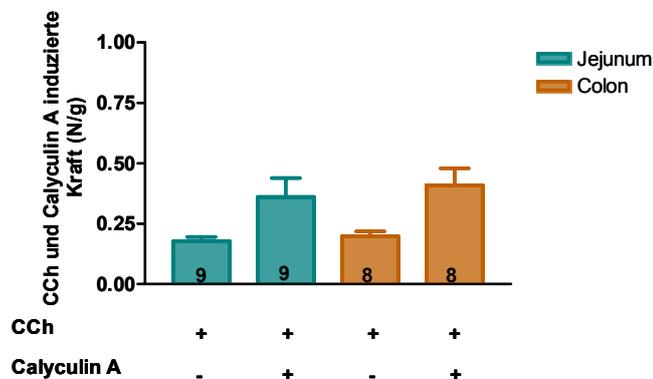
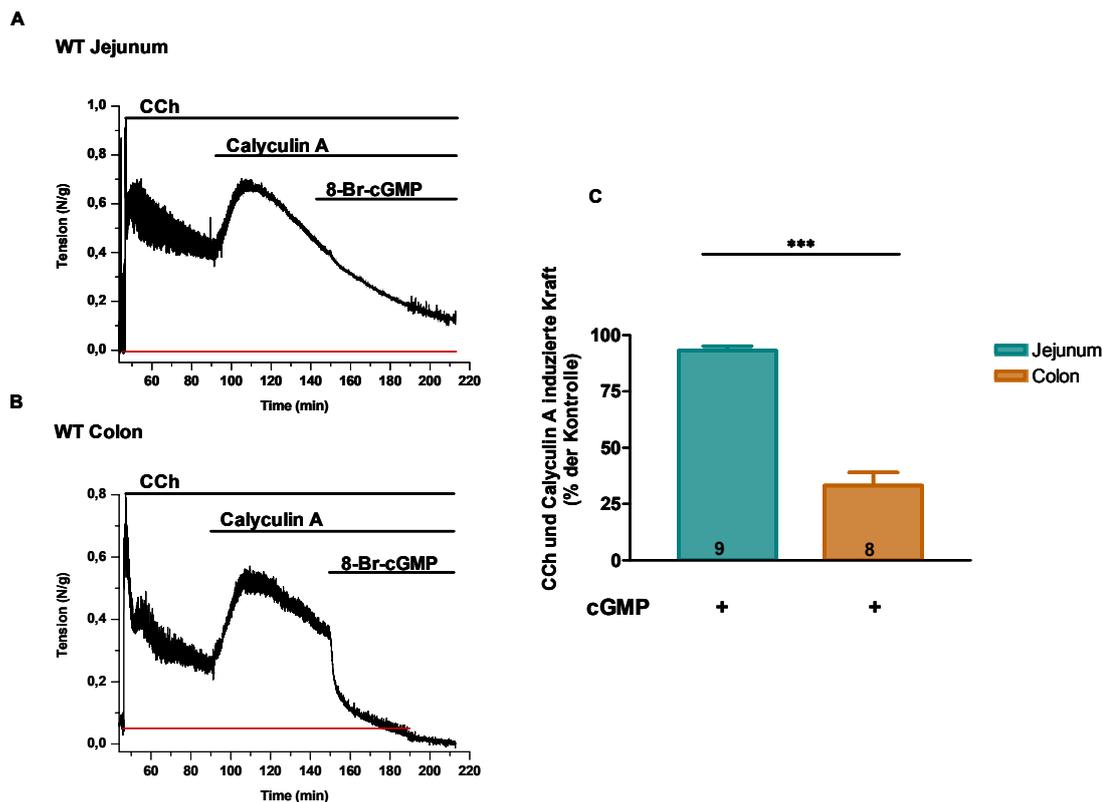


Abbildung 26: Kraftentwicklung (Mittelwerte \pm SEM) des Colons und des Jejunums nach Stimulation mit CCh (10 μ M) und Calyculin A (100 nM). Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben.

Aus der Abbildung 27 C ist ersichtlich, dass der Calyculin A induzierte Tonus im Colon der Wildtypmaus durch 8-Br-cGMP auf eine Restkraft von 33% (\pm 6%) relaxiert wird. Im Unterschied dazu wird der Calyculin A induzierte Tonus im Jejunum mit 93% (\pm 2%) Restkraft so gut wie nicht reduziert (n=8-9).

In der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Maus zeigt 8-Br-cGMP auf den durch CCh und Calyculin A im Jejunum induzierten Tonus mit einer Restkraft von 94% (\pm 1%) ebenfalls keine Wirkung (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt).

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Gegensatz zum Colon am Jejunum eine Phosphatase für die durch cGMP hervorgerufene Relaxation des Hormon induzierten Tonus von Bedeutung ist. Diese Ergebnisse deuten auf eine cGMP/cGKI-vermittelte Aktivierung einer Phosphatase als Relaxations-Mechanismus im Jejunum hin. Bei dieser Phosphatase handelt es sich vermutlich um die MLCP.



*Abbildung 27: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μM) auf den mit CCh (10 μM) und Calyculin A (100 nM) vorkontrahierten Längsmuskel im Darm. In A und B sind Originalregistrierungen von Kraftmessungen am Colon und Jejunum von Wildtypmäusen gezeigt. In C sind die Mittelwerte ± SEM dieses Versuches dargestellt. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben. *** steht für hoch signifikant (p < 0,001).*

4.2.4 Effekt von 8-Br-cGMP auf mit Kalium Ionen stimulierten glatten Muskel des Darms

4.2.4.1 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit Kalium Ionen vorkontrahierten Längsmuskel im Colon

In den bisherigen Experimenten wurde die Rolle von IRAG bei der Relaxation des Hormon induzierten Tonus untersucht. Mit den folgenden Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob IRAG auch die durch cGMP hervorgerufene Relaxation der Depolarisations induzierten Kontraktion beeinflussen kann. In Gewebepreparaten kann eine Depolarisation der Zytoplasmamembran durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration hervorgerufen werden. Zu diesem Zweck wurden Colonpräparate mit Kalium (85 mM) depolarisiert. Geht man von einer intrazellulären Kaliumkonzentration von rund 150 mM aus, werden bei 85 mM extrazellulärem Kalium

die Zellmembranen auf -10 mV depolarisiert (nach Nernst). In den Abbildung 28 A bis C sind die Originalaufzeichnungen der Kraftmessungen von einer Wildtypmaus, einer $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Maus und einer $cGKI^{-/-}$ Maus beispielhaft zu sehen.

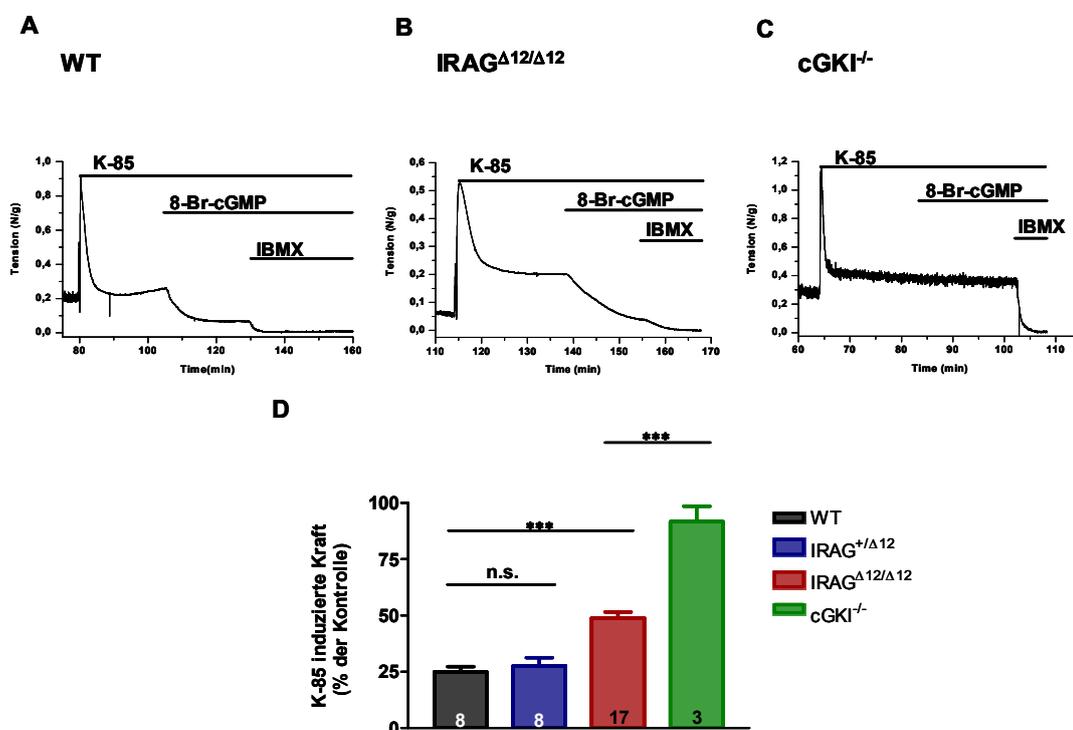


Abbildung 28: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon. In den Abbildungen A, B und C sind Originalregistrierungen am Colon einer Wildtyp-, einer $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ - und einer $cGKI^{-/-}$ Maus gezeigt. Als Positiv-Kontrolle wurde IBMX in einer Konzentration von 100 μ M zugegeben. In D sind für jede Mauslinie die Mittelwerte \pm SEM der 8-Br-cGMP-Wirkung auf den Kalium induzierten Tonus angegeben. Die schwarzen Balken stellen die Inkubationszeit der verschiedenen Substanzen dar. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben, n. s. steht für nicht signifikant, *** steht für hoch signifikant ($p < 0,001$).

Im Unterschied zum Hormon induzierten Tonus zeigt 8-Br-cGMP sowohl im Colon der Wildtypmäuse als auch im Colon der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäuse eine deutliche Wirkung. Der Kalium induzierte Tonus wird in den Wildtypmäusen und in den heterozygoten $IRAG^{+/Δ12}$ Mäusen auf ca. 27% (n=8) sowie in den $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen auf 49% (\pm 3%) (n=17) Restkraft reduziert. Im Colon der $cGKI^{-/-}$ Mäuse dagegen zeigt 8-Br-cGMP kaum eine Wirkung. In der Abbildung 28 D sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe für jede Mauslinie statistisch zusammengefasst. Die Restkraft im Colon der $cGKI^{-/-}$ Mäuse beträgt, ähnlich wie bei der Relaxation des Hormon induzierten Tonus am Colon, 92% (\pm 7%) (n=3).

4.2.4.2 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit Kalium Ionen vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum

In Abbildung 29 A bis C sind beispielhaft Originalregistrierungen der Kontraktionskraft am Jejunum von Wildtyp-, IRAG^{Δ12/Δ12}- und cGKI^{-/-} Mäusen gezeigt. Wie schon bei der Depolarisation im Dickdarm wurden die Jejunumpräparate zuerst mit Kalium (85 mM) stimuliert.

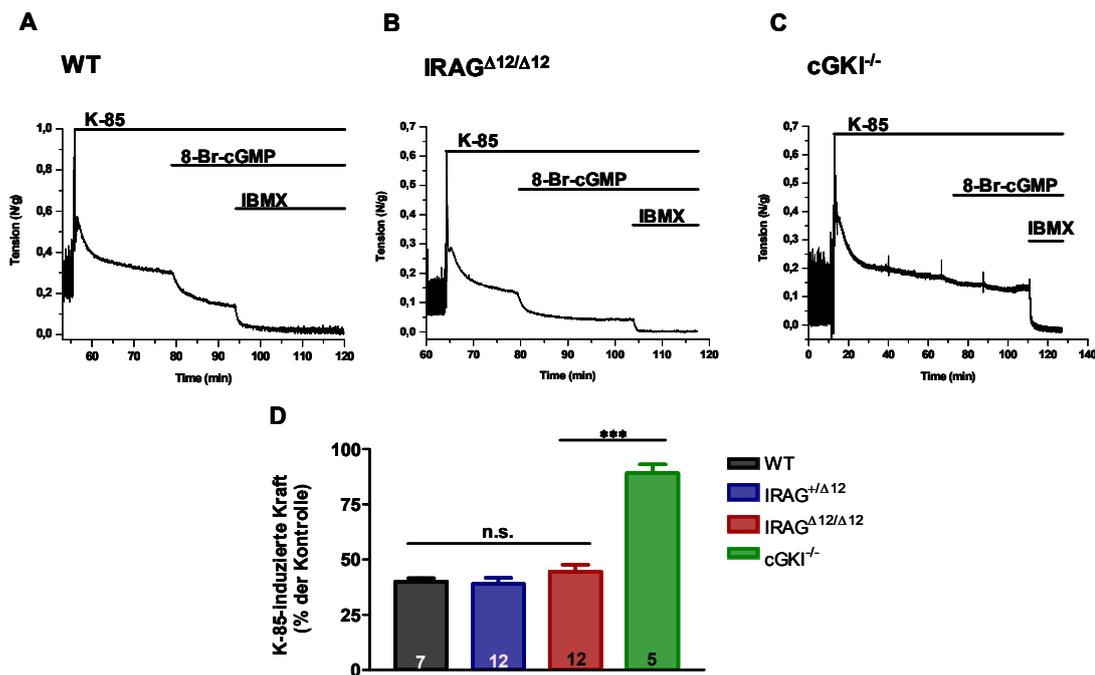


Abbildung 29: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum. In den Abbildungen A, B und C sind Originalaufzeichnungen am Jejunum einer Wildtyp-, einer IRAG^{Δ12/Δ12}- und einer cGKI^{-/-} Maus gezeigt. Als Positivkontrolle wurde IBMX in einer Konzentration von 100 μ M zugegeben. In D sind für jede Mauslinie die Mittelwerte \pm SEM der 8-Br-cGMP-Wirkung auf den Kalium induzierten Tonus angegeben. Die schwarzen Balken stellen die Inkubationszeit der verschiedenen Substanzen dar. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben, n. s. steht für nicht signifikant, *** steht für hoch signifikant ($p < 0,001$).

Der Kalium induzierte Tonus wird im Jejunum der Wildtyp- und der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse durch 8-Br-cGMP gleichermaßen relaxiert (n=7-12), aber nicht in den Jejunumpräparaten der cGKI^{-/-} Mäuse. In der Abbildung 29 D sind die Ergebnisse dieses Versuchs für jede Mauslinie als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. Die Restkraft beträgt nach der Relaxation mit 8-Br-cGMP im Jejunum der Wildtyp-, der heterozygoten IRAG^{+/Δ12}- und der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse zwischen 40% (\pm 1%) und 44% (\pm 3%). Der Vergleich der unterschiedlichen Gruppen bezüglich des cGMP vermittelten Effekts

war im ungepaarten t-Test nicht signifikant. Ganz im Gegensatz dazu hatte cGMP im Jejunum der cGKI^{-/-} Mäuse keinen Effekt, die Restkraft beträgt hier 90% (\pm 4%) (n=5).

4.2.4.3 Übersicht der relaxierenden Effekte von 8-Br-cGMP auf den mit Kalium Ionen vorkontrahierten Längsmuskel in verschiedenen Darmabschnitten

Wie aus der Abbildung 30 ersichtlich ist, wird der durch Depolarisation induzierte Tonus in den einzelnen Dünndarmabschnitten von Wildtyp-, heterozygoten IRAG^{+/ Δ 12}- und IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mäusen deutlich auf ca. 33 bis 45% (\pm 3%) Restkraft relaxiert (n=5-12).

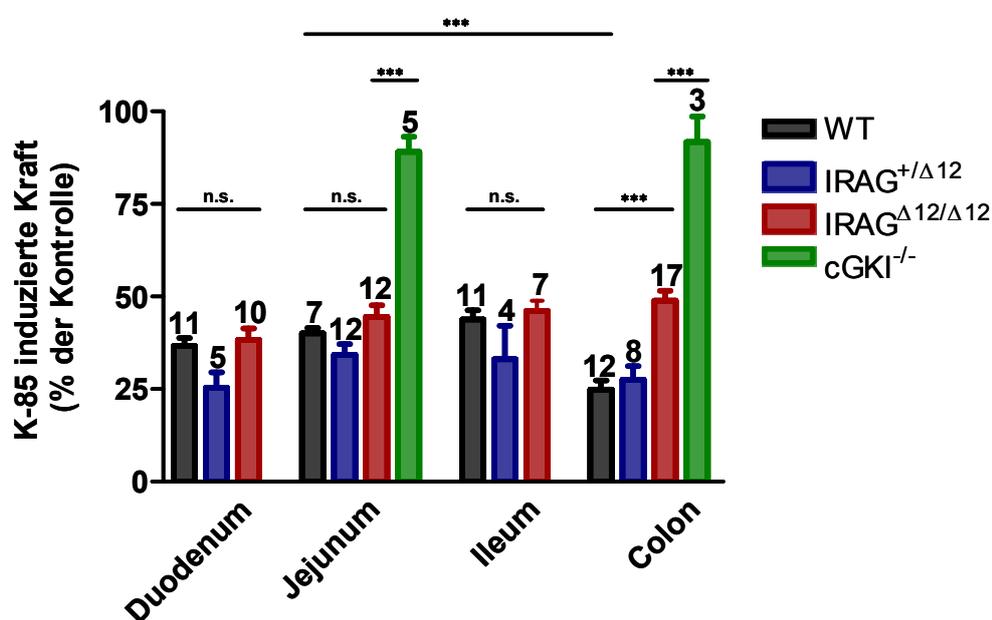


Abbildung 30: Relaxierender Effekt (als Mittelwerte \pm SEM) von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) vorkontrahierten Längsmuskel in unterschiedlichen Darmabschnitten der verschiedenen Mauslinien. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist über den Balken angegeben. Wobei n. s. für nicht signifikant und *** für hoch signifikant ($p < 0,001$) steht.

Aufgrund dieses Ergebnisses kann man davon ausgehen, dass IRAG bei der Relaxation des Kalium induzierten Tonus durch 8-Br-cGMP im Dünndarm keine Bedeutung hat. Die Tatsache, dass 8-Br-cGMP in den Colonpräparaten der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mäuse eine deutlich schlechtere Relaxation bewirkt, legt allerdings den Schluss nahe, dass IRAG im Colon bei diesem Mechanismus von Bedeutung ist (siehe Abbildung 30). Die relaxierende Wirkung von 8-Br-cGMP ist in den Wildtypmäusen mit 25% (\pm 2%) Restkraft (n=12) sehr viel stärker als in den IRAG-Mutanten mit 49% (\pm 3%) Restkraft

(n=17). Sowohl in den Dünndarm- als auch in den Dickdarmpräparaten der cGKI^{-/-} Mäuse zeigt 8-Br-cGMP hingegen keine Wirkung (Restkraft 92% (\pm 7%)) (n=3). Aufgrund dieses Ergebnisses kann man davon ausgehen, dass auch die Relaxation des durch Kaliumdepolarisation hervorgerufenen Tonus im Dün- und Dickdarm von der cGKI vermittelt wird.

4.2.4.4 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit Kalium Ionen und Calyculin A vorkontrahierten Längsmuskel im Darm

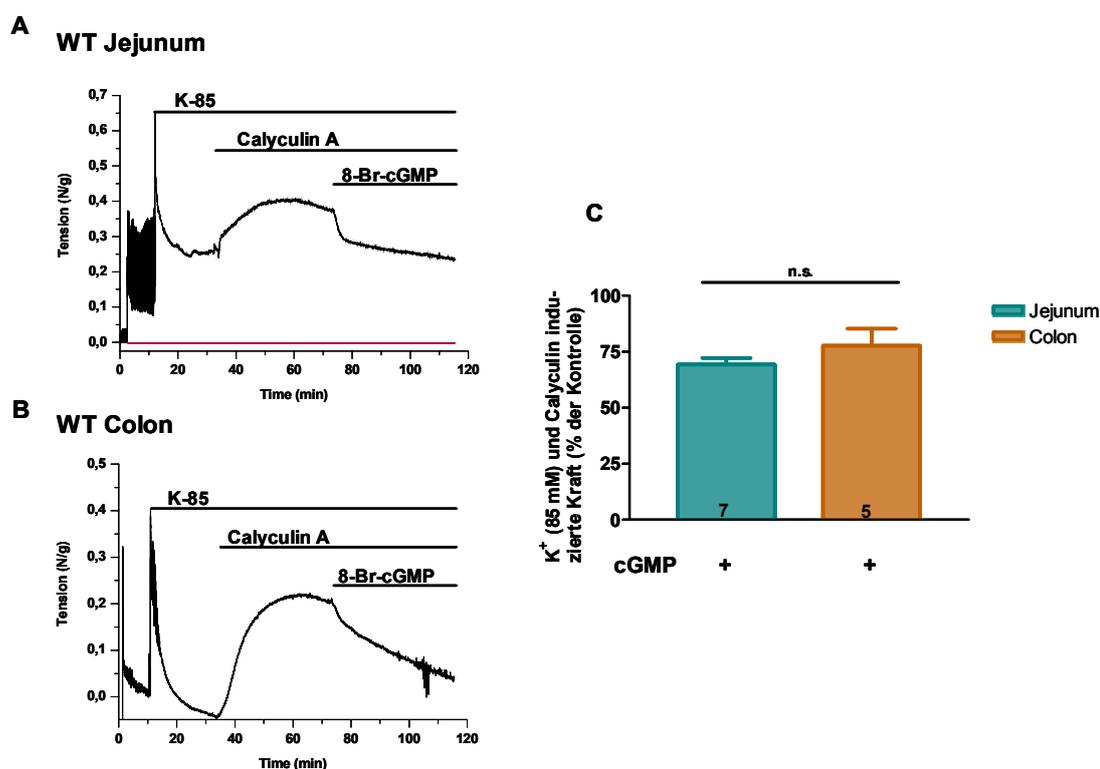


Abbildung 31: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Kalium (85 mM) und Calyculin A (100 nM) vorkontrahierten Längsmuskel im Darm. In A und B sind die Originalregistrierungen von Kraftmessungen am Colon und am Jejunum von Wildtypmäusen gezeigt. Die schwarzen Balken stehen für die Einwirkdauer der verschiedenen Substanzen. In C sind die Mittelwerte \pm SEM dieses Versuches abgebildet. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben, n.s. steht für nicht signifikant.

Analog zu den vorhergehenden Versuchen stellte sich folglich zusätzlich die Frage, ob eine Phosphatase an der Relaxation des Kalium induzierten Tonus durch 8-Br-cGMP beteiligt ist (siehe 4.2.3.7). Um diese Frage zu beantworten, wurde wiederum der Phosphatase-Hemmstoff Calyculin A verwendet. Der Versuchsaufbau entsprach dem der Hemmung der Phosphatase beim Hormon induzierten Tonus (siehe 4.2.3.7).

In Abbildung 31 A und B sind Originalaufzeichnungen von Kraftmessungen am Jejunum und am Colon einer Wildtypmaus gezeigt. In den Abbildungen ist die relaxierende Wirkung von 8-Br-cGMP auf den durch CCh und Calyculin A hervorgerufenen Tonus in beiden Geweben deutlich zu sehen (siehe Abbildung 31 A und B). In Abbildung 31 C ist die statistische Auswertung dieser Versuchsreihe dargestellt. Dabei zeigt sich, dass der durch Kalium und Calyculin A induzierte Tonus sowohl im Jejunum mit 70% ($\pm 3\%$) Restkraft (n=7) als auch im Colon mit 77% ($\pm 8\%$) Restkraft (n=5) durch 8-Br-cGMP relaxiert wird. Wie die Abbildung 31 C zeigt, ist der durch cGMP vermittelte Effekt an den beiden untersuchten Geweben nicht signifikant verschieden (Restkraft 70 bzw. 77%).

4.2.5 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit Thapsigargin stimulierten glatten Muskel im Darm

4.2.5.1 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit Thapsigargin vorkontrahierten Längsmuskel im Colon

Neben den bereits aufgezeigten Stimulationsmöglichkeiten wurde noch eine weitere Hormon-unabhängige Kontraktionsmöglichkeit untersucht. Im glatten Muskel führt die pharmakologische Entleerung sarkoplasmatischer Calciumspeicher durch Inhibitoren der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen (SERCAs) zu einer messbaren Kontraktion. Unter diesen Bedingungen sollten die relaxierenden Effekte von 8-Br-cGMP, die auf einer Hemmung der Calciumfreisetzung beruhen, eliminiert sein. Als SERCA-Inhibitor kam hier Thapsigargin zur Anwendung (Berridge, 1993). Um die Frage zu klären, ob 8-Br-cGMP bei einem durch Thapsigargin induzierten Tonus relaxierend wirkt, wurden Colonpräparate von drei verschiedenen Mauslinien mit Thapsigargin inkubiert. Die Abbildung 32 A und B zeigt beispielhaft Originalaufnahmen von Kraftmessungen am Colon einer Wildtypmaus und einer $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mutante. Die Mittelwerte dieser Messungen zeigen, dass der induzierte Tonus in den Wildtypmäusen mit 27% ($\pm 4\%$) Restkraft (n=12) deutlich stärker reduziert wird als in den $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen mit einer Restkraft von 66% ($\pm 4\%$) (n=8) (siehe Abbildung 32 C). In den $\text{cGKI}^{-/-}$ Mäusen wird dagegen der Thapsigargin induzierte Tonus durch 8-Br-cGMP nicht beeinflusst.

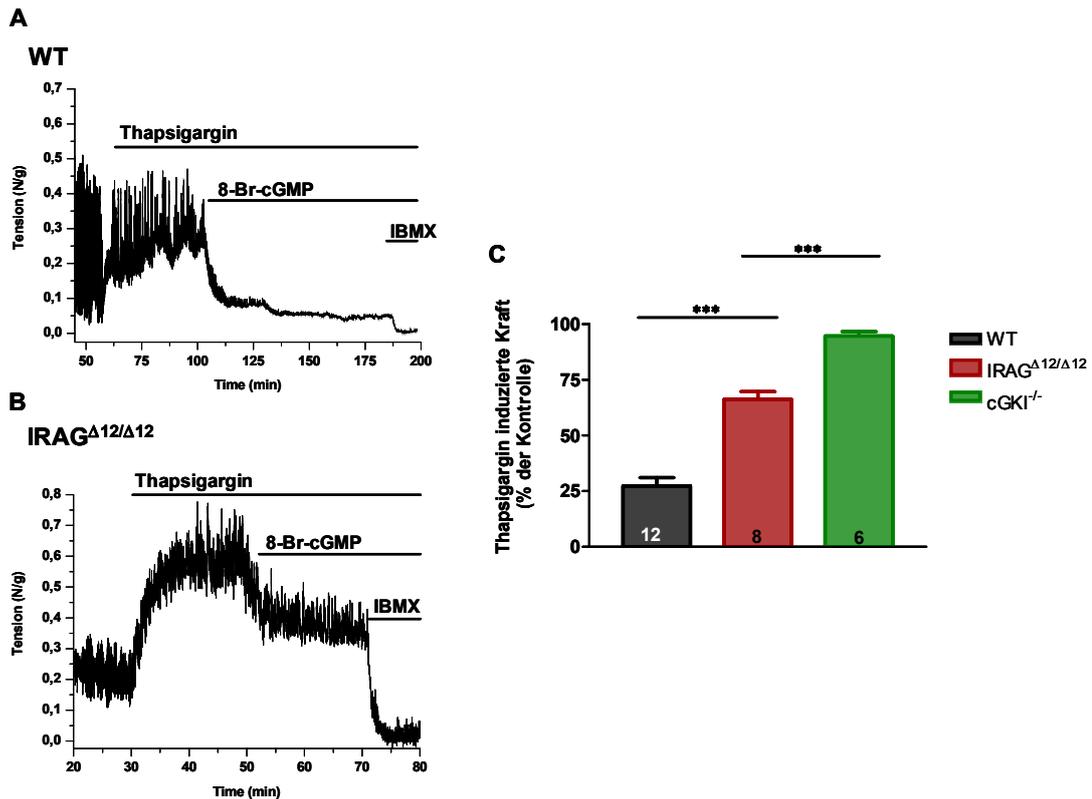


Abbildung 32: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μ M) auf den mit Thapsigargin (1 μ M) vorkontrahierten Längsmuskel im Colon. In den Abbildungen **A** und **B** werden die Originalregistrierungen am Colon einer Wildtyp- und einer IRAG^{Δ12/Δ12} Maus gezeigt. Als Positiv-Kontrolle wurde IBMX in einer Konzentration von 100 μ M zugegeben. Der schwarze Balken gibt die Inkubationszeit der verschiedenen Substanzen an. In **C** sind für jede Mauslinie die Mittelwerte \pm SEM abgebildet. Die Anzahl *n* der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben. *** steht für hoch signifikant ($p < 0,001$).

4.2.5.2 Effekt von 8-Br-cGMP auf den mit Thapsigargin vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum

Das Endoplasmatische Reticulum erfüllt eine wichtige Rolle in der Regulation des zytosolischen Calcium-Haushaltes einer Zelle und damit auch bei der Kontraktion einer glatten Muskelzelle. In dieser Serie von Experimenten wurde, wie auch schon im Colon, die relaxierende Wirkung von 8-Br-cGMP auf den durch Thapsigargin hervorgerufenen Tonus untersucht (siehe 4.2.5.1). Die Versuchsanordnung entsprach der bei den Versuchen mit Präparaten des Colons. In Abbildung 33 A und B sind beispielhaft Originalregistrierungen von Kraftmessungen an einer Wildtyp- bzw. an einer IRAG^{Δ12/Δ12} Maus gezeigt. In Abbildung 33 C ist die statistische Auswertung dieser Versuche dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, dass die deutliche Wirkung von 8-Br-cGMP an den Präparaten der Wildtypmäuse und an den Präparaten der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse mit einer Restkraft von 25% (\pm 4%) bzw. von 40% (\pm 11%) sich nicht unterscheidet ($n=10-12$). Auf den

Thapsigargin induzierten Tonus in den Muskeln der $cGKI^{-/-}$ Maus (Restkraft $97\% \pm 2\%$) zeigt 8-Br-cGMP dagegen keine Wirkung.

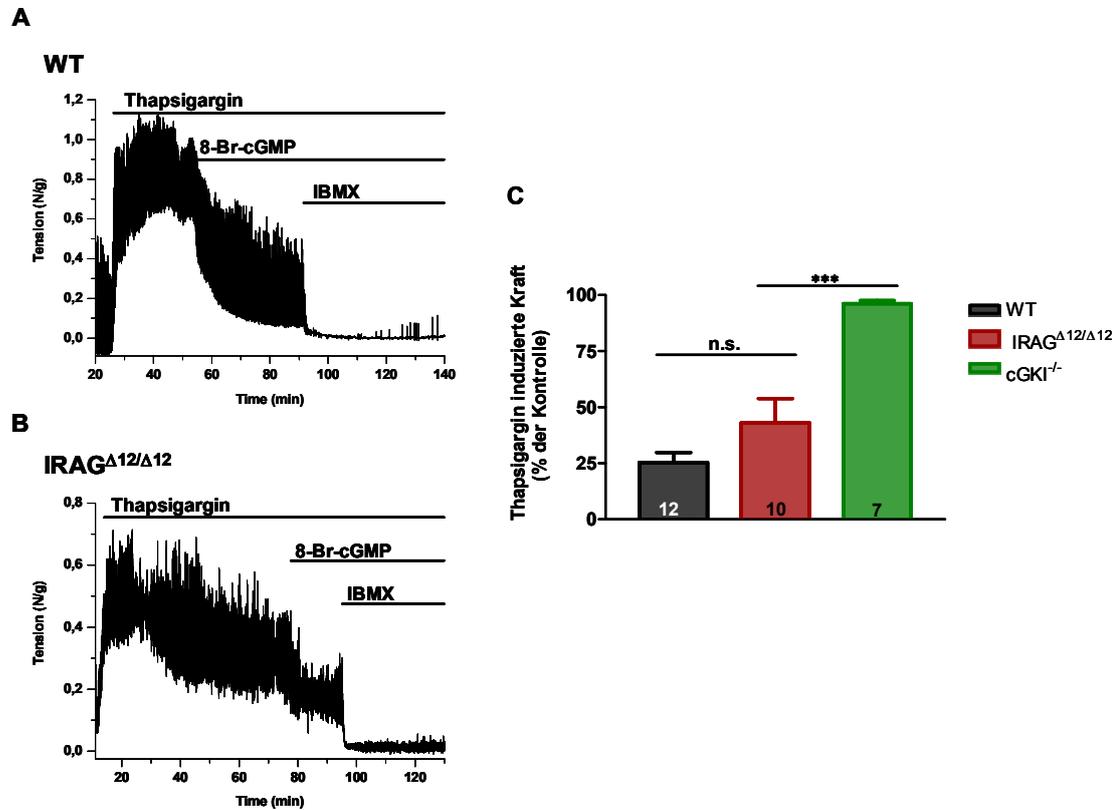


Abbildung 33: Relaxierender Effekt von 8-Br-cGMP (300 μM) auf den mit Thapsigargin (1 μM) vorkontrahierten Längsmuskel im Jejunum. In **A** und **B** werden Originalregistrierungen am Jejunum einer Wildtyp- und einer IRAG $\Delta 12/\Delta 12$ Maus gezeigt. Als Positiv-Kontrolle wurde IBMX in einer Konzentration von 100 μM zugegeben. Der schwarze Balken gibt die Inkubationszeit der verschiedenen Substanzen an. Für jede Mauslinie sind die Mittelwerte \pm SEM dieser Versuchsreihe in **C** abgebildet. Die Anzahl n der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben, n.s. steht für nicht signifikant und *** steht für hoch signifikant ($p < 0,001$).

5 Diskussion

5.1 Physiologische Bedeutung von IRAG

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Essentialität des cGKI Substrates IRAG bei der Vermittlung der NO/cGMP/cGKI Signalkaskade abhängig vom Darmabschnitt ist. So vermittelt IRAG fast vollständig die Effekte von cGMP im Colon, aber nicht im Jejunum. Ferner konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit mögliche Erklärungen für den Phänotyp der IRAG^{Δ12/Δ12} Mutante gefunden werden.

5.1.1 Maus-Mutanten mit einem Defekt im NO/cGMP/cGKI Signalweg

Im Unterschied zu den cGKI defizienten Mäusen weisen die IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse keine Mangelernährung auf und bleiben in ihrer körperlichen Entwicklung auch nicht zurück. Ganz im Gegensatz dazu steht der Phänotyp der Guanylylcyclase Knockout Mäuse. Diese Mäuse, bei denen die β1 Untereinheit der NO sensitiven Guanylylcyclase ausgeschaltet wurde, zeigen ähnlich wie die cGKI^{-/-} Mäuse ein deutlich reduziertes Körpergewicht und eine reduzierte Körpergröße (Pfeifer et al., 1998; Friebe et al., 2005).

Die Überlebensrate der unterschiedlichen Mauslinien spiegelt dieses Bild wider. Während die cGKI und die Guanylylcyclase Knockout Mäuse meist schon im Alter von ca. vier Wochen sterben (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000; Friebe et al., 2005), weisen die IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse zwar eine verringerte Lebenserwartung auf, werden aber doch deutlich älter als die anderen beiden Mauslinien (Geiselhöringer et al., 2004b).

Die Dilatation des Gastrointestinaltrakts und die verzögerte Magen-Darm-Passage gehören zum Phänotyp mehrerer Mauslinien. So zeigen diesen Phänotyp neben den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen und den cGKI^{-/-} Mäusen auch die nNOS Knockout Mäuse (Huang et al., 1993). Ob die IRAG Deletionsmutante eine Pylorus-Stenose hat, ist noch nicht geklärt und weitgehend Gegenstand aktueller Forschung. Bei der cGKI^{-/-} Maus wurde eine Pylorus-Stenose hingegen beschrieben (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000). Aber auch die nNOS defizienten Mäuse zeigen diesen Phänotyp (Huang et al., 1993). Die eröffnete Bauchhöhle der Guanylylcyclase Knockout Maus bietet ein der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus sehr ähnliches Bild. Auch diese Maus zeigt eine extreme Füllung und

Dilatation des gesamten Gastrointestinaltrakts. Das Darmkonvolut kann unter Umständen sogar so stark gefüllt sein, dass es zur Ruptur des Darms kommt (Friebe et al., 2005).

Die vorliegenden Untersuchungen an diesen Mausmutanten zeigen, dass der NO/cGMP/cGKI Signalweg eine wichtige Funktion im Gastrointestinaltrakt innehat. Massive Störungen dieses Signalwegs, z. B. durch die Deletion der cGKI oder von IRAG, führen zu einem deutlichen Phänotyp mit massiven Veränderungen im Gastrointestinaltrakt und zu einer geringeren Lebenserwartung.

5.2 Physiologische Bedeutung von IRAG im Gastrointestinaltrakt

Die β -Isoform der cGKI bildet zusammen mit dem IP₃-Rezeptor I und IRAG einen makro-molekularen Komplex, welcher an der Membran des SR lokalisiert ist (Schlossmann et al., 2000; Ammendola et al., 2001). Andere Studien zeigen, dass IRAG an der cGKI-abhängigen Hemmung der Calciumfreisetzung im glatten Muskel beteiligt ist (Geiselhöringer et al., 2004b; Fritsch et al., 2004).

5.2.1 Regulation der Spontanaktivität unterschiedlicher Darmabschnitte

Durch lichtmikroskopische und konfokale Laser-Scan-mikroskopische Studien wurde gezeigt, dass IRAG und die cGKI nicht nur in der glatten Muskelzelle exprimiert werden, sondern auch in Zellen des Plexus nervorum myentericus (Geiselhöringer et al., 2004a). In diesem Plexus befinden sich sowohl Neurone als auch interstitielle Zellen von Cajal. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass es neben der direkten Wirkung von NO auf die glatte Muskelzelle eine neuromodulatorische Wirkung von NO über die cGKI im Gastrointestinaltrakt geben könnte. Zellen, die spontane Membrandepolarisationen auslösen und eine Schrittmacherfunktion übernehmen, sind die so genannten interstitiellen Zellen von Cajal. Diese Zellen sind durch gap junctions mit den glatten Muskelzellen elektrisch gekoppelt und bestimmen so die Spontanaktivität (Hanani und Freund, 2000). Der Ausfall der cGKI/IRAG Signalkaskade hat allerdings, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, keine Auswirkung auf die Spontanaktivität von Dünn- und Dickdarm in Ruhe. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass IRAG bei der Entstehung der Spontanaktivität in Ruhe sowohl im Dickdarm als auch in allen drei Dünndarmabschnitten keine Funktion hat.

Nach der Stimulation mit 8-Br-cGMP zeigen sich jedoch unterschiedliche Effekte in den Darmmuskeln der verschiedenen Mauslinien. cGMP moduliert die Spontanaktivität. Sowohl im Colon als auch im Jejunum werden die Frequenz und die Amplitude verringert. Im Jejunum wird dieser Effekt offenbar über IRAG/cGKI-vermittelt, da ein modulierender Effekt von 8-Br-cGMP in den IRAG^{Δ12/Δ12}- und in den cGKI^{-/-} Mäusen fehlt. Im Colon wird der Effekt offensichtlich anders vermittelt, da 8-Br-cGMP im Muskel der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse wie in dem der Wildtypmäuse, die Frequenz und die Amplitude verringert. Diese Reduzierung der Amplitude war allerdings in der Mausmutante nicht so deutlich ausgeprägt wie in den Wildtypmäusen. Dies spricht für eine potentielle Beteiligung von IRAG am modulierenden Effekt von 8-Br-cGMP auf diese Parameter.

5.2.2 Effekt von IRAG auf die Relaxation des CCh stimulierten Darmmuskels

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass IRAG essentiell ist, um die Hormon induzierte Kontraktion im Colon durch 8-Br-cGMP zu relaxieren. Hieraus kann geschlossen werden, dass IRAG in der NO/cGMP-abhängigen Signalübertragung im Colon eine bedeutende Rolle spielt. Eine Unterdrückung der Hormon induzierten Kontraktion nach Vorinkubation mit 8-Br-cGMP konnte zwar bei den Wildtyppräparaten, aber nicht bei den Colonpräparaten der IRAG^{Δ12/Δ12}- bzw. bei den Präparaten der cGKI^{-/-} Mäuse festgestellt werden. Der Hormon induzierte Muskeltonus wurde in den Colonpräparaten der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse und der cGKI^{-/-} Mäuse nur gering relaxiert. Im glatten Muskel des Colons wird die Hormon induzierte Muskelkontraktion hauptsächlich durch einen Anstieg der IP₃ induzierten Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern vermittelt (Zhang und Buxton, 1991; Bayguinov et al., 2001; McCarron et al., 2002). Ferner konnte durch Calciummessungen an humanen Colonzellen gezeigt werden, dass IRAG eine Bedeutung für die Hemmung der IP₃ induzierten Calciumfreisetzung hat (Fritsch et al., 2004). Ebenso haben Geiselhöringer et al., (2004b) gezeigt, dass IRAG auch in glatten Gefäßmuskelzellen eine wichtige Funktion bei der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration und damit auch bei der Regulation des Muskeltonus einnimmt. Analog zum Längsmuskel des Colons spielt IRAG bei der Relaxation des CCh induzierten Tonus am Ringmuskel ebenfalls eine wichtige Rolle.

Versuche mit dem cAMP-Analogen cBIMPS konnten eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase an der cGMP-abhängigen Relaxation des Hormon induzierten

Tonus im Colon ausschließen. cBIMPS führte in den Muskelpräparaten aller drei untersuchten Mauslinien zu einer deutlichen Relaxation des durch CCh induzierten Tonus. Dieses Ergebnis wurde durch Calciummessungen an glatten Gefäßmuskelzellen von IRAG^{Δ12/Δ12} und cGKI^{-/-}-Mäusen bestätigt (Pfeifer et al., 1998; Geiselhöringer et al., 2004b). Hierbei konnte eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase an der Hemmung der Hormon induzierten Calciumtransienten ausgeschlossen werden. Diesen Ergebnissen zufolge existieren verschiedene, unabhängige Mechanismen, die den Tonus der glatten Muskulatur modulieren. Eine Kreuzreaktion von IRAG über cAMP scheint somit ausgeschlossen. cGMP und cAMP fungieren im Körper als sekundäre Botenstoffe und sind damit an der Übertragung intrazellulärer Signale in glatten Muskelzellen beteiligt (Matsumoto et al., 2003). Die cAMP-abhängigen Proteinkinasen wirken über die Regulation der Aktivität der L-Typ Calciumkanäle. Über diese beeinflussen sie möglicherweise vorwiegend die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit auch den Muskeltonus der glatten Muskulatur (Ruiz-Valesco et al., 1998; Zhou et al., 2001).

Anders als im Colon spielt IRAG im Dünndarm bei der Relaxation des Hormon induzierten Tonus keine dominante Rolle. So wurde der durch CCh hervorgerufene Tonus sowohl in den Jejunumpräparaten der Wildtypmäuse als auch in den Präparaten der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse durch 8-Br-cGMP relaxiert. Da der Unterschied in der Relaxation bei den Wildtypmäusen und den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen zwar klein, aber immer noch hoch signifikant ist, kann man davon ausgehen, dass im Jejunum mehrere Signalwege an der Relaxation beteiligt sind. Die Untersuchung von Ileum und Duodenum, die zu einem ähnlichen Ergebnis führen, untermauern diese Annahme. Anders als bei der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus wird der Hormon induzierte Tonus in den Präparaten der cGKI^{-/-} Mäuse weder im Dickdarm noch in den verschiedenen Dünndarmabschnitten relaxiert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die cGKI für die Relaxation des Hormon induzierten Tonus sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm essentiell ist.

Die bisherigen Versuche zeigen, dass IRAG die cGMP-abhängige Relaxation im Colon, aber nicht im Jejunum vermittelt. Daraus kann man schließen, dass im Jejunum neben der Hemmung der IP₃ vermittelten Calciumfreisetzung noch andere Wege an der Relaxation des Hormon induzierten Tonus beteiligt sind. Für den glatten Muskel des Ileums wurde gezeigt, dass die über die Aktivierung der Rho-Kinase und die Hemmung der MLCP vermittelte Calciumsensibilisierung die CCh induzierte Kontraktion einleitet (Kitazawa et al., 1991; Sward et al., 2000). Die reversible Phosphorylierung von Proteinen stellt einen zentralen Weg zur Steuerung zellulärer Prozesse dar.

Proteinphosphatasen sind in diesem Zusammenhang verantwortlich für die Aktivierung bzw. Inaktivierung von biochemischen Regulationsmechanismen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine cGMP/cGKI-vermittelte Aktivierung einer Phosphatase als ein möglicher Mechanismus der cGMP-abhängigen Relaxation im Jejunum in Frage kommt. In jüngster Vergangenheit konnte die Struktur einiger natürlicher Hemmsubstanzen der Proteinphosphatase I im Rahmen von Untersuchungen aufgeklärt werden. Dazu gehört das in dieser Arbeit verwendete marine Toxin Calyculin A. Auch nach der Hemmung der Phosphatase durch Calyculin A wird der induzierte Tonus im Colon durch 8-Br-cGMP deutlich relaxiert. Im Gegensatz dazu bewirkt 8-Br-cGMP im Jejunum unter identischen experimentellen Bedingungen keine Relaxation mehr. Gestützt werden die Ergebnisse dieser Arbeit durch Westernblot-Analysen, die zeigen, dass IRAG im Colon stärker exprimiert wird als im Dünndarm (Geiselhöringer et al., 2004a). Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die NO/cGMP-abhängige Muskelrelaxation in Dünn- und Dickdarm unterschiedlich vermittelt wird.

Im Colon erfolgt die Relaxation über eine IRAG-abhängige Hemmung der Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern, im Dünndarm möglicherweise durch eine IRAG-unabhängige Aktivierung einer Phosphatase.

Alle autosomalen Gene liegen in zweifacher Kopie im Genom vor und viele Gene müssen auch von beiden Allelen exprimiert werden, um eine normale Zellfunktion aufrechtzuerhalten. Ist z. B. ein Allel eines Gens verloren gegangen, so ist unter Umständen die halbe Gendosis für eine normale Zellfunktion nicht ausreichend. Führt die Inaktivierung eines der beiden Gene bereits zu einem deutlichen phänotypischen Unterschied im Vergleich zum unveränderten Organismus, spricht man von einem Gendosis-Effekt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Gendosis-Effekt ausgeschlossen werden. In den Präparaten von Mäusen, die nur ein mutiertes Gen tragen, den heterozygoten IRAG^{+/ Δ 12} Mäusen, bewirkt 8-Br-cGMP sowohl im Colon als auch im Jejunum eine ähnliche Wirkung wie in den Wildtypmäusen.

5.2.3 Effekt von IRAG auf die Relaxation des hormonunabhängig stimulierten Darmmuskels

Die Depolarisation der Zytoplasmamembran ist eine Hormon-Rezeptor-unabhängige Stimulationsform, infolge der es zu einem Einstrom von Calcium in das Zytosol kommen kann.

Im Unterschied zum Colon wurde am Dünndarm mit 8-Br-cGMP der Kalium induzierte Tonus bei IRAG^{Δ12/Δ12} und Wildtypmäusen gleich stark relaxiert. IRAG hat demnach keinen Einfluss auf den Depolarisations induzierten glatten Muskeltonus des Jejunums. Untersuchungen an den beiden anderen Dünndarmabschnitten bestätigen dieses Ergebnis. Die Hemmung der Phosphatase mit Calyculin A zeigte, dass diese bei der Relaxation des Kalium induzierten Tonus am Längsmuskel des Dünn- und Dickdarms keine Rolle spielt.

Die cGMP/cGKI-vermittelte Relaxation der durch Kalium hervorgerufenen Kontraktion war im Colon der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen deutlich abgeschwächt. Bislang ging man davon aus, dass die durch eine Depolarisation induzierte Kontraktion im glatten Muskel vor allem von der Aktivierung der L-Typ Calciumkanäle abhängig ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Depolarisation auch die IP₃ vermittelten Calciumfreisetzung in einigen Muskeln aktivieren kann (unveröffentlichte Mitteilung).

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ließen deutlich werden, dass die IRAG^{Δ12/Δ12} Mutation zu einer im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringeren cGMP-induzierten Relaxation am longitudinalen Muskel des Colons nach Kaliumdepolarisation führt. Die Rolle von IRAG bei der Relaxation des Kalium induzierten Tonus am Colon ist noch nicht bekannt und Gegenstand aktueller Forschung.

Auch in Gefäßmuskelzellen bewirkt die Mutation im IRAG-Gen keine Veränderung bei der durch die Kaliumdepolarisation hervorgerufenen intrazellulären Calciumkonzentration (Geiselhöringer et al., 2004b). Diese wird unter Umständen von anderen Zielproteinen der cGKI reguliert (Feil et al., 2002). Hierfür in Frage kommen unter anderem die L-Typ Calciumkanäle (Ruiz-Velasco et al., 1998). Diese spielen auch bei der durch Rezeptoren gesteuerten Kontraktion der glatten Muskulatur eine große Rolle (Moosmang et al., 2003; Wegener et al., 2004).

Die Untersuchung des durch 8-Br-cGMP hervorgerufenen relaxierenden Effekts auf den durch Thapsigargin induzierten Tonus brachte ein überraschendes Ergebnis. Im Colon scheint IRAG an der Relaxation des durch die Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher entstandenen Tonus beteiligt zu sein. Denn dieser Tonus wird im Colon der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse erheblich schlechter relaxiert als in dem der Wildtypmäuse. Anders als im Colon ist die Relaxation dieses Tonus im Jejunum von Wildtyp- und

IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen annähernd gleich stark. Dies lässt darauf schließen, dass IRAG an der Relaxation dieses Tonus im Jejunum nicht beteiligt ist. Die cGKI scheint dagegen sowohl im Dünn- als auch im Dickdarm an der Reduzierung des Tonus beteiligt zu sein.

Die Ergebnisse bestätigen das Modell, in dem IRAG die cGMP/cGKI induzierte Hemmung der Calciumfreisetzung vermittelt. Jedoch deuten Befunde, dass cGMP nach Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher durch Thapsigargin im Colon der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse schlechter als in den Wildtypmäusen wirkt, auf eine bisher unbekannte Wirkungsweise von IRAG hin. Dem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum dienen in Zellen Calcium permeable Kanäle in der Zellmembran, die sich in folgende Gruppen unterteilen lassen: ligandengesteuerte Kanäle (ligand-gated channel/LGC), second-messenger gesteuerte Kanäle (SMOC) und speicherabhängige Kanäle (store-operated channel/SOC). Die speicherabhängigen Kanäle werden geöffnet als Folge der Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher. Der daraus resultierende Calciumeinstrom wird als speicherabhängiger Calciumeinstrom (store-operated calcium entry/SOCE) bezeichnet. Dieser, auch als capacitativer Calciumeinstrom bezeichnete Mechanismus, gilt als Maß für die Aktivierung der SOCs („Store-operated channels“) in der Zellmembran nach dem Schließen der intrazellulären Speicher. Momentan sind einige Alternativen im Gespräch, die an diesem Mechanismus beteiligt sein könnten (Bolotina und Csutora, 2005). Eine Möglichkeit wäre die Aktivierung einer bestimmten Untergruppe dieser SOCS, die direkt mit dem IP₃ Rezeptor Typ I interagiert (Vandeen Abeele et al., 2004). TRP-Kanäle (TRP für „Transient Receptor Potential“) nehmen in der Zellmembran die Stellung von SOCs ein (Nilius und Droogmans, 2001; Montell et al., 2002; Plant und Schaefer, 2003). Sie weisen eine hohe Permeabilität für Calcium auf und werden über den Phospholipase C-abhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert (Inoue et al., 2001; Plant und Schaefer, 2003). Die Aktivierung der Phospholipase C führt zur Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher. Das bedingt mittels bestimmter Signalmoleküle den Einstrom von Calcium über die TRP-Kanäle in das Innere der Zelle.

Die Relaxation des Thapsigargin induzierten Tonus kann über eine Calciumdesensibilisierung oder auch über die Hemmung der SOC-Kanäle erfolgen. Nach bisherigen Vorstellungen operieren diese beiden Mechanismen aber unabhängig von Calciumspeichern bzw. von der Calciumfreisetzung. Bislang ging man davon aus, dass diese Kanäle nicht von IRAG moduliert werden. Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass IRAG nicht in der Zellmembran, sondern in der Membran des ER lokalisiert ist.

Triuppathi et al., entdeckte 2003 eine direkte Kopplung des N-Terminus des IP₃-Rezeptors Typ I mit dem C-Terminus der TRP-Kanäle. Da IRAG einerseits mit dem IP₃-Rezeptor Typ I und der cGKI β als ein trimere Komplex vorliegt und andererseits der IP₃-Rezeptor Typ I direkt mit den TRP-Kanälen gekoppelt ist, könnte IRAG Einfluss auf den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum nehmen. Die Relaxation des durch Thapsigargin induzierten Tonus am Colon erbrachte hoch signifikante Unterschiede zwischen den IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mäusen und den Wildtypmäusen. Dies könnte ebenfalls als Hinweis für einen möglichen Einfluss von IRAG auf den Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum über die TRP-Kanäle gelten. Um hier genauere Aussagen treffen zu können, sind eine Reihe von weiterführenden Untersuchungen notwendig. Da dieser Unterschied nur im Colon vorhanden ist, sollte dieser Weg vor allem im Dickdarm in den Mittelpunkt der Betrachtungen gerückt werden.

6 Ausblick

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte die Rolle von IRAG bei der Regulation des glatten Muskeltonus charakterisiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Rolle von IRAG in den einzelnen Abschnitten des Darms unterschiedlich ausgeprägt war. Weiterführende Untersuchungen könnten klären, ob diese Unterschiede ebenfalls in verschiedenen Gefäßen auftreten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf eine funktionelle Veränderung des Pylorus in der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus hin. Eine endoskopische Untersuchung des Gastrointestinaltrakts könnte Aufschluss geben, ob bei der IRAG^{Δ12/Δ12} Mutante wirklich eine Pylorusstenose vorliegt und ob diese der Grund für den aufgezeigten Phänotyp sein kann.

Eine andere Erklärung für diesen Phänotyp wären aber auch funktionelle Veränderungen am Colon. Nach der vorliegenden Studie könnte der Phänotyp der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus durchaus auch über das Colon zustande kommen.

Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes „Fura-2“ und die gleichzeitige Messung der Aktionspotentiale könnten die Funktion von IRAG bei der Relaxation des Hormon induzierten Tonus noch genauer beleuchten. Da die Rolle von IRAG bei der Relaxation des Kalium induzierten und des Thapsigargin induzierten Tonus im Colon noch nicht geklärt ist, sind insbesondere auch hierfür Messungen der zytosolischen Calciumkonzentration und eine quantitative Fluoreszenzmikroskopie anzuraten.

Eine weitere Möglichkeit, um den molekularen Mechanismus von IRAG im Funktionsablauf der glatten Muskulatur genauer zu ermitteln, wäre die Generierung einer glattmuskelspezifischen IRAG Knockout Maus.

Den molekularen Mechanismus von IRAG in der glatten Muskulatur aufzuklären ist von enormer Bedeutung. Mit der besseren Kenntnis der Regulationswege der Relaxation, insbesondere der Funktion von IRAG, könnte man Hinweise auf die Ursache von verschiedenen Krankheiten, wie Bluthochdruck oder Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, erlangen. Ferner ermöglicht ein besseres Wissen über die Regulation der NO/cGMP/cGKI Signalkaskade in der glatten Muskulatur einerseits die

Entwicklung von Pharmaka mit gezielten Angriffspunkten in diesem Signalweg. Andererseits führt ein besseres Verständnis dieses Signalweges zu einer besseren Einschätzung von Risiken und Nebenwirkungen von NO freisetzenden Arzneimitteln. Dies scheint vor allem im Hinblick auf die unterschiedlichen Mechanismen in den einzelnen Darmabschnitten von Bedeutung

7 Zusammenfassung

Die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKI) vermittelt den relaxierenden Effekt der NO/cGMP Signalkaskade im glatten Muskel. Die Phosphorylierung des IP₃-Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrats (IRAG) ist ein Prozess, der in diesem Mechanismus involviert ist. Um dieses Modell genauer zu verifizieren, wurde die cGMP-abhängige Relaxation in Mäusen, die ein modifiziertes IRAG exprimieren, untersucht. Bei der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus handelt es sich um eine Deletionsmutante, bei der die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃-Rezeptor Typ I zerstört wurde, was dazu führt, dass IRAG nicht mit dem IP₃-Rezeptor Typ I interagieren kann. Diese Mäuse zeigen eine normale Futteraufnahme, der Kotabsatz ist aber signifikant geringer als bei Wildtypmäusen.

Eine Röntgenkontrastuntersuchung mit Hilfe von Bariumsulfat offenbarte eine deutliche Verlängerung der Darmpassagezeit, einen Megaesophagus sowie ein Megacolon. In situ-Erhebungen an der eröffneten Bauchhöhle bestätigen diese Befunde. Gründe für diese Veränderungen könnten Funktionsstörungen in der glatten Muskulatur sein. Zur Stützung dieser Vermutung wurden die cGMP-abhängigen Effekte an der glatten Muskulatur des Darmtraktes untersucht.

Die Untersuchung des Hormon induzierten Tonus im Jejunum ergab keinen signifikanten Unterschied in der cGMP-Wirkung zwischen den Wildtyp- und den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen. Der CCh induzierte Tonus im Colon der Wildtypmäuse wird im Gegensatz zu den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen durch 8-Br--cGMP um ca. 90% reduziert. Bei den IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen bewirkt 8-Br-cGMP nur eine sehr geringe Relaxation (16%) des Hormon induzierten Tonus am Längsmuskel des Colons.

Eine Vorinkubation mit dem Phosphatase-Hemmstoff Calyculin A in Präparaten von Wildtypmäusen hebt den relaxierenden Effekt von 8-Br-cGMP im glatten Muskel des Dünndarms auf, im glatten Muskel des Colons findet dagegen keine Aufhebung statt.

Die Ergebnisse zeigen, dass IRAG eine entscheidende Bedeutung für die cGMP/cGKI-vermittelte Relaxation im Colon, aber nicht im Jejunum hat. Eine cGMP/cGKI-vermittelte Aktivierung einer Phosphatase kann als möglicher Mechanismus der

cGMP-abhängigen Relaxation im Jejunum in Frage kommen. Eine mögliche Phosphatase könnte hierbei die Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP) sein.

Es ist aber nach wie vor unklar, ob diese Ergebnisse Grund für die geringe Lebenserwartung der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse sind. Um die Ursachen dafür zweifelsfrei feststellen zu können, bedarf es weiterführender Untersuchungen.

8 Summary

IRAG as a functional element of the NO/cGMP signaling cascade in the gastrointestinal tract

cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) mediates the relaxing effects of NO/cGMP signalling in smooth muscle. One mechanism involved in this process is the phosphorylation of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated G-kinase substrate (IRAG). To verify this model, we investigated cGMP-dependent relaxation in mice which express a modified IRAG that cannot associate with the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IRAG^{Δ12/Δ12} mice). These mutant mice showed normal intake of food but a reduced defecation as compared to wild type mice. Abdominal examination revealed a dilated small intestine and colon in IRAG^{Δ12/Δ12} mice pointing to dysfunction of intestinal smooth muscle. Consequently, we investigated cGMP-dependent effects in these two intestinal smooth muscles. 8-Br-cGMP relaxed hormone-triggered contractions by about 75 % and 55 % in smooth muscle of small intestine from wild type and IRAG^{Δ12/Δ12} mice, respectively. In contrast, 8-Br-cGMP relaxed hormone-triggered contractions by about 80 % in smooth muscle of colon from wild type but not from IRAG^{Δ12/Δ12} mice. Pre-incubation with the phosphatase inhibitor Calyculin A abolished the relaxant effects of 8-Br-cGMP in small intestine but not in colon smooth muscle from wild type mice. These results show that IRAG mediates cGMP-dependent relaxation in colon but only partially in small intestine smooth muscle. It is suggested that cGMP-mediated relaxation in small intestine mainly involves activation of a phosphatase, probably the Myosin light chain phosphatase (MLCP).

Literaturverzeichnis

Eigene Publikationen

Teile der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind bereits veröffentlicht worden:

- Geiselhöringer et al., 2004b** Geiselhöringer, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Wörner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. und Schlossmann, J. IRAG is essential for Relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP Kinase. *Embo J.*, **23**, 4222-4231, 2004.
- Smital et al., 2005** Smital, P., Schlossmann, J., Geiselhöringer, A., Werner, M., Hofmann, F., Wegener, J.W. Distinct mechanism regulate cGMP-triggered intestinal smooth muscle relaxation. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, 2005, Vol 371 ;**R51 214**, 2005

Zitierte Publikationen

- Akkinson et al., 1991** Akkinson, R.A., Saudek, V., Huggins, J.P., Pelton, J.T. 1H NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: a leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry*, **30 (39)**, 9387-9395, 1991.
- Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke, 2005** Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Urban und Fischer Verlag*, 18, 2005.
- Alderton et al., 2001** Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **357 (3)**, 593-615, 2001.
- Alioua et al., 1998** Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., Toro, L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, **273 (49)**, 32950-32956, 1998.

- Allen und Walsh, 1994** Allen, B.G., Walsh, M.P. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci*, **19 (9)**, 362-368, 1994.
- Ammendola et al., 2001** Ammendola, A., Geiselhöringer, A., Hofmann, F., Schlossmann, J. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem*, **276 (26)**, 24153-24159, 2001.
- Anantharaman et al., 2001** Anantharaman, V., Koonin, E.V., Aravind, L. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J Mol Bioll*, **307 (5)**, 1271-1292, 2001.
- Aravind und Ponting, 1997** Aravind, L. und Ponting, C.P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci*, **22 (12)**, 458-459, 1997.
- Arnold et al., 1977** Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katuski, S., Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74 (8)**, 3203-3207, 1977.
- Auerbach, 1864** Auerbach, L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Pathol Anat Physiol*, **30**, 457, 1864.
- Ballard et al., 1998** Ballard, S.A., Gingell, C.J., Tang, K., Turner, L.A., Price, M.E., Naylor, A.M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol*, **159 (6)**, 2164-2171, 1998.
- Bayguinov et al., 2001** Bayguinov, O., Hagen, B. und Sanders, K., M. Muscarinic stimulation increases basal Ca(2+) and inhibits spontaneous Ca(2+) transients in murine colonic myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280 (3)**, C689-700, 2001.
- Berridge et al., 2000** Berridge, M.J., Lipp, P., Bootmann, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1 (1)**, 11-21, 2000.
- Berridge, 1993** Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361 86410**, 315-325, 1993.

- Biel et al., 1998** Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F., Zong, X. Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **358 (1)**, 140-144, 1998.
- Binder et al., 1991** Binder, H.J., Sandle, G.I., Rajendran, V.M. Colonic fluid and electrolyte transport in health and disease In: *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology, and Disease. Hrsg.: Philips SF, Pemperton JH and Shorter RG, Raven Press, New York*, 141-168, 1991.
- Binder und Sandle, 1994** Binder, H.J. und Sandle, G.I. Electrolyte transport in the mammalian colon In: *Physiology of the gastrointestinal tract. Hrsg.: Johnson LR, Raven Press, New York, Vol. 2, Third Edition*, 2133-2171, 1994.
- Böhme et al., 1978** Böhme, E., Graf, H., Schulz, G. Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 9131-9143, 1978.
- Bolotina und Csutora, 2005** Bolotina, V.M. und Csutora, P. CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends Biochem Sci*, **30 (7)**, 378-387, 2005.
- Bonnevier et al., 2004** Bonnevier, J., Fassler, R., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., Arner, A. Modulation of Ca²⁺ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice. *J Biol Chem*, **279 (4)**, 5146-5151, 2004.
- Bonnevier und Arner, 2004** Bonnevier, J. und Arner, A. Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2+) sensitization in smooth muscle. *J Biol Chem*, **279 (28)**, 28998-29003, 2004.
- Boolell et al., 1996** Boolell, M., Allen, M.J., Ballard, S.A., Gepi-Attee, S., Muirhead, G.J., Naylor, A.M., Osterloh, I.H., Gingell, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, **8 (2)**, 47-52, 1996.
- Bootmann et al., 2001** Bootmann, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F., Lipp, P. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*, **12 (1)**, 3-10, 2001.

- Bredt und Snyder, 1990** Bredt, D.S. und Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87 (2)**, 682-685, 1990.
- Bult et al., 1990** Bult, H., Boeckxstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Jordaens, F.H., Van Maercke, Y.M., Herman, A.G. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, **345**, 346-347, 1990.
- Burns et al., 1996** Burns, A.J., Lomax, A.E., Torihashi, S., Sanders, K.M., Ward, S.M. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93 (21)**, 12008-12013, 1996.
- Casnellie und Greengard, 1974** Casnellie, J.E. und Greengard, P. Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent phosphorylation of endogenous substrate proteins in membranes of mammalian smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71 (5)**, 1891-1895, 1974.
- Chikuda et al., 2004** Chikuda, H., Kugimiya, F., Hoshi, K., Ikeda, T., Ogasawara, T., Shimoaka, T., Kawano, H., Kamekura, S., Tsuchida, A., Yokoi, N., Nakamura, K., Komeda, K., Chung, U., Kawaguchi, H. Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev*, **18 (19)**, 2418-2429, 2004.
- Corbin und Francis, 1999** Corbin, J.D. und Francis, S.H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem*, **274 (20)**, 13729-13732, 1999.
- de Jonge, 1981** de Jonge, H.R. Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, **14**, 315-333, 1981.
- Deng et al., 2001** Deng, J.T., Van Lierop, J.E., Sutherland, C., Walsh, M.P. Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. A novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem*, **276 (19)**, 16365-16373, 2001.
- Di Rosa et al., 1990** Di Rosa, M., Radomski, M., Carnuccio, R., Moncada, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **172 (3)**, 1246-1252, 1990.
- Diener et al., 1989** Diener, M., Rummel, W., Mesters, P., Lindemann, B. Single chloride channels in colon mucosa and isolated colonic enterocytes of the rat. *J Membr Biol*, **108 (1)**, 21-30, 1989.

- Ekblad und Bauer, 2004** Ekblad, E., Bauer, A.J. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil*, **1**, 123-128, 2004.
- Engelhardt, von und Breves, 2004** Engelhardt, W. von und Breves, G. Physiologie der Haustiere. *Enke Verlag*, 2004.
- Etho et al., 1995** Etho, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya K., Morita, F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem*, **118 (6)**, 1104-1107, 1995.
- Faussone-Pellegrini, 2005** Faussone-Pellegrini, M.S. Interstitial cells of Cajal: once negligible players, now blazing protagonists. *Ital J Anat Embryol*, **110 (1)**, 11-31, 2005.
- Feil et al., 2002** Feil, R., Gappa, G., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C.R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S., Hofmann, F. Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res*, **90 (10)**, 1080-1086, 2002.
- Feil et al., 2003** Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U. und Hofmann, F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, **93 (10)**, 907-916, 2003.
- Förstermann et al., 1991** Förstermann, U., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M. und Murad, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, **42 (10)**, 1849-1857, 1991.
- Francis et al., 1988** Francis, S.H., Woodford, T.A., Wolfe, L., Corbin, J.D. Types I alpha and I beta isozymes of cGMP-dependent protein kinase: alternative mRNA splicing may produce different inhibitory domains. *Second Messengers Phosphoproteins*, **12 (5-6)**, 301-310, 1988.
- Friebe et al., 2005** Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Koesling, D. Gene inactivation of the $\beta 1$ subunit of NO-sensitive guanylyl cyclase in mice. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology 2005 Vol 371*, **R39**, 158, 2005.
- Friebe und Koesling, 2003** Friebe, A. und Koesling, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res*, **93 (2)**, 96-105, 2003.

- Fritsch et al., 2004** Fritsch, R.M., Saur, D., Kurjak, M., Oesterle, D., Schlossmann, J., Geiselhörner, A., Hofmann, F. und Allescher, H.-D. InsP3R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle. *J Biol Chem*, **279 (13)**, 12551-12559, 2004.
- Fukao et al., 1999** Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B., Keef, K.D. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, **274 (16)**, 10927-10935, 1999.
- Furness und Costa, 1987** Furness, J.B. und Costa, M. The enteric nervous system. *Churchill Livingstone, New York*, 1987.
- Gambaryan et al., 1996** Gambaryan, S., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurtz, A., Lohmann, S.M. Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest*, **98 (3)**, 662-670, 1996.
- Geiselhöringer et al., 2004a** Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F. und Schlossmann, J. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*, **575 (1-3)**, 19-22, 2004a.
- Geiselhöringer et al., 2004b** Geiselhöringer, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Wörner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. und Schlossmann, J. IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *Embo J*, **23 (21)**, 4222-4231, 2004b.
- Gerzer et al., 1981** Gerzer, R., Böhme, E., Hofmann, F., Schulz, G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett*, **132 (1)**, 71-74, 1981.
- Gong et al., 1996** Gong, M.C., Iizuka, K., Nixon, G., Browne, J.P., Hall, A., Eccleston, J.F., Sugai, M., Kobayashi, S., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93 (3)**, 1340-1345, 1996.
- Hanani und Freund, 2000** Hanani, M. und Freund, H.R. Interstitial cells of Cajal- their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol Scand*, **170 (3)**, 177-190, 2000.

- Hartshorne et al., 1998** Hartshorne, D.J., Ito, M., Erdödi, F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*, **19 (4)**, 325-341, 1998.
- Haug et al., 1999** Haug, L.S., Jensen, V., Hvalby, O., Walaas, S.I., Ostvold, A.C. 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 (11)**, 7467-7473, 1999.
- Hepler, 2003** Hepler, J.R. RGS protein and G protein interactions: a little help from their friends. *Mol Pharmacol*, **64 (3)**, 547-549, 2003.
- Hepler, 1999** Hepler, J.R. Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol*, **20 (9)**, 376-382, 1999.
- Hirano et al., 1997** Hirano, K., Phan, B.C., Hartshorne, D.J. Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **272 (6)**, 3683-3688, 1997.
- Hofmann et al., 1992** Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W., Ruth, P. Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, **1135 (1)**, 51-60, 1992.
- Hofmann et al., 2000** Hofmann, F., Ammendola, A., Schlossmann, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113**, 1671-1676, 2000.
- Hofmann und Sold, 1972** Hofmann, F. und Sold, G. A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3':5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, **49 (4)**, 1100-1107, 1972.
- Hofmann, 2005** Hofmann, F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **280 (1)**, 1-4, 2005.
- Holzer et al., 2001** Holzer, P., Schicho, R., Holzer-Petsche, U. und Lippe, I.T. The gut as a neurological organ. *Wien Klin Wochenschr*, **113 (17-18)**, 647-660, 2001.
- Holzer et al., 2002** Holzer, P., Schicho, R. und Lippe, I.T. The enteric nervous system-a brain in the gut. *Neuroforum*, **3/02**, 218-226, 2002.
- Horstrup et al., 1994** Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K., Walter, U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*, **225 (1)**, 21-27, 1994.

- Hosoda et al., 1994** Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Baynash, A.G., Cheung, J.C., Giaid, A., Yanagisawa, M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, **79** (7), 1267-1276, 1994.
- Huang et al., 1993** Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H., Fishman, M.C. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, **75** (7), 1273-1286, 1993.
- Huang et al., 1999** Huang, Q.Q., Fisher, S.A., Brozovich, F.V. Forced expression of essential myosin light chain isoforms demonstrates their role in smooth muscle force production. *J Biol Chem*, **274** (49), 35095-35098, 1999.
- Ignarro et al., 1987** Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, **61** (6), 866-879, 1987.
- Ignarro et al., 1999** Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, **34** (6), 879-886, 1999.
- Inoue et al., 2001** Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., Mori, Y. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res*, **88** (3), 325-332, 2001.
- Itho et al., 1993** Itho, H., Shimomura, A., Okubo, S., Ichikawa, K., Ito, M., Konishi, T., Nakano, T. Inhibition of myosin light chain phosphatase during Ca(2+)-independent vasocontraction. *Am J Physiol*, **265**, C1319-1324, 1993.
- Janssen, 2002** Janssen, L.J. Ionic mechanisms and Ca(2+) regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **282** (6):L1161-78., 1161-1178, 2002.
- Kamisaki et al., 1986** Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmieri, J.A., Kuno, T., Chang, B.Y., Waldman, S. A., Murad, F. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem*, **261** (16), 7236-7241, 1986.

- Kanacher et al., 2002** Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J.U., Schultz, J.E. A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J*, **21 (14)**, 3672-3680, 2002.
- Karaosmanoglu et al., 1996** Karaosmanoglu, T., Aygun, B., Wade, P.R., Gershon, M.D. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. *Anat Rec*, **244 (4)**, 470-480, 1996.
- Karaus und Sarana, 1987** Karaus, M. und Sarana, S.K. Giant migrating contractions during defecation in the dog colon. *Gastroenterology*, **92 (4)**, 925-933, 1987.
- Keilbach et al., 1992** Keilbach, A., Ruth, P., Hofmann, F. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208 (2)**, 467-473, 1992.
- Kiemer und Vollmar, 1998** Kiemer, A.K. und Vollmar, A.M. Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem*, **273 (22)**, 13444-13451, 1998.
- Kim et al., 2000** Kim, N.N., Huang, Y., Moreland, R.B., Kwak, S.S., Goldstein, I., Traish, A. Cross-regulation of intracellular cGMP and cAMP in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Mol Cell Biol Res Commun*, **4 (1)**, 10-14, 2000.
- Kimura et al., 1975** Kimura, H., Mittal, C.K., Murad, F. Activation of guanylate cyclase from rat liver and other tissues by sodium azide. *J Biol Chem*, **250 (20)**, 8016-8022, 1975.
- Kimura et al., 1996** Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, F., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**, 245-248, 1996.
- Kitazawa et al., 1991** Kitazawa, T., Gaylinn, B.D., Denney, G.H., Somlyo A.P. G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, **266 (3)**, 1708-1715, 1991.

- Kitazawa et al., 2000** Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., Brautigan, D.L. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*, **275 (14)**, 9897-9900, 2000.
- Köckerling und Fromm, 1993** Köckerling, A., Fromm, M. Origin of cAMP-dependent Cl⁻ secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am J Physiol*, **264**, C1294-C1301, 1993.
- Koller et al., 2003** Koller, A., Schlossmann, J., Ashmann, K., Uttenweiler-Joseph, S., Ruth, P., Hofmann, F. Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **300 (1)**, 155-160, 2003.
- Komalavilas et al., 1999** Komalavilas, P., Shah, P.K., Jo, H., Lincoln, T.M. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **274 (48)**, 34301-34309, 1999.
- Komalavilas und Lincoln, 1996** Komalavilas, P. und Lincoln, T.M. 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 (36)**, 21933-21938, 1996.
- König und Liebich, 2004** König, H.E. und Liebich, H.G. Anatomie der Haussäugetiere. *Schattauer Verlag*, 347, 2004.
- Koyama et al., 2000** Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D.J., Nakano, T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*, **475 (3)**, 197-200, 2000.
- Kraft et al., 1998** Kraft, W., Hirschberger, J. Kleintierkrankheiten Band I Innere Medizin. *UTB für Wissenschaft*, **1**, 470, 1998.
- Kuhn, 2003** Kuhn, M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*, **93 (8)**, 700-709, 2003.
- Kuo und Greengard, 1970** Kuo, J.F. und P. Greengard. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem*, **245 (10)**, 2493-2498, 1970.

- Langley, 1921** Langley, J.N. The Autonomic Nervous System. *Part I. W.Heffer and Sons, Cambridge*, 1921.
- Liebich, 2004** Hans-Georg Liebich, Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. *Schattauer Verlag*, 199-226, 2004.
- Lincoln et al., 1988** Lincoln, T.M., Thompson, M., Cornwell, T.L. Purification and characterization of two forms of cyclic GMP-dependent protein kinase from bovine aorta. *J Biol Chem*, **263 (33)**, 17632-17637, 1988.
- Lohmann et al., 1997** Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U., de Jonge, H.R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*, **22 (8)**, 307-312., 1997.
- Loscalzo und Welch, 1995** Loscalzo, J. und Welch, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, **38 (2)**, 87-104, 1995.
- Malmqvist und Arner, 1991** Malmqvist, U. und Arner, A. Correlation between isoform composition of the 17 kDa myosin light chain and maximal shortening velocity in smooth muscle. *Pflugers Arch*, **418 (6)**, 523-530, 1991.
- Massberg et al., 1999** Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F., Hofmann, F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*, **189 (8)**, 1255-1264, 1999.
- Matsumoto et al., 2003** Matsumoto, T., Kobayashi, T., Kamata, K. Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res*, **39 (4)**, 67-86, 2003.
- McCarron et al., 2002** McCarron, J.G., Craig, J.W., Bradely, K.N., Muir, T.C. Agonist-induced phasic and tonic responses in smooth muscle are mediated by InsP(3). *J Cell Sci*, **115**, 2207-2218, 2002.
- McConalogue und Furness, 1994** McConalogue, K. und Furness J.B. Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **8 (1)**, 51-76, 1994.
- Meissner, 1857** Meissner, G. Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med*, **8**, 364-366, 1857.

- Meredith et al., 2004** Meredith, A.L., Thorneloe, K.S., Werner, M.E., Nelson, M.T. und Aldrich, R.W. Overactive Bladder and Incontinence in the Absence of the BK Large Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channel. *J Biol Chem*, **279**, 36746-36752, 2004.
- Miyazawa et al., 2002** Miyazawa, T., Ogawa, Y., Chucho, H., Yasoda, A., Tamura, N., Komatsu, Y., Pfeifer, A., Hofmann, F. und Nakao, K. Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology*, **143 (9)**, 3604-3610, 2002.
- Montell et al., 2002** Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, **108 (5)**, 595-598, 2002.
- Moosmang et al., 2003** Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F., Klugbauer, N. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J*, **22 (22)**, 6027-6034, 2003.
- Münzel et al., 2003** Münzel, T., Feil, R., Mulsch, A., Lohmann, S.M., Hofmann, F., Walter, U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, **108 (25)**, 2172-2183, 2003.
- Nathan und Xie, 1994** Nathan, C. und Xie, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, **269 (19)**, 13725-13728, 1994.
- Nilius und Droogmans, 2001** Nilius, B. und Droogmans, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*, **81 (14)**, 1415-1459, 2001.
- Palmer et al., 1987** Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327 (6122)**, 524-526, 1987.
- Pavalko et al., 1995** Pavalko, F.M., Adam, L.P., Wu, M.F., Walker, T.L., Gunst, S.J. Phosphorylation of dense-plaque proteins talin and paxillin during tracheal smooth muscle contraction. *Am J Physiol*, **268**, C563-571, 1995.
- Pfeifer et al., 1996** Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F., Fassler, R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, **274 (5295)**, 2082-2086, 1996.

- Pfeifer et al., 1998** 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., Hofmann, F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J*, **17 (11)**, 3045-3051, 1998.
- Pfeifer et al., 1999** Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. und Hofmann, F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 105-149, 1999.
- Pfitzer et al., 1986** Pfitzer, G., Merkel, L., Ruegg, J.C., Hofmann, F. Cyclic GMP-dependent protein kinase relaxes skinned fibers from guinea pig taenia coli but not from chicken gizzard. *Pflugers Arch*, **407 (1)**, 87-91, 1986.
- Pfitzer, 2001** Pfitzer, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*, **91 (1)**, 497-503, 2001.
- Plant und Schaefer, 2003** Plant, T.D. und Schaefer, M. TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*, **33 (5-6)**, 441-450, 2003.
- Povstyan et al., 2003** Povstyan, O.V., Gordienko, D.V., Harhun, M.I., Bolton, T.B. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium*, **33 (4)**, 223-239, 2003.
- Radomski et al., 1990** Radomski, M.W., Palmer, R.M. Moncada, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87 824**, 10043-10047, 1990.
- Raeymaekers et al., 1988** Raeymaekers, L., Hoffmann, F., Casteels, R. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J*, **252 (1)**, 269-273, 1988.
- Ruiz-Velasco et al., 1998** Ruiz-Velasco, V., Zhong, J., Hume, J.R., Keef, K.D. Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res*, **82 (5)**, 557-565, 1998.
- Russwurm et al., 2001** Russwurm, M., Wittau, N., Koesling, D. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*, **276 (48)**, 44647-44652, 2001.

- Ruth et al., 1991** Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C., Hofmann, F. The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem*, **202 (3)**, 1339-1344, 1991.
- Ruth et al., 1993** Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H., Hofmann, F. 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 (7)**, 2623-2627, 1993.
- Ruth et al., 1997** Ruth, P., Pfeifer, P., Kamm, S., Klatt, P., Dostmann, W.R., Hofmann, F. Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase Ialpha. *J Biol Chem*, **272 (16)**, 10522-10528, 1997.
- Ruth, 1999** Ruth, P. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther*, **82**, 355-372, 1999.
- Sandberg et al., 1989** Sandberg, M., Natarajan, V., Ronander, I., Kalderon, D., Walter, U., Lohmann, S.M., Jahnsen, T. Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat. *FEBS Lett*, **255 (2)**, 321-329, 1989.
- Sanders und Ward, 1992** Sanders, K.M. und Ward, S.M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol*, **262**, G379-92, 1992.
- Sanders, 2001** Sanders, K.M. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol*, **91 (3)**, 1438-1449, 2001.
- Sarna et al., 1984** Sarna, S.K., Condon, R., Cowles, V. Colonic migrating and nonmigrating motor complexes in dogs. *Am J Physiol*, **246**, G355-360, 1984.
- Sarna, 1985** Sarna, S, K. Cyclic motor activity; migrating motor complex. *Gastroenterology*, **89 (4)**, 894-913, 1985.
- Sausbier et al., 2000** Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P., Hofmann, F. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, **87 (9)**, 825-830, 2000.

- Sauzeau et al., 2000** Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., Loirand, G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **275 (28)**, 21722-21729, 2000.
- Schlossmann et al., 2000** Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., Ruth, P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, **404 (6774)**, 197-201, 2000.
- Schlossmann et al., 2003** Schlossmann, J., Feil, R., Hofmann, F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, **35 (1)**, 21-27, 2003.
- Schlossmann und Hofmann, 2005** Schlossmann, J. und Hofmann, F. cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov Today*, **10 (9)**, 627-634, 2005.
- Schmidt et al., 2002** Schmidt, H., Werner, M., Heppenstall, P.A., Hennig, M., More, M.I., Kuhbandner, S., Lewin, G.R., Hofmann, F., Feil, R., Rathjen, F.G. cGMP-mediated signaling via cGKIalpha is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *J Cell Biol*, **159 (3)**, 489-498, 2002.
- Seki und Komuro, 2001** Seki, K., Komuro, T. Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine. *Cell Tissue Res*, **306 (3)**, 417-422, 2001.
- Shuttleworth et al., 1993** Shuttleworth, C.W., Xue, C., Ward, S.M., de Vente, J. und Sanders, K.M. Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience*, **56 (2)**, 513-522, 1993.
- Singh et al., 1995** Singh, S.K., Binder, H.J., Boron, W.F., Geibel J.P. Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest*, **96 (5)**, 2373-2379, 1995.
- Sjuve et al., 1998** Sjuve, R., Arner, A., Li, Z., Mies, B., Paulin, D., Schmittner, M., Small, J. V. Mechanical alterations in smooth muscle from mice lacking desmin. *J Muscle Res Cell Motil*, **19 (4)**, 415-429, 1998.

- Somlyo et al., 1999** Somlyo, A.P., Wu, X., Walker, L.A., Somlyo, A.V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **134**, 201-234, 1999.
- Somlyo und Somlyo, 1991** Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. Smooth muscle structure and function. *The Heart and Cardiovascular System. Second Edition*. H. A. Fozzard, ed. Raven Press, New York, NY. Chapter 48, 1295-1324, 1991.
- Somlyo und Somlyo, 1994** Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **372**, 231-236, 1994.
- Somlyo und Somlyo, 2000** Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, **522**, 177-185, 2000.
- Somlyo und Somlyo, 2003** Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, **83 (4)**, 1325-1358, 2003.
- Sonnenburg und Beavo, 1994** Sonnenburg, W.K. und Beavo, J.A. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, **26**, 87-114, 1994.
- Stull et al., 1993** Stull, J.T., Tansey, M.G., Tang, D.C., Word, R.A., Kamm, K.E. Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca²⁺ desensitization. *Mol Cell Biochem*, **127-128**, 229-237, 1993.
- Surks et al., 1999** Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M., Mendelsohn, M.E. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science*, **286 (5444)**, 1583-1587, 1999.
- Sward et al., 2000** Sward, K., Dreja, K., Susnjar, M., Hellstrand, P., Hartshorne, D.J., Walsh, M.P. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol*, **522**, 33-49, 2000.
- Takahashi, 2003** Takahashi, T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol*, **38 (5)**, 421-430, 2003.

- Takemura et al., 1989** Takemura, H., Huges, A.R., Thastrup, O. und Putney, J. W. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem*, **264 (21)**, 12266-12271, 1989.
- Tang et al., 2003** Tang, K.M., Wang, G.R., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y., Mendelshon, M.E. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, **9 (12)**, 1506-1512, 2003.
- Thomsen et al., 1998** Thomsen, L., Robinson, T.L., Lee, J.C., Farraway, L.A., Hughes, M.J., Andrews, D.W., Huizinga, J.D. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med*, **4 (7)**, 848-851, 1998.
- Tiruppathi et al., 2003** Tiruppathi, C., Minshall, R.D., Piria, B.C., Vogel, S.M., Malik, A.B. Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, **39 (4-5)**, 173-185, 2003.
- Vaandrager et al., 1997** Vaandrager, A.B., Tilly, B.C., Smolenski, A., Schneider-Rasp, S., Bot, A.G., Edixhoven, M., Scholte, B.J., Jarchau, T., Walter, U., Lohmann, S.M., Poller, W.C., de Jonge H.R. cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ibeta. *J Biol Chem*, **272 (7)**, 4195-4200, 1997.
- Vaandrager et al., 1998** Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Tilly, B.C., Houtsmuller, A.B., Ehlert, E.M., Bot, A.G., Edixhoven, M., Boomaars, W.E., Lohmann, S.M., de Jonge, H.R. Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95 (4)**, 1466-1471, 1998.
- Vanden Abeele et al., 2004** Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J.B., Shuba, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N. Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem*, **279 (29)**, 30326-30337, 2004.

- Wagner et al., 1998** Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F., Kurtz, A. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest*, **102 (8)**, 1576-1582., 1998.
- Walker et al., 2001** Walker, L.A., MacDonald, J.A., Liu, X., Nakamoto, R.K., Haystead, T.A., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. Site-specific phosphorylation and point mutations of telokin modulate its Ca²⁺-desensitizing effect in smooth muscle. *J Biol Chem*, **276 (27)**, 24519-24524, 2001.
- Walsh, 1994** Walsh, M.P. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem*, **135 (1)**, 21-41, 1994.
- Ward et al., 1998** Ward, S.M., Morris, G., Reese, L., Wang, X.Y., Sanders, K.M. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology*, **115 (2)**, 314-329, 1998.
- Ward und Sanders, 2001** Ward, S.M. und Sanders, K.M. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec*, **262**, 125-135, 2001.
- Wegener et al., 2004** Wegener, J.W., Schulla, V., Lee, T.-S., Koller, A., Feil, S., Feil, R., Kleppisch, T., Klugbauer, N., Moosmang, S., Welling, A., Hofmann, F. An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB J*, **18 (10)**, 1159-1161, 2004.
- Weisbrodt, 1987** Weisbrodt, N.W. Motility of the small intestine. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 411-444, 1987.
- Welsh et al., 1982** Welsh, M.J., Smith, P.L., Fromm, M., Frizzell, R.A. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*, **218**, 1219-1221, 1982.
- Werner, 2002** Werner, M. Konditionale Mutagenese des IRAG Gens in der Maus. *Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München*, 2002.
- Wernet et al., 1989** Wernet, W., Fockerzi, V., Hofmann, F. The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, **251 (1-2)**, 191-196, 1989.

- Wooldridge et al., 2004** Wooldridge, A.A., MacDonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hatshorne, D.J. und Haystead, T.A. Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, **279 (33)**, 34496-34504, 2004.
- Wu et al., 1996** Wu, X., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, **220 (3)**, 658-663, 1996.
- Xia et al., 2001** Xia, C., Bao, Z., Yue, C., Sanborn, B.M., Liu, M. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **276 (23)**, 19770-19777, 2001.
- Yu et al., 1997** Yu, S.M., Hung, L.M., Lin, C.C. cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation*, **95 (5)**, 1269-1277, 1997.
- Zabel et al., 2002** Zabel, U., Kleinschnitz, C., Oh, P., Nedvetsky, P., Smolenski, A., Muller, H., Kronich, P., Kugler, P., Walter, U., Schnitzer, J.E. und Schmidt, H.H. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol*, **4 (4)**, 307-311, 2002.
- Zhang und Buxton, 1991** Zhang, L.B. und Buxton, I.L. Muscarinic receptors in canine colonic circular smooth muscle. II. Signal transduction pathways. *Mol Pharmacol*, **40 (6)**, 952-959, 1991.
- Zhou et al., 2001** Zhou, X.B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G.X., Ruth, P., Korth, M. A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem*, **276 (46)**, 43239-43245, 2001.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann gilt mein besonderer Dank für die Aufnahme an seinem Institut, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die zahlreichen theoretischen wie praktischen Hilfestellungen bei der Lösung kleinerer und größerer Probleme.

Des Weiteren danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger für viele Anregungen und die unkomplizierte Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. Jörg Wegener bedanken für die gute Betreuung dieser Arbeit, für die Weitergabe seines Wissens und seiner Erfahrungen, für seine Ideen und Anregungen, die das Entstehen der vorliegenden Arbeit erst ermöglichten.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn PD. Dr. Jens Schlossmann für die gute Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung bei vielen kleineren und größeren Problemen und sein persönliches Engagement.

Vor allem möchte ich mich bei allen meinen Kollegen vom Keller bis zum dritten Stock bedanken für das wirklich tolle Arbeitsklima an diesem Institut und den regen Austausch von Erfahrungen auch mit den Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des ersten Stocks, ganz besonders an Angela, Meli und Katja für ihre Hilfe in allen Lebenslagen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich meine ganze Ausbildung hindurch sehr unterstützt hat.

Und nicht zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei meinem Freund Uwe Bacher bedanken, der mit mir all die Höhen und Tiefen meisterte, die die letzten Jahre bereithielten, und das waren nicht nur kleinere und größere Computerprobleme.

Lebenslauf

Name: Petra Smital

Geburtsdatum: 03.09.1974

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung

1981 – 1986 Grundschole in Grünwald

1986 – 1995 Theodolinden Gymnasium München

12.05.1995 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1995 – 1996 Lehre zur Tierarzhelferin in der Pferdeklinik Wolfesing

1996 – 1997 freiwilliges Soziales Jahr beim Bayrischen Roten Kreuz

1997 – 2003 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität (LMU) München

30.09.2003 Abschluss des Studiums der Tiermedizin

seit 20.10.03 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München (TU)