

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE

Analyse der Funktion der cGMP-abhängigen Proteinkinasen in der
Nebenniere und im Duodenum

Beate Spießberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Becker
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. H. H. D. Meyer
2. Univ.-Prof. Dr. F. B. Hofmann

Die Dissertation wurde am 27.04.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.07.2011 angenommen.

I.	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>3</u>
II.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>6</u>
III.	<u>Abbildungs- u. Tabellenverzeichnis</u>	<u>10</u>
IV.	<u>Abstract und Zusammenfassung</u>	<u>12</u>
1.	<u>Einleitung</u>	<u>15</u>
2.	<u>Material und Methoden</u>	<u>26</u>
3.	<u>Ergebnisse</u>	<u>45</u>
4.	<u>Diskussion</u>	<u>69</u>
5.	<u>Conclusion</u>	<u>77</u>
	<u>Anhang</u>	<u>78</u>
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>82</u>
V.	<u>Publikationen</u>	<u>87</u>
VI.	<u>Danksagung</u>	<u>88</u>
VII.	<u>Curriculum Vitae</u>	<u>89</u>

I.	Inhaltsverzeichnis	
1.	Einleitung	15
1.1	Einführung in den NO-cGMP-Signalweg	15
1.1.1	NO-Synthese und NO-Synthase	15
1.1.2	cGMP-Signalweg	16
1.2	Biochemische Eigenschaften der cGMP-abhängigen Proteinkinasen	17
1.2.1	Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen	17
1.2.2	Allgemeines Expressionsmuster und Funktion der cGKI	19
1.2.3	Funktion der cGKI zur Relaxation der glatten Muskelzelle	19
1.3	Die Rolle der cGKI α und cGKI β für die duodenale Bikarbonatsekretion	21
1.4	Allgemeines Expressionsmuster der cGKII sowie deren Funktionen	23
1.5	Funktion der cGKII in der Nebenniere	23
1.6	Ziele dieser Arbeit	25
2.	Material und Methoden	26
2.1	Verwendete Mausstämme	26
2.1.1	Konventionelle cGKII Knockout Mäuse	26
2.1.2	Konventionelle cGKI Knockout Mäuse	26
2.1.3	cGKI α und cGKI β Rescue Mäuse	26
2.2	Analyse experimentell verwendeter Mäuse	27
2.2.1	Genotypisierung mittels Gewebebiopsie (Mausschwanz)	27
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.3	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	29
2.3	Isolation von RNA und Proteingewinnung aus Mausgeweben	31
2.3.1	Isolation von Gesamt-RNS	31
2.3.2	Proteingewinnung aus Mausgewebe	32
2.3.3	Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure (BCA)- Test	33
2.4	Western Blot	33
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.4.2	Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren	34
2.4.3	Immundetektion	35

2.5	Histologische Untersuchungen	35
2.5.1	Anfertigen von Paraffinschnitten	35
2.5.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	37
2.5.3	Immunhistologische Färbung mittels Peroxidase	38
2.5.4	Immunhistologische Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper	40
2.6	Physiologische Experimente	41
2.6.1	<i>In vivo</i> Tierexperimente	41
2.6.2	Radioimmunologische Bestimmung von Aldosteron und Renin	42
2.6.3	Intragastrische pH Messungen	42
2.6.4	Morphologische Messungen	42
2.7	In vivo Bikarbonatmessungen	43
2.8	Nervus vagus Stimulation	43
2.9	Statistik	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Funktion der cGKII in der Nebenniere	45
3.1.1	Gewebeexpression der cGMP-abhängigen Proteinkinasen und der PDE2 in der Nebenniere	45
3.1.2	Immunhistochemische Untersuchungen an der Nebenniere der Maus	47
3.1.3	Physiologische Analysen des Aldosteron- und Reninspiegels in der Maus	48
3.2	Rolle der cGKI α und cGKI β für die duodenale Bikarbonatsekretion	53
3.2.1	Morphometrische Analysen des Duodenum von Kontrolltieren, cGKI-defizienten Tieren und cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten	53
3.2.2	Kaplan-Meier Überlebenskurve von Kontrollen und cGKI-defizienten Tieren nach Verabreichung von Protonenpumpeninhibitoren	54
3.2.3	Morphometrische Analysen des Duodenum von Kontrolltieren, cGKI-defizienten Tieren und cGKI β -rescue Mausmutanten nach Verabreichung von Protonenpumpeninhibitoren	56
3.2.4	Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinase im Duodenum	57
3.2.5	Immunhistochemische Expressionsanalysen der cGKI im Duodenum der Maus	59
3.2.6	In vivo Bikarbonatmessungen an Kontrolltieren, cGKI-defizienten Mäusen und cGKI α - bzw. cGKI β -rescue Mausmutanten	59
3.2.7	Immunofluoreszenzanalysen der cGKI und nNOS-Koexpression im Duodenum der Maus	61

3.2.8	RT-PCR-Analysen von beteiligten Bikarbonatsekretionstransportern und <i>in vivo</i> Bikarbonatsekretionsmessungen	62
3.2.9	Analyse der cGKI-Expression in der Medulla von Kontrolltieren, cGKI-defizienten Mäusen und cGKI α - bzw. cGKI β -rescue Mausmutanten	66
4.	Diskussion	69
4.1	Analyse der Funktion des cGKII-Proteins in der Mausnebenniere	69
4.2.	Analyse der Funktion des cGKI-Proteins bei der Protonen-stimulierten Bikarbonatsekretion	71
4.2.1	Analyse der Duodenalulzeration nach der Behandlung mit Protonenpumpeninhibitoren	71
4.2.2	<i>In vivo</i> Bikarbonatmessungen in α - und β -rescue Mausmutanten, cGKI-defizienten Mäusen, sowie in Kontrolltieren	72
4.2.3	Analyse der Genexpression an der Bikarbonatsekretion beteiligter Proteine, sowie Untersuchungen der Expression der cGKI in nicht- glatten Muskelzellen	72
4.2.4	Die Beteiligung der cGKI an der zentralen Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion	74
5.	Conclusion	77
5.1	cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion	77
5.2	Neuronal cGMP kinase I is essential for H ⁺ -stimulated duodenal bicarbonate secretion in mice	77

II. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase Komplex
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AE 2	Anionen-Austauscher 2
AG	Antigen
AK	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
B0	Nullstandard
CAII	Karboanhydrase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGKI	cGMP abhängige Proteinkinase Typ I
cGKII	cGMP abhängige Proteinkinase Typ II
cGKIα	cGMP abhängige Proteinkinase Typ I α Isoform
cGKIβ	cGMP abhängige Proteinkinase Typ I β Isoform
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNG	zyklische Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle
COXI	Cyclooxygenase I
COXII	Cyclooxygenase II
ctr	Kontrolle
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	Diaminobenzidin
DBS	Duodenale Bikarbonatsekretion

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRA	Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (SLC26A3)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ENS	enterisches Nervensystem
EP3	Prostaglandin E Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
g	Gravitationskonstante oder Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Glutamat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin und Eosin Färbung
H₂O_{bidest}	MilliQ-(Millipore) Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HPRT	Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase
HRP	horseradish peroxidase
IA	Interaktionsstelle
ICC	interstitielle Cajalzellen
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP₃RI	Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor Typ I
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase-Substratprotein
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Konz.	Konzentration
KO	Knockout
l	Liter
M, mM	Mol, Millimol

MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG od. MW	Molekulargewicht
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MLCP	Myosin-Leichketten Phosphatase
M&M	Material und Methoden
MYPT1	Myosin targeting subunit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄·2H₂O	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaN₃	Natriumazid
NGS	Normales Ziegen Serum
NHE 1	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher 1
NHE 3	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher 3
NH₄OH	Ammoniumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NP	natriuretisches Peptid
NTS	Nucleus tractus solitarius
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PATI	Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (SLC26A6)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDE	Phosphodiesterase
pGC	partikuläre Guanylylzyklase
PGE₂-S	Prostaglandin E ₂ -Synthase
PI	Proteaseinhibitor

PDE2	Phosphodiesterase 2
PLCβ_3	Phospholipase C β_3
POD	Peroxidase
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
StaR	stereogenic acute regulatory Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sGC	lösliche Guanylylzyklase
Tab.	Tabelle
TC	Totalaktivität
TBST	Tris-gepufferte Saline Tween
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TrypVI	Transient receptor potential channel VI
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methyamin
U	Unit, Einheit
ü.N.	über Nacht
μm	Mikrometer
V	Volt
Z.f.	Zona fasciculata
Z.g.	Zona glomerulosa
Z.r.	Zona reticularis

III Abbildungs- u. Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1:	Zelluläre Signalwege von cGMP	17
Abb. 2:	Schematische Strukturen der drei Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinasen	18
Abb. 3:	Schema für die cGKI-abhängige Relaxation der glatten Muskulatur	20
Abb. 4:	Analyse der Proteinexpression von der cGKI und der cGKII in der Mausnebenniere	46
Abb. 5:	Analyse der Proteinexpression von der cGKII und der PDE2 in der Maus- u. Rindernebenniere	47
Abb.6:	Analyse der Proteinexpression von der cGKII in der Nebenniere der Maus	48
Abb. 7:	Analyse der Plasmareninkonzentration aus der Nebenniere der cGKII Knockout Mäuse	49
Abb. 8:	Analyse der Plasmaaldosteronkonzentration der cGKII^{-/-}- Mäuse	51
Abb. 9:	Analyse der Plasmareninkonzentration der cGKII^{-/-}- Mäuse	52
Abb. 10:	Statistische Auswertung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) wacher, sich frei bewegender Kontroll- und cGKII^{-/-}- Mäuse	52
Abb. 11:	Morphometrische Analyse der Duodeni	54
Abb. 12:	Kaplan-Meier Überlebenskurve	55
Abb. 13:	Morphometrische Analyse der Duodeni	57
Abb. 14:	Immunoblotanalyse der cGKI Isoformen, cGKII sowie cKit im Duodenum	58
Abb. 15:	Proteinexpression der cGKI im Duodenum der Maus	59
Abb. 16:	Zeitverlauf der Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion	60
Abb. 17:	Netto Peak der Protonen-induzierten Bikarbonatsekretionsmessung	61
Abb. 18:	Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von cGKI und nNOS im Duodenum	62
Abb. 19:	Semi-quantitative RT-PCR-Analysen	63
Abb. 20:	Basale und Protonen-induzierte Bikarbonatsekretionsmessung nach einer bilateralen subdiaphragmären Vagotomie	64

Abb. 21: Bikarbonatsekretion in Kontrolltieren und in cGKI-defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen und während elektrischer Feldstimulation (EFS) 65

Abb. 22: Analyse der Proteinexpression von der cGKI in der Medulla oblongata der Maus 66

Abb. 23: Detektion der Proteinexpression von cGKI und NeuN in der Medulla im NTS..... 67

Abb. 24: Detektion der Proteinexpression von cGKI und vGLUT2 in der Medulla..... 68

Abb. 25: Schema für die ACTH-abhängige Aldosteronsekretion 69

Abb. 26: Schematische Darstellung der neuronalen cGKI-Regulation für die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion 74

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: verwendete Oligonukleotide 78

Tab. 2: verwendete Genotypisierungsoligonukleotide 79

Tab. 3: verwendete Primärantikörper 80

Tab. 4: verwendete Sekundärantikörper 81

VI Abstract + Zusammenfassung

Abstract

ACTH-stimulated aldosterone secretion can be inhibited by atrio-natriuretic peptide and cGMP. The mechanism behind this modulation involves cGMP-dependent activation of phosphodiesterase 2 (PDE2) and cAMP hydrolysis. In contradiction to this effect aldosterone secretion in the zone glomerulosa of rats was stimulated by activation of cGMP-dependent protein kinase II (cGKII) via phosphorylation of the stereogenic acute regulatory protein (StaR).

In the present study, the analysis of mice with homozygous inactivation of the cGKII gene showed that basal plasma renin and aldosterone levels were similar compared to control mice. *In vivo* injection of atrio-natriuretic peptide decreased ACTH-stimulated aldosterone secretion in control mice, but had no effect in cGKII-deficient mice.

These results support the hypothesis that cGKII modulates negatively aldosterone secretion in the murine adrenal cortex.

Proton-induced secretion of bicarbonate is essential for the protection of the duodenal mucosa from gastric acid injury. The possible role of cGMP-cGKI pathway for the duodenal bicarbonate secretion was addressed by studying conventional cGKI knockouts (cGKI-KO's) and cGKI rescue mice that expressed either the cGKI α or I β isoform in SM22 α positive smooth muscle cells.

These mutant mice showed a duodenal phenotype. They develop a bleeding duodenal ulcer. In contrast gastric acid production was similar in control and mutant mice. The analysis of the gene-targeted cGKI mice revealed that the basal and the proton-induced secretion rate of bicarbonate was strongly reduced in cGKI mutant mice compared to control animals.

Immunochemical analysis of the duodenum detected cGKI only in the smooth muscle cells. The proton-induced bicarbonate secretion was not attenuated by inactivation of the cGKI gene in the interstitial cells of Cajal or mucosal enterocytes. However, truncation of the subdiaphragmatic N. vagus significantly diminished proton-induced bicarbonate secretion in control mice, whereas stimulation of the subdiaphragmatic N. vagus re-established duodenal bicarbonate secretion in control- and cGKI^{-/-}-mice suggesting a crucial role of cGKI in the vagal circuit. In the Nucleus tractus solitarius (NTS) the afferent N. vagus connects with the efferent N. vagus.

In agreement with this hypothesis, it was shown that cGKI is expressed in the NTS in control mice but not in cGKI^{-/-}, cGKI α and cGKI β -rescue mice.

In conclusion these findings show that protection of the duodenum from intrinsic acid injury requires neuronal cGKI.

Zusammenfassung

Die Zona glomerulosa befindet sich in der Nebennierenschale, in der das Mineralokortikoid Aldosteron gebildet wird, welches unter anderem in der Niere den Kalium-, Natrium- und Wasserhaushalt steuert, indem es eine verstärkte Rückresorption von Wasser und Kochsalz bewirkt und somit zu einer Erhöhung des Blutvolumens, sowie zu einer Blutdrucksteigerung führt. Die Regulation der Aldosteronproduktion wird zum Einen durch Angiotensin II über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und zum Anderen durch das adrenocorticotropes Hormon (ACTH) gesteuert.

Durch das Steroidhormon ACTH kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) wird aktiviert, das „stereogenic acute regulatory“ (StaR) Protein phosphoryliert und Aldosteron sezerniert.

Im Gegensatz dazu kommt es durch cGMP zu einer Gegenregulation. Durch Bindung von cGMP an die Phosphodiesterase 2 (PDE2) kommt es zu einer vermehrten Hydrolyse des cAMPs. Somit terminiert cGMP die Wirkdauer von cAMP-vermittelten Effekten.

Die Aktivierung der cGKII in isolierten Glomerulosazellen soll eine Erhöhung der Aldosteronsekretion zur Folge haben. Dies beruht ebenfalls auf der Phosphorylierung des „stereogenic acute regulatory“ (StaR) Proteins.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird mit Hilfe von cGKII Knockout Mäusen der Einfluss der cGKII auf die Aldosteronsekretion *in vivo* durch Applikation von ACTH und ANP untersucht.

Überraschenderweise zeigte sich bei den cGKII^{-/-}-Mausmutanten keine Verminderung der ACTH stimulierten Aldosteronsekretion durch ANP.

Dieser Effekt hat allerdings unter normalen Lebensumständen keinerlei Auswirkungen auf den Blutdruck, die Herzfrequenz oder auf die Plasmeninkonzentration der Maus, sodass abschließend festgestellt werden kann, dass das cGKII-Protein nur einen sehr geringen Einfluss auf die Regulation der Aldosteronsekretion hat.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der cGKI α und cGKI β an der duodenalen Bikarbonatsekretion untersucht. Die cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten und die cGKI^{-/-}-Mäuse entwickeln ohne äußere Einwirkungen ein blutendes Duodenalulkus. Anhand einer pH-Analyse des Magenmuskels konnte eine „Übersäuerung“ in den cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten und die cGKI^{-/-}-Mäusen ausgeschlossen werden, allerdings zeigte sich, dass sowohl die basale als auch die Protonen-stimulierte Bikarbonatsekretion bei den cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten und die cGKI^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant vermindert war.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass NO eventuell eine Rolle bei der säurestimulierten Bikarbonatsekretion spielt. Im NO-cGMP-cGKI-Signalweg ist die cGKI von entscheidender Bedeutung.

Immunhistochemische Analysen zeigten, dass die beiden Isoformen der cGKI ausschließlich in den glatten Muskelzellen exprimiert werden. Zugleich konnte eine Expression des cGKI-Proteins in den interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) und im Darmepithel ausgeschlossen werden.

Dies führte zu der Annahme, dass die neuronal exprimierte cGKI die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion beeinflusst.

Nach erfolgter subdiaphragmärer Vagotomie kam es in Kontrolltieren zu einer signifikant verminderten Bikarbonatsekretion, wohingegen eine EFS des subdiaphragmären Vagus in Kontroll- und cGKI^{-/-}-Mäusen zu einem Anstieg der Bikarbonatsekretion führte.

Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass eine Expression des cGKI-Proteins in NTS vorzufinden ist. Darüberhinaus ist bekannt, dass der afferente Nervus Vagus über den Nucleus tractus solitarius (NTS) mit dem efferenten Teil des Nervs in der Medulla oblongata verknüpft ist.

Da es sich bei den α - und β -rescue Mausmutanten um neuronale cGKI Knockout Mäuse handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das cGKI Protein in glutamatergen Neuronen exprimiert wird, die eine entscheidende Rolle für die Vagusregulation im Gastrointestinaltrakt spielt. Somit läßt sich verdeutlichen, dass das neuronale cGKI Protein entscheidend daran beteiligt ist, die duodenale Mukosa vor Protonen-induzierten Ulzerationen zu schützen. Der Schutzmechanismus erfolgt folgendermassen:

die cGKI ermöglicht die Signaltransduktion vom afferenten auf den efferenten Nervus Vagus, indem es eine Glutamatausschüttung fördert. Dies wiederum ist nötig um eine adäquate Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion zu gewährleisten.

1. Einleitung

1.1 Einführung in den NO-cGMP-Signalweg

Ende der 70er Jahre ergaben die Arbeiten des Pharmakologen Robert F. Furchgott, dass die Endothelschicht eine Substanz produziert, die in der darunterliegenden glatten Muskelschicht deren Relaxierung herbeiführt. Diese Substanz wurde als Endothelium-derived relaxing Factor (EDRF) bezeichnet (Furchgott & Zawadzki, 1980). Im Laufe der 80er Jahre gelang es, diese Substanz als Stickstoffmonoxid (NO) zu entschlüsseln (Ignarro et al., 1999). Der gasförmige Botenstoff NO spielt als Signalüberträger für eine Vielzahl physiologischer Prozesse eine große Rolle. NO ist – neben seinen vasodilatierenden Eigenschaften – an der Darmperistaltik, der Aktivierung von Thrombozyten, der Zelldifferenzierung und Proliferation, an der unspezifischen Immunantwort, sowie als Neurotransmitter an der synaptischen Plastizität beteiligt.

1.1.1 NO-Synthese und NO-Synthasen

NO wird in vielen Geweben und Zelltypen von NO-Synthasen (NOS) unter Verbrauch von NADPH gebildet, indem der terminale Stickstoff der Guanidingruppe der Aminosäure L-Arginin zu NO oxidiert wird (Ignarro et al., 1999). Als weitere Endprodukte entstehen Citrullin und Wasser.

Es sind bislang drei NOS-Isoformen bekannt. Die induzierbare NOS-Isoform (iNOS) ist auf transkriptioneller Ebene induzierbar, während die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS) konstitutiv exprimiert werden. Hierbei ist die iNOS kalzium-unabhängig, wohingegen die nNOS und die eNOS Kalzium für ihre Funktion benötigen (Forstermann et al., 1991).

Alle drei Isoformen sind in spezifischen Zelltypen lokalisiert. iNOS ist vorwiegend in Makrophagen und Neutrophilen exprimiert, nNOS in Neuronen und eNOS in den Endothelzellen. Speziell letzterem Enzym kommt bei der Bewahrung vor vaskulären Erkrankungen wie z.B. Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus eine bedeutende Rolle zu. Neben Arginin benötigt die eNOS zur Synthese von NO zusätzlich einen Kofaktor, das (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH_4), welches ein starkes Reduktionsmittel ist. Kardiovaskuläre Risikofaktoren fördern im Endothel die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale wie z.B. des Superoxids ($O_2^{\cdot-}$). Diese reagieren mit NO zu Peroxynitrit ($ONOO^-$).

BH_4 wird durch $ONOO^-$ oxidiert und steht somit nur noch im verminderten Maße zur Verfügung und fördert zudem die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion (Forstermann & Munzel, 2006).

Folglich sinkt die Aktivität von eNOS.

1.1.2 cGMP-Signalweg

Stickstoffmonoxid (NO), mit einer Halbwertszeit im Bereich von Sekunden, erreicht seinen Wirkungsort, z.B. die glatte Muskelzelle, rasch durch Diffusion.

In der glatten Muskulatur ist NO an folgenden Regulationsmechanismen beteiligt:

es fördert die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale (durch Peroxidasen), stimuliert die ADP-Ribosylierung von Proteinen sowie die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC), welche die Synthese von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) katalysiert. Neben den sGCs generieren die partikulären Guanylylzyklasen (pGC) ebenfalls den intrazellulären second messenger cGMP. Die Gruppe der pGCs umfasst die Isoformen GC-A, GC-B, GC-C, deren Aktivität unter der Kontrolle von natriuretischen Peptiden steht. Durch cGMP werden bislang drei bekannte Zielstrukturen beeinflusst:

In einigen Zelltypen moduliert cGMP die Konzentration von cAMP durch die Aktivierung bzw. die Inhibierung cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen (PDEs) (Sonnenburg & Beavo, 1994). In der Retina und im olfaktorischen System öffnet cGMP sog. Cyclic-nucleotid-gated cation channels (CNGs), die bei der Signalübertragung in diesen sensorischen Systemen eine wichtige Rolle spielen (Biel et al., 1998).

Darüber hinaus aktiviert cGMP cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) (Hofmann et al., 2000) (siehe Abb. 1).

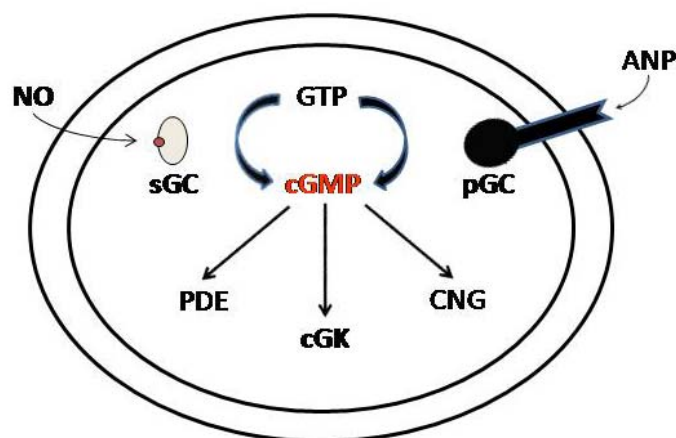


Abb. 1: Zelluläre Signalwege von cGMP. NO aktiviert die lösliche Guanylylzyklase (sGC) bzw. natriuretische Peptide die partikuläre Guanylylzyklase (pGC). Beide katalysieren die Bildung von cGMP. Dieses aktiviert anschließend verschiedene Zielstrukturen, z.B. die cGK. Weitere Erklärungen im Text.

1.2 Biochemische Eigenschaften der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die cGKs zählen zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen, die ihr Substrat spezifisch an den Aminosäuren Serin und/oder Threonin phosphorylieren. Sie treten bei fast allen Eukaryonten in einer großen Vielfalt auf. Vom einzelligen Organismus *Paramecium* bis zum Menschen sind cGKs bekannt.

In Säugetieren existieren zwei verschiedene Gene, welche für die cGKs kodieren (*prkg1* und *prkg2*). *Prkg1* kodiert für die zelluläre cGK Typ I (cGKI), *prkg2* für die membranständige cGK Typ II (cGKII).

1.2.1 Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Den N-Terminus der cGKI kodieren zwei alternative Exone, wodurch die beiden Isoformen cGKI α und cGKI β entstehen.

Die Enzyme bestehen aus drei funktionellen Domänen (Hofmann et al., 2006): einer N-terminalen Domäne, die einen Leuzin-Zipper enthält, einer regulatorischen Domäne mit zwei cGMP-Bindungsstellen sowie einer katalytischen Domäne. Letztere enthält eine MgATP- und Peptidbindungsstelle, wodurch das γ -Phosphat des ATPs auf ein Serin/Threonin des Substrats transferiert werden kann.

Die N-terminale Domäne hingegen vermittelt die Aktivierung bzw. Inhibierung des Enzyms. Dies geschieht, indem durch Bindung jeweils eines cGMP-Moleküls an die cGMP-Bindungsstellen in der regulatorischen Domäne eine Konformationsänderung stattfindet, welche die inhibierende Wirkung des N-Terminus auf das katalytische Zentrum aufhebt und damit die enzymatische Phosphorylierung des Substratproteins erlaubt.

Die N-terminale Domäne übernimmt zudem noch zwei weitere Funktionen:

durch die N-terminal lokalisierte Leuzin-Zipper Region bilden die Kinasen durch eine Protein-Protein-Interaktion ein Homodimer. Zudem wird die Zielsteuerung der Enzyme zu verschiedenen subzellulären Strukturen durch den N-Terminus vermittelt.



Abb. 2: Schematische Strukturen der drei Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase.
LZ: Leuzin-Zipper; Cat.: katalytische Domäne.

Die cGKI Knockout Mäuse haben eine stark verminderte Lebenserwartung aufgrund zahlreicher phenotypischer Ursachen. Da sie bereits mit einem durchschnittlichen Lebensalter von sechs Wochen versterben, eignen sie sich nur bedingt für Experimente. Aufgrund dessen wurde eine neue Mauslinie generiert, die die I α und I β Isoform ausschließlich in glatten Muskelzellen exprimiert (Weber et al., 2007). Die beiden Isoformen der cGKI, die cGKI α und die cGKI β entstehen durch alternatives Splicen während der Transkription zweier für den Aminoterminus kodierender Exons. Beide Isoformen werden in glatten Muskelzellen exprimiert.

Es wird jeweils eine der beiden Isoformen der cGKI unter der Kontrolle des Glattmuskelspezifischen SM22 α -Promotors exprimiert (SM-I α , SM-I β). Durch Einkreuzen der SM-I α oder SM-I β Linie in einen cGKI-defizienten Hintergrund werden Mäuse generiert, bei denen die Expression einer Isoform der cGKI ausschließlich im glatten Muskel wiederhergestellt ist. Dies ist ausreichend, um die Lebenserwartungen deutlich zu verbessern.

1.2.2 Allgemeines Expressionsmuster und Funktionen der cGKI

Die cGKI ist die dominante Isoform im kardiovaskulären System, sie wird in vaskulären Glattmuskelzellen (VSMCs) und in Kardiomyozyten, sowie in Thrombozyten (Massberg et al., 1999) exprimiert. Daneben wird sie in verschiedenen Hirnregionen, v.a. im Cerebellum und im Hippocampus (Feil et al., 2005), sowie in der Niere (Gambaryan et al., 2003) exprimiert. Untersuchungen an cGKI-defizienten Mäusen zeigten, dass die cGKI an der Kontrolle des vaskulären Tonus und damit an der Regulation des systemischen Blutdrucks beteiligt ist (Pfeifer et al., 1998).

Die Kontraktion und Relaxation der VSMCs wird durch die Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) reguliert und läuft folgendermaßen vonstatten (Hofmann et al., 2000):

Durch die Bindung eines Liganden, beispielsweise Noradrenalin, an seinen spezifischen Rezeptor werden intrazelluläre heterodimere GTP-bindende Proteine (G_q oder G_{11}) aktiviert, die wiederum die Phospholipase $C\beta_3$ aktivieren. Dadurch kommt es zur Synthese von Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 induziert nach Bindung an den IP_3 -Rezeptor Typ I (IP_3RI) die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Kalziumspeichern im Endoplasmatischen Retikulum (ER).

Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgt darüberhinaus über eine Aktivierung membranständiger spannungsabhängiger Kalziumkanäle und dem damit verbundenen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über diese Kanäle ins Zellinnere. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration vermittelt über Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) die Kontraktion, indem MLCK die leichte Kette des Myosins (MLC) phosphoryliert und dadurch die Myosin-ATPase aktiviert. Es kommt zu einer Kontraktion des Muskels (Hofmann et al., 2000).

Bei sinkender Kalziumkonzentration wird die MLC von der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert. Die MLCP ist ein Holoenzym, welches sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt: einer 37 kDa großen katalytischen Untereinheit (PP1c), einer 130 kDa schweren regulatorischen Untereinheit (MYPT1) und einer 20 kDa umfassenden Untereinheit unbekannter Funktion (Kitazawa et al., 2003).

Die Dephosphorylierung des MLC hat zur Folge, dass sich der Muskel wieder entspannt.

1.2.3 Funktion der cGKI zur Relaxation der glatten Muskelzelle

Die cGKI β ist das dominierende cGKI-Isoenzym im glatten Muskel.

Ein Substrat dieser Kinase ist das Inositol 1,4,5-triphosphat-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat **IRAG** (Schlossmann et al., 2000), welches zusammen mit der cGKI β und dem IP_3RI einen trimeren Komplex bildet.

Dieser ist lokalisiert an der Membran des ER (Schlossmann et al., 2000). Die Phosphorylierung von IRAG durch cGKI β inhibiert den Kalziumausstrom aus den intrazellulären Speichern des ER. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Phosphorylierung von IRAG ein wesentlicher Mechanismus ist, durch den NO/cGMP die $[Ca^{2+}]_i$ und damit den glatten Muskeltonus reduziert.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Senkung der $[Ca^{2+}]_i$ führt, ist die direkte Phosphorylierung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle (BK_{Ca}) durch cGKI (Sausbier et al., 2000).

Die Phosphorylierung dieser Kanäle erhöht ihre transmembranale Ionenleitfähigkeit für K^+ , (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999) und die Zelle wird hyperpolarisiert.

Dies hemmt spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und als Folge dessen sinkt die intrazelluläre Kalziumkonzentration.

Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass das $\text{cGKI}\alpha$ -Isoenzym die Phosphorylierung des „Regulators of G-protein signalling“ (RGS-2) katalysiert. Dadurch bindet RGS-2 G_q -Proteine und steigert dessen intrinsische GTPase Aktivität (Tang et al., 2003).

Dies führt zu einer beschleunigten Inaktivierung des G-Proteins (Hepler, 1999).

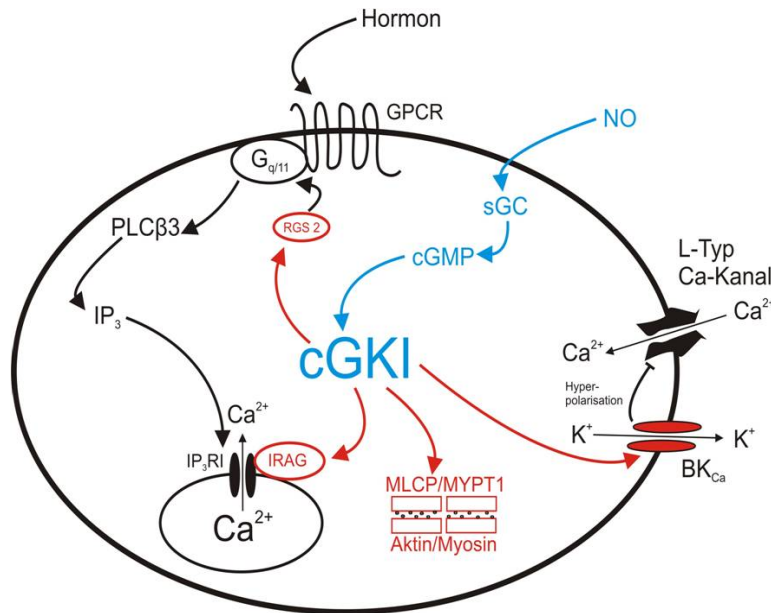


Abb. 3: Schema für die cGKI-abhängige Relaxation der glatten Muskulatur. BK_{Ca} , RGS-2, IRAG und MYPT1 sind Substratproteine der cGKI, deren Phosphorylierung eine Relaxation der glatten Muskulatur zur Folge haben können. Weitere Erklärung im Text.

1.3 Die Rolle der $\text{cGKI}\alpha$ und $\text{cGKI}\beta$ für die duodenale Bikarbonatsekretion

Das Duodenum bezeichnet einen Teil des Dünndarms. Seine wichtigste physiologische Bedeutung ist die Neutralisation des sauren Magenchymus mit Hilfe der Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion.

Schon seit rund 200 Jahren erforscht man die Schutzmechanismen, die verhindern, dass sich der Magen und das Duodenum selbst verdauen. Bereits 1898 stellte Pavlov die Hypothese auf, dass die luminalen Magensäure durch eine alkalisierte Schleimschicht neutralisiert wird.

Die duodenale Mukusschicht ist eine hochvisköse, zu etwa 95% aus Wasser und 5% aus charakteristischen Glykoproteinen bestehende Schleimschicht, die geringe Mengen an Lipiden und anderen Proteinen enthält und aus den Becherzellen und Brunner'schen Drüsen synthetisiert wird (Flemstrom et al., 1999). Die Intaktheit dieser Schleimschicht zählt zusammen mit der epithelialen Bikarbonatsekretion zu den wichtigsten Schutzmechanismen des Duodenalepithels.

Die Regulation der duodenalen Bikarbonatsekretion *in vivo* beinhaltet ein teilweise noch nicht verstandenes komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Neurotransmitter und Hormone (Hogan et al., 1994).

Darüber hinaus ist die nervale Regulation der Bikarbonatsekretion hier von entscheidender Bedeutung.

Die autonome Innervation durch Sympathikus und Parasympathikus sowie das intrinsische Nervensystem des Darms spielen eine wichtige Rolle in der duodenalen Bikarbonatsekretion, wobei das sympathische Nervensystem (adrenerg) im Wesentlichen eine hemmende Wirkung auf die Sekretion hat, während das parasympathische System (cholinerg) über den Nervus Vagus und lumbosakrale Fasern, überwiegend stimulierend wirkt (Hogan et al., 1994).

Das enterische Nervensystem beinhaltet zwei wichtige Nervenplexi, den Auerbach Plexus (Plexus myentericus) und den Meißner Plexus (Plexus submucosis). Im ersteren befinden sich die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), diese sind für die Regulation der intestinalen Motilität verantwortlich (Holzer, 2002).

Bereits gut untersucht ist die Wirkung einiger Substanzen auf die Bikarbonatsekretion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Es ist schon seit längerem bekannt, dass sich die Bikarbonatsekretion durch cAMP-, cGMP- und Ca^{2+} -abhängige Analoga steigern lässt (Hogan et al., 1997; Seidler et al., 1997).

Adenylatzyklase, ein Membranenzym, katalysiert die Bildung des second messenger cAMP. Sie ist über G-Proteine mit aktivierenden und inhibierenden Hormonrezeptoren verknüpft. Je nach Rezeptoraktivierung kommt es zur Aktivierung oder Inhibition der Adenylatzyklase.

Die Steigerung der intestinalen Bikarbonatsekretion durch cAMP-Analoga oder Stimulantien, die zur Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen wurde in mehreren Arbeiten nachgewiesen (Allen et al., 1993; Yao et al., 1993). Beispiele für Stimulantien sind Forskolin, VIP, Prostaglandine, Glukagon sowie Sekretin. Phosphodiesteraseinhibitoren tragen ebenfalls zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle bei, indem cAMP langsamer durch Phosphodiesterasen abgebaut wird.

Sowohl das hitzestabile *E. coli* Enterotoxin STa als auch das Peptid Guanylin stimulieren im Dünndarm als endogene Liganden am STa-Rezeptor eine elektrogene Cl⁻-Sekretion unter Beteiligung des „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR)-Proteins.

Während der Signaltransduktion kommt es zu einem cGMP-Anstieg durch Aktivierung der Guanylylzyklase GC-C an der luminalen Enterozytenmembran (Giannella, 1995). Das cGMP aktiviert wiederum die cGMP-abhängige Proteinkinase II. Über diesen Signaltransduktionsweg kommt es schließlich zur Aktivierung des CFTR Kanals (Pfeifer et al., 1996).

Ebenfalls beschrieben ist eine durch Guanylin bzw. STa ausgelöste elektrogene Bikarbonatsekretion im Duodenum der Ratte, die ebenfalls durch das CFTR-Protein vermittelt wird (Clarke & Harline, 1998; Guba et al., 1996).

Darüber hinaus stimuliert eine luminale Ansäuerung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die duodenale Bikarbonatsekretion beim Menschen und anderen Spezies (Hogan et al., 1994).

Der CFTR- Kanal sowie Transporter der Scl26a Familie sind ebenfalls an der säurestimulierten Bikarbonatsekretion beteiligt (Singh et al., 2008). Wie bereits erwähnt, ist die cGKII an der Aktivierung des CFTR-Kanals beteiligt, aber eine Deletion der cGKII in Mäusen hat keinen gastrointestinalen Phänotyp zur Folge, wohingegen cGKI-defiziente Mäuse ein massives duodenales Ulkus aufweisen.

Nach Ergebnissen von Holm und Sugamoto et al. (Holm et al., 2001; Sugamoto et al., 2001) scheint die Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung in Ratten eine säurestimulierte Bikarbonatfreisetzung zur Folge zu haben und da NO indirekt die Bildung von cGMP vermittelt, die wiederum eine Aktivierung der cGKI zu Folge hat, liegt die Vermutung nahe, dass die gestörte Bikarbonatsekretion eine entscheidende Rolle bei der Ulkuserstehung spielt.

1.4 Allgemeines Expressionsmuster der cGKII sowie deren Funktionen

Die cGKII wird in spezifischen Hirnregionen wie z.B. dem Thalamus und dem Hippocampus (el-Husseini et al., 1995), in Chondrozyten (Pfeifer et al., 1996), im Bürstensaumepithel des Dünndarms (Markert et al., 1995), in der Niere im juxtaglomerulären Apparat (Gambaryan et al., 1996) sowie in der Nebenniere in der Zona glomerulosa (Gambaryan et al., 2003) exprimiert. Sie wird durch Myristoylierung des NH₂-terminalen Glycin 2 in der Plasmamembran verankert und ist an einer Vielzahl physiologischer Regulationen beteiligt. Das Enzym reguliert die intestinale Chlorid/Wasser-Sekretion durch die Phosphorylierung des „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) Chloridkanals (Vaandrager et al., 1997).

Die Beeinflussung der enchondralen Ossifikation und damit des Knochenwachstums konnte an cGKII Knockout Mäusen demonstriert werden (Pfeifer et al., 1996).

Desweiteren ist sie an der renalen Reninfreisetzung (Wagner & Kurtz, 1998), sowie in der Nebenniere an der Aldosteronfreisetzung (Gambaryan et al., 2003) beteiligt. In den letzten beiden Fällen ist der genaue molekulare Mechanismus noch ungeklärt.

1.5 Funktion der cGKII in der Nebenniere

Die bisher bekannten Funktionen der cGKII konnten mittels Analyse cGKII-defizienter Mäuse aufgeklärt werden. Die Generierung der cGMP-abhängigen Knockout Mäuse (cGKII^{-/-}) wurde bereits beschrieben (Pfeifer et al., 1996).

Im Gegensatz zu den oben erläuterten cGKI-defizienten Mäusen, haben cGKII Knockout Tiere geringe pathologische Auffälligkeiten. Sie haben eine normale Lebenserwartung, sind jedoch resistent gegen das Enterotoxin STa aus *Escherichia coli*, dem häufigsten Erreger von Durchfallerkrankungen.

Auffällig ist, dass die cGKII-defizienten Mäuse um etwa 30 % kleiner als gleichaltrige Geschwisterkontrollen sind. Dieser Befund ist auf eine funktionelle Bedeutung der cGKII beim linearen Skelettwachstum zurückzuführen (Pfeifer et al., 1996).

Darüber hinaus wird die cGKII in der Zona glomerulosa der Nebenniere exprimiert (Gambaryan et al., 2003) und übernimmt dort eine wichtige physiologische Funktion.

In der Zona glomerulosa wird das Mineralokortikoid Aldosteron gebildet, welches u.a. in der Niere den Kalium-, Natrium- und Wasserhaushalt steuert, indem es eine verstärkte Rückresorption von Wasser und Kochsalz bewirkt und somit zu einer Erhöhung des Blutvolumens, sowie zu einer Blutdrucksteigerung führt (Hackenthal et al., 1990).

Die Regulation der Aldosteronproduktion wird v.a. zum Einen durch Angiotensin II über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und zum Anderen durch das adrenocorticotropes Hormon (ACTH) gesteuert.

Das Schlüsselenzym der RAAS-Signalkaskade ist die Aspartylprotease Renin, ein monomeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa.

Renin spaltet im ersten Reaktionsschritt der Kaskade aus Angiotensinogen, einem im Blutplasma zirkulierenden, vorwiegend in der Leber synthetisierten α -Globulin, das Decapeptid Angiotensin I ab. Angiotensin I ist biologisch inaktiv und wird durch das ubiquitär exprimierte, endothelständige Angiotensin Converting Enzym (ACE) durch hydrolytische Abspaltung zweier C-terminaler Aminosäuren (His-Leu) in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt, den biologischen Effektor des Systems.

Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch und stimuliert in der Nebenniere die Synthese und Sekretion des Steroidhormons Aldosteron.

Durch das Steroidhormon ACTH hingegen kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, cAMP abhängige Proteinkinasen (PKA) werden aktiviert, das „stereogenic acute regulatory“ (StaR) Protein phosphoryliert und Aldosteron sezerniert.

Im Gegensatz dazu kommt es durch cGMP zu einer Gegenregulation. Durch Bindung von cGMP an eine der beiden GAF-Domänen der Phosphodiesterase 2 (PDE2) kommt es zu einer vermehrten Hydrolyse des cAMPs (Wu et al., 2004). Folglich terminiert cGMP die Wirkdauer von cAMP-vermittelten Effekten.

Somit hat der second messenger cGMP einen negativen Effekt auf die Aldosteronsekretion, da dadurch eine Verminderung des cAMP-Levels vermittelt wird. Dieser Effekt kommt auch in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde zum Tragen.

Bei der Produktion und Freisetzung von Aldosteron wird die Funktion der PDE2 als Mediator bei der Steuerung von cAMP-Effekten durch den Effektor cGMP deutlich. So wirkt das Peptidhormon ANP durch die intrazelluläre cGMP-Erhöhung und anschließende Aktivierung der PDE2 der cAMP-vermittelten Freisetzung von Aldosteron entgegen (MacFarland et al., 1991).

Experimente an isolierten Glomerulosazellen der Rattennebnieren wiederum haben ergeben, dass eine Aktivierung der cGKII eine Erhöhung der Aldosteronsekretion zur Folge hat (Gambaryan et al., 2003). Dies beruht ebenfalls auf der Phosphorylierung des „stereogenic acute regulatory“ (StaR) Proteins (Stocco, 2001).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Vorausgegangene Veröffentlichungen haben ergeben, dass die ACTH stimulierte Aldosteronsekretion in Rindernebennieren durch den ANP/cGMP Signalweg inhibiert werden kann. Diesem Mechanismus liegt eine Aktivierung der cGMP abhängigen Phosphodiesterase 2 zugrunde, die hierbei eine gesteigerte Hydrolyse des cAMPs bewirken (Wu et al., 2004).

Im Gegensatz dazu zeigten Experimente, dass eine Aktivierung der cGKII die Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der Rattennebeniere stimuliert (Gambaryan et al., 2003).

Es ist bekannt, dass in den Glomerulosazellen der Mausnebnieren sowohl cGKII als auch PDE2 exprimiert werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wird mit Hilfe von cGKII Knockout Mäusen der Einfluss der cGKII auf die Aldosteronsekretion *in vivo* untersucht.

Im zweiten Teil stand die Charakterisierung der Rolle der cGKI an der duodenalen Bikarbonatsekretion im Vordergrund.

Es wurde mehrfach in Ratten, Ochsenfröschen und Hunden gezeigt, dass NO eine Rolle bei der säurestimulierten Bikarbonatsekretion spielt. Im NO-cGMP-cGKI-Signalweg ist die cGKI von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus haben cGKI-defiziente Mäuse einen massiven gastrointestinalen Phänotyp. Im Duodenum weisen diese Tiere ein Duodenalulkus auf. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente sollten die Mechanismen der cGKI-abhängigen duodenalen Bikarbonatsekretion näher charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Mausstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mauslinien mit einem 129Sv Hintergrund verwendet. Die Mäuse wurden im Tierhaus des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München gezüchtet und gehalten. Alle experimentellen Untersuchungen an diesen Tieren waren von der Tierschutzbehörde unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt.

2.1.1 Konventionelle cGKII Knockout Mäuse

Die Generierung und Charakterisierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase II Knockout Mäuse (cGKII^{-/-}) wurde bereits beschrieben (Pfeifer et al., 1996). Diese Mäuse verfügen über kein cGKII Protein mehr und zeigen eine Zwergwüchsigkeit auf.

2.1.2 Konventionelle cGKI Knockout Mäuse

Die Generierung und Charakterisierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I Knockout Mäuse (cGKI^{-/-}) wurde bereits beschrieben (Pfeifer et al., 1998). Diese Mäuse verfügen über kein cGKI Protein mehr und haben eine massiv reduzierte Lebenserwartung. Ungefähr 50% der Tiere sterben bereits innerhalb von 6-8 Wochen nach der Geburt.

2.1.3 cGKI α und cGKI β Rescue Mäuse

Die Generierung und Charakterisierung der cGKI α und cGKI β rescue Mäuse wurde bereits beschrieben (Weber et al., 2007). Die Mäuse exprimieren entweder die α oder die β Isoform unter Kontrolle des Glattmuskel-spezifischen SM22 α -Promotors. Zudem sind die Tiere auf einem cGKI defizienten Hintergrund gezüchtet, sodass diese Mäuse in allen Nichtglattmuskelzellen cGKI-defizient sind. Im Vergleich zu konventionellen cGKI^{-/-}-Mäusen weisen die Isoform-spezifischen Rescue Mäuse eine signifikant erhöhte Lebenserwartung und eine normale Glattmuskelfunktion auf.

2.2 Analyse experimentell verwendeter Mäuse

2.2.1. Genotypisierung mittels Gewebebiopsie (Mausschwanz)

Lysepuffer für Gewebeprouen pro Reaktionsgefäß 100µl:

10x Taq-Puffer (Genscript)	10 µl
Proteinkinase K (Roche) (20 mg/ml)	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	89 µl

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden Gewebeprouen durch eine Schwanzspitzenbiopsie von 10-14 Tage alten Mäusen entnommen und bei 55°C in 100 µl Lysepuffer über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Proteinkinase K Aktivität für 15 min. bei 95°C inaktiviert. Die Prouen wurden bis zur Genotypisierung mittels PCR bei -20°C gelagert.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein in vitro Verfahren zur gezielten Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen (Mullis & Faloona, 1987). Die Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Matrize wird zunächst durch Hitzedenaturierung (94°C) in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen. An die so entstandenen Einzelstränge können nun spezifische Oligonukleotid-Primer binden, die einen Startpunkt für die DNS-Synthese durch eine DNS-Polymerase festlegen. Für die Reaktion werden zwei Primer (*forward* Primer und *reverse* Primer) in großem molaren Überschuss eingesetzt, die sich an den zu kodierenden Strang der zu amplifizierenden DNS anlagern (*Primer Annealing*, 45-60°C). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'-> 3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72°C). Nach einer erneuten Denaturierung der DNS und dem *Primer-Annealing* erfolgt erneut eine Elongation durch die hitzestabile DNS-Polymerase. Mit jedem Zyklus kommt es im Idealfall zu einer Verdoppelung der DNS und damit in der Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Primer flankierten DNS-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle.

Reaktionsansatz für Standard PCR:

	Stock	25 µl
PCR Puffer (Genscript)	10x	2,5 µl
dNTPs (Roth)	1,25 mM	4 µl
Taq DNA Polymerase (Genscript)	5 U/µl	0,25 µl
Primer A (MWG)	10 pmol/µl	1,25 µl
Primer B (MWG)	10 pmol/µl	1,25 µl
Primer C (MWG)	10 pmol/µl	1,25 µl
ddH ₂ O	-	13,5 µl
DNA	-	1 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra (UNO Thermoblock) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	94°C	5 min	-
Denaturierung	94°C	15 sec	-
<i>Annealing</i> (Primer Anlagerung)	55°C	30 sec	x 25-30
Elongation	72°C	30 sec	
finale Elongation	72°C	5 min	∞

2.2.3 Reverse Transkription PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR dient der Synthese von codierender DNS (cDNS) aus sogenannter messenger Ribonukleinsäure (RNS) (mRNAs). Dafür werden sequenzspezifische Primer benötigt, die an eine bestimmte mRNA-Matrize binden. Um die Expression eines bestimmten Gens nachzuweisen, wird das Qiagen-One-Step-RT-PCR-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei 50°C werden im ersten Schritt dieser PCR zwei Enzyme aktiv, die Omniscript Reverse Transkriptase und die Sensiscript Reverse Transkriptase. Dadurch können cDNS-Mengen von 1 pg bis 2µg hergestellt werden. Anschließend wird die Hot-StartTaq DNS Polymerase bei 95°C aktiviert. Dieser Heissstart gewährleistet, dass im ersten PCR-Zyklus nur hoch spezifische und reproduzierbare PCR-Produkte entstehen. In dieser Arbeit wurde die RT-PCR zum Nachweis von Komponenten des NO/cGMP/cGKI Signalweges bei der duodenalen Bikarbonatsekretion verwendet. Bei jeder RT-PCR wurden ausserdem spezifische Primerpaare für Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) als Haushalts-Gen zugegeben.

Reaktionsansatz für Standard RT-PCR:

	Stock	50 µl
RT-PCR Puffer (Qiagen)	5 x	10 µl
dNTP Mix (Qiagen)	10 mM	2 µl
RT-PCR Enzym Mix (Qiagen)	-	2 µl
Primer A (MWG)	0,6 µM	1,2 µl
Primer B (MWG)	0,6 µM	1,2 µl
Primer HPRT A	0,6 µM	1,2 µl
Primer HPRT B	0,6 µM	1,2 µl
DEPC-H ₂ O	-	20,2-30,2 µl
RNA	2 µg	1-10 µl

Der Reaktionsansatz wurde in einen Thermocycler der Fa. Biometra (UNO Thermoblock) gestellt, der bereits auf 50°C vorgeheizt war und die RT-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	50°C	30 min	-
Taq-Polymerase Aktivierung	95°C	15 min	-
Denaturierung	94°C	30-60 sec	x 35-38
<i>Annealing</i> (Primer Anlagerung)	50-68°C	30-60 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
finale Elongation	72°C	10 min	-
Abkühlphase	20°C	∞	-

Diese Standardbedingungen wurden je nach Größe der Primer und des Amplikons verändert. Des Weiteren wurde ein semiquantitatives Protokoll verwendet, d.h. dass fünfmal 10 µl während eines (RT-)PCR-Intervalls entnommen wurden.

Agarose-Gel-Elektrophorese

10 x TBE:

Tris-CL (Roth)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
Na ₂ EDTA 2H ₂ O (Sigma)	20 mM
	ad 1 l ddH ₂ O

Auftragspuffer (6 x Dye):

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18%
EDTA, pH 8,0 (Sigma)	1,2 mM
10 x TBE	6 x
Bromphenolblau	0,15%
Xencyanol FF (Sigma)	0,15%
	ad 100 ml ddH ₂ O

DNA Elektrophorese Standard:

1 kb DNA ladder (1 µg/µl) 100 µl
Auftragspuffer (6 x Dye) 1 ml
10 x TBE Puffer 0,6 ml
ad 6 ml ddH₂O

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und können daher im elektrischen Feld nach Masse und Konformation aufgetrennt werden.

Durch die Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der in ein Agarosegel (2%) mit eingegossen werden kann, können die aufgetrennten DNS-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für den Größenvergleich wurde ein DNS-Standard (1 kb Ladder) mit auf das Gel aufgetragen.

Zur Herstellung eines solchen Gels wird Agarose in 1 x TBE durch Kochen in der Mikrowelle aufgelöst und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 20 mg/ml) versetzt. Nach Polymerisation des Gels werden 10 µl PCR-Produkt mit Auftragspuffer (6 x Dye) versetzt und in die Taschen des Gels pipetiert. Anschließend wurde die DNS bei einer Spannung von 200 V für ca. 40 min aufgetrennt.

2.3 Isolation von RNA und Proteingewinnung aus Mausgeweben

2.3.1 Isolation von Gesamt-RNS

Bei Arbeiten mit RNS ist stets darauf zu achten, dass eine Kontamination der RNS-haltigen Lösungen mit Ribonukleasen vermieden und die Aktivität der anwesenden RNasen vermindert wird. Da RNasen sehr stabile Proteine sind, die selbst Abkochen unbeschadet überstehen, ist die Inaktivierung dieser Proteine nur durch reduzierende Agentien wie β-Mercaptoethanol oder auch Guanidiniumisothiocyanat möglich (Chirgwin et al., 1979). Alle hitzestabilen Verbrauchsmaterialien wurden zur RNase-Dekontamination für mindestens 5 h bei 250°C gebacken.

Zur Isolierung der RNS aus dem Duodenum wurde das peqGOLD Total RNA Kit (Fa. peqLab) verwendet. Das frisch präparierte und anschließend schockgefrorene Gewebe wurde zunächst mit Mörser und Pistill pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und 400 µl TRK-Lyse-Puffer zugeben. Daraufhin wurde das Lysat auf eine Shredder-Säule geladen und für 1 min. bei 12000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde mit einem identischen Volumen 70% Ethanol versetzt und sorgfältig gemischt. Die Probe wurde anschließend auf eine HiBind-Zentrifugensäule pipettiert und eine min. bei 10000 x g zentrifugiert.

Für den folgenden Waschschrift wurden 500 µl Waschpuffer I auf die Säule pipettiert und 15 sec. bei 10000 x g zentrifugiert.

Obwohl durch die HiBind-RNS-Säule die vorhandene DNS größtenteils entfernt wird, wurde dennoch eine DNase-Behandlung durchgeführt. Der DNase I Reaktionsmix wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet und 75 µl des Reaktionsmixes direkt auf die Membran der HiBind-Säule pipettiert und für 15 min. bei RT inkubiert.

Anschließend folgte ein erneuter Waschschrift. Hierfür wurden 600 µl des Waschpuffers II auf die Säule pipettiert und für 15 sec. bei 10000 x g durch die Säule zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt.

Der darauffolgende Trocknungsschritt ist essentiell und darf nicht verkürzt werden. Dafür wurde die Säule in ein leeres Sammelgefäß gesteckt und durch einminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit vollständig getrocknet. Der letzte Schritt der RNS-Isolation beinhaltet die Elution der RNS mit 50 – 100 µl sterilem RNase-freiem Wasser (H_2O_{DEPC}). Dafür wurde die Säule erneut in ein neues Sammelgefäß gebracht, das Wasser auf die Matrix pipettiert und eine min. bei 5000 x g zentrifugiert. Die RNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt.

2.3.2 Proteingewinnung aus Mausgewebe

Die durch zervikale Dislokation euthanasierten Mäuse wurden auf dem Rücken fixiert. Anschließend wurde das benötigte Gewebe sofort entnommen. Die Rindernebenieren wurden in kaltem PBS vom Schlachthof zum Institut transportiert. Die Präparation fand in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis statt. Dabei wurden die Nebennieren und das Duodenum von Fett und umgebenden Gewebe befreit und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren um Proteinabbau durch intrazelluläre Proteasen zu verhindern. Für die Präparation der Mausnebenieren wurde ein Binokular zu Hilfe genommen.

Zum Zellaufschluss wurden die Gewebe mit Mörser und Pistill zerkleinert, welche zuvor ebenfalls in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurden die Gewebepartikel in Eppendorf-Gefäße überführt und in 2% SDS, 50 mM Tris, pH 7,5 gelöst (100 µl pro 10 mg Gewebe). Dieser Ansatz wurde bei RT mit einem Mikropistill homogenisiert und anschließend für 2 min. bei RT und 13000 x g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit Proteaseinhibitor-Mix (Complete Mini; Roche) nach Angabe des Herstellers versetzt und bis zur Verwendung bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

2.3.3 Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit dem BCA-Test bestimmt. Dieser Test macht sich zunutze, dass Kupfer(II)-Ionen mit Proteinen Komplexe eingehen und dabei zu Kupfer(I)-Ionen reduziert werden. Diese bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen stöchiometrischen violetten Farbkomplex, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Verwendet wurde der BC Assay Protein Quantification Kit der Firma Uptima (über KMF Laborchemie Handels GmbH, Sankt Augustin-Buisdorf, Deutschland). Es wurden Doppelwertbestimmungen von 1/50- bis 1/500- Verdünnungen der zu analysierenden Proteinlösung vorgenommen.

Zur Erstellung der Eichkurve diente als Standard eine Verdünnungsreihe von Bovinem Serum Albumin in den Konzentrationen 0, 10, 20,40, 60, 80 und 100 ng/µl. Die Proben wurden 45-60 min. bei 60°C inkubiert und in einer 96-well-Platte im Titertek Multiskan® MCC/340 bei 540 nm photometrisch vermessen.

2.4 Western Blot

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf Gele der Dimension 80 mm x 73 mm x 0,75 mm:

8% Trenngel (für zwei Gele):

Acrylamid 30:0,8 (Roth)	2,66 ml
4 x Tris/SDS (pH 8,8)	2,5 ml
H ₂ O _{bidest}	6,5 ml
TEMED (Roth)	10 µl
10% APS (Serva)	100 µl

5% Sammelgel (für zwei Gele):

Acrylamid 30:0,8 (Roth)	325 µl
4 x Tris/SDS (pH 6,8)	625 µl
H ₂ O _{bidest}	1,525 ml
TEMED (Roth)	2 µl
10% APS (Serva)	10 µl

4 x Laemmli-Puffer:

Tris/HCl (pH 6,8)	240 mM
DTT (Gerbu)	200 mM
SDS	8% (w/v)
Glyzerin	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,004% (w/v)

Die Auftrennung von Proteinlysaten im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Dabei werden durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) die Ladungen der Proteine maskiert sowie durch DTT ihre Cysteinbrücken aufgebrochen und entfaltet. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt anhand ihrer Größe im elektrischen Feld. Je nach Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid (AA) und Bisacrylamid (BA) ist es möglich, die Geleigenschaften dem Experiment optimal anzupassen.

Die Polymerisation des Gels erfolgt durch eine radikalische Reaktion durch den Zusatz von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator.

Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die Proteine erst das Sammelgel durchlaufen, in dem sie fokussiert werden, um dann im Trenngel der Größe nach aufgetrennt zu werden.

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Gießvorrichtungen der Firma BioRad verwendet. Zunächst wurde das Trenngel in die Apparatur eingefüllt, mit Isopropanol überschichtet und nach Abschluss der Polymerisation (circa 30 min.) mit H₂O gewaschen. Nach Absaugen des Wassers wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Durchführung:

10 x SDS-Laufpuffer:

Tris-HCl (pH 8,3)	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)

Nach Bestimmung der Proteinmenge wurden pro Ansatz jeweils zwischen 30-100 µg Gesamtprotein und eine entsprechende Menge Laemmli-Puffer eingesetzt. Anschließend wurden alle Ansätze zur Denaturierung für 10 min. bei 95°C aufgeköcht und aufgetragen. Als Proteingrößen-Standard diente der *Precision Plus Protein™ Standard All Blue* (BioRad). Die Auftrennung in 1 x SDS-Laufpuffer erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels bei 50 V, anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Als Spannungsquelle diente der Power Pac 200 (Bio Rad).

2.4.2 Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren

Anodenpuffer I

Tris/HCl, pH 10,4	300 mM
Methanol	20% (v/v)

Anodenpuffer II

Tris/HCl, pH 10,4	30 mM
Methanol	20% (v/v)

Kathodenpuffer

Tris/HCl, pH 7,6	25 mM
ϵ -Aminocaprinsäure (Sigma)	40 mM
Methanol	20% (v/v)

Der Transfer auf eine spezielle Membran ermöglicht eine spezifische Identifizierung und Charakterisierung der aufgetrennten Proteine und macht sie für eine Immundetektion zugänglich.

Bei dem hier angewendeten Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) wurden Gel und Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Immobilon-P, Millipore), sandwichartig von Filterpapieren eingerahmt, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienten und zwischen die Elektroden gelegt wurden. Methanol im Puffer diente dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proben wurden in einer Transfer-Apparatur der Firma Biometra (Standard Power Pack P25) nach folgendem Blotting-Schema (von unten nach oben) auf die Membran übertragen:

Anode

3 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer I

2 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer II

Membran, kurz in Methanol aktiviert, getränkt in Anodenpuffer II

SDS-Polyacrylamidgel

5 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer

Kathode

Die Filter (GB003, Schleicher & Schüll) und die Membran wurden auf die Größe des SDS-Polyacrylamidgels zugeschnitten, der Blot luftblasenfrei aufgebaut und die Proteine 1 h bei konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ auf die Membran transferiert.

2.4.3 Immundetektion

Im Western Blot können Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern identifiziert und durch einen gekoppelten Enzymassay sichtbar gemacht werden. Diese Methode setzt sich aus drei Schritten (SDS-PAGE-Elektroblot-Immundetektion) zusammen und ermöglicht je nach Qualität des verwendeten Antikörpers eine sehr sensitive und spezifische Detektion eines Proteins.

Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran 1 h in 5% Magermilchpulver (Reformhaus) in 1 x TBST geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBST (5 min.) wurde die Membran in den jeweiligen verdünnten Primärantikörpern (in 1 x TBST, 3% BSA (Roth), 0,05% NaN₃ (Merck)) überführt und im Überkopfschüttler über Nacht inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut gewaschen (3 x 10 min. in 1 x TBST/1% Milchpulver) und für eine Stunde mit einem an Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörper bei RT inkubiert. Anschließend wurde abermals dreimal in 1 x TBST (10 min.) gewaschen.

Die Detektion und Visualisierung der Meerrettichperoxidase-Reaktion erfolgte durch Einsatz eines „Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Kit“ (Perkin-Elmer). Die Membran wurde für 1 min. mit den im Kit enthaltenen Reagenzien inkubiert. Dabei wird Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid unter Emission von Chemolumineszenz durch die Meerrettich-Peroxidase oxidiert. Diese wird mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert. Die Belichtungszeiten variierten von 5-30 sek. Die Filme wurden im Anschluss mit einer Entwicklermaschine (Agfa, Curix 60) entwickelt.

Die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind im Anhang in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

2.5 Histologische Untersuchungen

2.5.1 Anfertigen von Paraffinschnitten

PBS (Phosphat-gepufferte Saline); pH 7,4

NaCl (Roth)	135 mM
KCl (Merck)	3 mM
Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O (Roth)	8 mM
KH ₂ PO ₄ (Roth)	2 mM

Die entnommenen Gewebe wurden in 1 x PBS gewaschen und anschließend folgendem Protokoll unterworfen:

Die Fixierung der Organe erfolgte in 4%-iger PFA Lösung bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler. Nach der Fixierung wurde dreimal für je 1-1½ h bei RT mit 1 x PBS gewaschen.

Im Anschluss wurden die Organe wie folgt dehydriert:

50% EtOH
70% EtOH
80% EtOH
90% EtOH
100% EtOH 3 x
50% EtOH/Toluol
100% Toluol 3 x

Jeder Schritt der Entwässerung dauerte 1-1½ h. Nach der Dehydrierung wurden die Organe und Gewebestücke in flüssigem Paraffin (60°C, „Paraplast“, Sigma) eingelegt. Es handelte sich hierbei um drei Paraffin-Schritte (I, II und III), wobei das Gewebe im Paraffin I über Nacht und im Paraffin II und III jeweils 2 bis 4 h verweilte.

Die drei verschiedenen Paraffin-Schritte dienen dazu, das Gewebe weitgehend vom Toluol zu befreien. Anschließend wurden die Organe in Paraffin III auf Eis eingebettet. Nach dem Erkalten (Härtung des Paraffins) wurden die Organe bei RT gelagert.

Bei der Histologie wurden mikroskopische Gewebeschnitte mittels verschiedener Färbetechniken untersucht.

Dazu wurden 8 µm dicke Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Organe mittels eines Rotationsmikrotoms (Microm HM 335 E) angefertigt und auf beschichtete Objektträger (OT) (polylysinbeschichtete Menzel-Gläser) aufgezogen. Die OT wurden anschließend über Nacht bei 37°C getrocknet und bei RT gelagert. Vor der histologischen Färbung wurden die Schnitte entparaffinisiert und rehydriert. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Entparaffinisieren: 100% Toluol, 2 x 10 min
Rehydratisieren: 100% EtOH, 2 x 5 min
90% EtOH, 5 min
70% EtOH, 5 min
50% EtOH, 5 min
in H₂O_{dest} (HE-Färbung) bzw. PBS (Immunfärbung) 5 min. waschen

2.5.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Hämatoxylinlösung nach Harris (Sigma)

Hämatoxylin 7,5 g/l
in H₂O_{bidest}

Eosinlösung

Eosin Y (Sigma)	5,8 g
Phloxin B (Sigma)	1,2 g
ad 200 ml 70%igem EtOH	

0,1%-ige Ammoniaklösung (frisch)

NH ₄ OH (Roth)	0,1%
in H ₂ O _{bidest}	

Die HE-Färbung ist eine Sukzedanfärbung, die auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption basiert. Hämalaun ist positiv geladen und bindet an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren.

Dadurch werden die Kerne blauviolett gefärbt. Eosin ist negativ geladen und bindet an die positiven Gewebsbestandteile (Eiweiße), wodurch das Zytoplasma rosa gefärbt wird.

Diese Färbung ist eine „Übersichtsfärbung“ und dient zur Beurteilung der Morphologie der Gewebeschnitte und wurde wie folgt durchgeführt:

Die entparaffinisierten und rehydratisierten Gewebeschnitte wurden zur Kernfärbung 10-15 sec in eine Hämatoxylinlösung getaucht.

Nach zweimaligem Waschen mit H₂O_{dest} (je 2 min.) wurden die Schnitte in einer 0,1%-igen Ammoniaklösung gebläut. Es folgte ein dritter Waschschrift in H₂O_{dest} (5 min.). Zur Plasmafärbung wurden die Schnitte 10-15 sec. in eine Eosinlösung getaucht. Anschließend wurde das Gewebe erst achtmal in 95%-igem EtOH, dann achtmal in 100%-igem EtOH getaucht. Nachdem die Schnitte 2 min. in 100%-igem EtOH ruhten, wurden sie weitere 2 min. in Xylol gelagert. Anschließend wurden Objektträger mit Depex-Harz (Serva) und Deckgläschen versehen.

2.5.3 Immunhistologische Färbung mittels Peroxidase

Ciratpuffer pH; 6,0

tri-Nariumcitrat * 2H ₂ O (Roth)	10 mM
in H ₂ O _{bidest}	

Die Anfärbung erfolgte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Verfahren (Vectastain ABC-System; Vector Laboratories), welches auf einer drei-Schritt-immunhistochemischen Färbereaktion beruht. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin mit hoher Affinität zu binden. Zunächst bindet ein spezifischer Primärantikörper an das zu bestimmende Antigen. Ein Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und an diesen bindet, ist mit Biotin konjugiert.

Als drittes Reagenz wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex verwendet, bei dem lediglich drei der vier Bindungsstellen des Avidinmoleküls besetzt sind. Die freie Stelle ermöglicht die Anlagerung an das Biotin des Sekundärantikörpers.

Durch Zugabe eines Chromogens und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird die Peroxidase und damit das Antigen sichtbar gemacht. Das Enzym Peroxidase bildet hierbei mit dem hinzugefügten Substrat H_2O_2 einen Komplex. Dieser reagiert zusammen mit einem Elektronendonator, hier Diaminobenzidin (DAB, Sigma), ein Chromogen, das eine braune Farbe ergibt, zu einem Farbmolekül und Wasser. Das Farbmolekül präzipitiert und markiert somit das Antigen. Die verwendeten Antikörper sind im Anhang (Tab. 3 und 4) aufgelistet.

Durchführung

Die entparaffinisierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden in eine feuchte Kammer gelegt.

Um das Gewebe stärker zu permeabilisieren, wurde 0,3% Triton X-100 (t-Octyl- phenoxyethoxyethanol; Sigma) in das PBS gegeben und für 30 min. bei RT inkubiert. Dies verbessert den Antigenzugang v.a. bei membrangebundenen Proteinen.

Zum Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität wurden 3% H_2O_2 , 20% Methanol in PBS auf die Gewebeschnitte gegeben und für 10 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 1 x für 5 min. mit PBS gewaschen.

Optional konnte zur Antigendemaskierung ein „Kochschritt“ eingelegt werden. Hierfür wurden die Gewebeschnitte für 15 min. im 10 mM Citratpuffer inkubiert und anschließend mit 80 ml Citratpuffer in einer Petrischale bei 800 Watt in einer Mikrowelle für 4 min. erhitzt und für weitere 15 min. im selben Puffer bei RT abgekühlt. Alternativ wurde der Kochschritt in einem Mikrowellenkochtopf (Tender Cooker, Nordic Ware, USA) durchgeführt. Hierbei wurde in 500 ml Citratpuffer für 15 min. bei 800 Watt und anschließend nochmal für 10 min. bei 400 Watt erhitzt und für weitere 15 min. im selben Puffer bei RT abgekühlt. Es folgten erneut Waschschrte von 3 x 5 min. in PBS.

Um die freien Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Gewebeschnitte, die zuvor mit einem Fettstift (ImmEdgeTM Pen, Vectastain) umrandet wurden, für 1 h bei RT mit 1,5-5% NGS (Normal Goat Serum, Vectastain) inkubiert. Die Konzentration des NGS wurde jeweils auf den einzelnen primären Antikörper optimiert.

Anschließend wurde der primäre Antikörper in 1,5-5% NGS (Normal Goat Serum) in PBS, Vectastain) verdünnt, auf die Schnitte aufgeträufelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Antikörper abgenommen und die Gewebeschnitte wurden 3 x 5 min. mit 0,5-1,5% NGS-PBS gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (biotinylierte Goat-anti-rabbit IgG; Vectastain) in der Verdünnung 1:200 in 1,5-5% NGS-PBS für 45 min. bei RT auf die Schnitte gegeben.

Im Folgenden wurden die Lösung A und Lösung B des Vectastain ABC-Systems in PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt, sofort gut gemischt und für 30 min. im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Schnitte 3 x 5 min. mit PBS gewaschen. Danach wurde der AB-Komplex auf die gewaschenen Schnitte geträufelt und für 30 min. im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss folgten erneut Waschschriffe mit PBS (3 x 5 min.). Die anschließende Färbung erfolgte mit 0,05% DAB in PBS und 0,003% H₂O₂ für 2-10 min., die Reaktion wurde zunächst durch Waschen mit Leitungswasser (5 min.) und anschließend H₂O_{bidest} (5 min.) gestoppt.

Die Objektträger wurden daraufhin mit Aquatex (Merck) luftblasenfrei eingebettet und für mindestens 15 min. getrocknet.

Die gefärbten Schnittepräparate wurden mit dem Mikroskop Meta LSM 510 Version 3.2 SP2 (Zeiss) im Hellfeld mit einem 40 x W Objektiv (Wasserimmersion) und verschiedenen Zoomfaktoren aufgenommen.

Zur Dokumentation wurde eine im Mikroskop integrierte digitale Kamera AxioCam HRc verwendet. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Adobe Photoshop 7.0“.

2.5.4 Immunhistologische Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper

Hierfür wurden Cy2- (Carbocyanin) und Cy3- (Indocarbocyanin) gekoppelte sekundäre Antikörper (Dianova) verwendet. Alle eingesetzten Antikörper sind mit ihrer Herkunft und Verdünnung im Anhang (Tab. 3 und 4) aufgeführt. Die spezifische Bindung der Antikörper wurde durch Weglassen des primären Antikörpers überprüft.

Durchführung

Die entparaffinisierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden in eine feuchte Kammer gelegt. Um das Gewebe stärker zu permeabilisieren, wurde 0,3% Triton X-100 (t-Octyl- phoxypolyethoxyethanol; Sigma) in PBS gegeben und für 30 min. bei RT inkubiert. Dies verbessert den Antigenzugang v.a. bei membrangebundenen Proteinen.

Anschließend wurden die Schnitte 1 x für 5 min. mit PBS gewaschen. Um die freien Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Gewebeschnitte, die zuvor mit einem Fettstift (ImmEdgeTM Pen, Vectastain) umrandet wurden, für 1 h bei RT mit 1,5-10% NGS (Normal Goat Serum, Vectastain) inkubiert.

Anschließend wurde der primäre Antikörper in 1,5-10% NGS in PBS verdünnt, auf die Schnitte aufgeträufelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Antikörper abgenommen und die Gewebeschnitte wurden 3 x 5 min. mit PBS gewaschen.

Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (Cy2- bzw. Cy3- gekoppelt; Dianova) in der Verdünnung 1:500 in 1,5-10% NGS-PBS auf die Gewebeschnitte gegeben und diese im Dunkeln für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde 3 x 5 min. im Dunkeln mit PBS gewaschen.

Daraufhin wurden die Objektträger mit Premafluor, Aqueous Mounting Medium Liquid (Beckman; Coulter TM) luftblasenfrei eingebettet. Dieses Einbettmedium schützt die Fluoreszenzfärbung für mehrere Wochen vor dem Ausbleichen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4°C im Dunkeln getrocknet. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4°C im Dunkeln.

Für Kolokalisationsfärbungen wurde das Protokoll nach dreimaligem Waschen mit PBS ab dem Blockierungsschritt wiederholt und erneut ein primärer Antikörper aufgeträufelt und über Nacht inkubiert. Dieser wurde am Folgetag verworfen und nach einem dreimaligen PBS Waschschrift erneut ein sekundärer Antikörper dazugegeben.

Nach erfolgter Inkubation und erneuten Waschschriften konnten die Objektträger wie oben beschrieben eingebettet werden.

Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte durch das konfokale Laser-Scan Mikroskop (LSM510). Die fluorochromen Konjugate wurden von einem Krypton-Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm (zur Detektion von Cy2) bzw. von einem Helium-Neon Laser bei 543 nm (für Cy3) angeregt und die optischen Einzelschnitte mit einem 40x Objektiv (Ölimmersion) und verschiedenen Zoomfaktoren aufgenommen. Bei den Kontroll-experimenten zur Spezifität der einzelnen Antikörper wurde besonders darauf geachtet, die Einstellungen der Lochblende (pinhole) und die Empfindlichkeit des Restlichtverstärkers konstant zu halten.

2.6 Physiologische Experimente

2.6.1 *In vivo* Tierexperimente

Zur Bestimmung von Renin und Aldosteron wurden Kontroll- und cGKII^{-/-} Tieren intraperitoneal (10 mg/kg Körpergewicht) ACTH (ACTH 1-24, Ratte, Bachem) bzw. ANP (ANF 1-28, Ratte, Bachem) appliziert. Die Peptide wurden in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Als Negativkontrolle diente dieselbe Menge 0,9%-ige Kochsalzlösung. Die Blutproben wurden 0, 10, 30 und 60 min. nach Verabreichung aus der Schwanzvene gewonnen.

2.6.2 Radioimmunologische Bestimmung von Aldosteron und Renin

Der Radioimmunoassay (RIA) diente zur direkten quantitativen Bestimmung von Aldosteron (Demeditec, Kiel, Germany) und Renin (Byk&DiaSorin Diagnostics, Dietzenbach, Germany) im Blutserum von Mäusen. Das Verfahren nutzt als radioaktive Markierung Iod¹²⁵. Die Konzentrationsbestimmung von Renin wurde freundlicherweise in Regensburg am Institut für Physiologie von Herrn. Dr. Schweda durchgeführt.

Die Rundbodenröhrchen für die Totalaktivität (TC), jene der nicht spezifischen Bindung (NSB), die fünf Standards einschließlich Nullstandard (B0), die Kontrolle und die Proben werden beschriftet und die Standards und Kontrollen auf Raumtemperatur gebracht.

10 µl des jeweiligen Standards mit den Konzentrationen 0 pg/ml (B0), 15 pg/ml, 50 pg/ml, 200 pg/ml und 558 pg/ml werden mit 40 µl 0,9%-iger NaCl-Lösung in die Röhrchen pipettiert. Mit der Kontrolle (83-125 pg/ml) und den Proben wird ebenso vorgegangen. Das NSB-Röhrchen enthält nur 50 µl 0,9%-ige Kochsalzlösung. Zu allen Röhrchen werden 500 µl des jeweiligen Tracers pipettiert.

Der Ansatz wird 3 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zur Konzentrationsbestimmung werden die Röhrchen im Gammacounter (Berchtold LB 2111) vermessen.

2.6.3 Intragastrische pH Messungen

Die intragastrische pH Messung fand in anästhesierten Mäusen statt. Die Mäuse waren in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 erhielt über acht Wochen den Protonenpumpeninhibitor Esomeprazol (8 mg/kg Futter, Fa. AstraZeneca) im Futter. Gruppe 2, die Kontrollgruppe, erhielt reines Futter (Zuchtfutter, Fa. Altromin). Die Messung fand mit einer digitalen und kalibrierten pH-Messsonde (Standard Instruments GmbH, Karlsruhe) statt. Hierfür wurde die pH-Sonde in den Magen platziert und der gemessene pH-Wert vom Monitor abgelesen.

2.6.4 Morphologische Messungen

Die Duodeni der mit Protonenpumpeninhibitor behandelten Tiere, sowie die Duodeni der Kontrolltiere wurden nach Euthanasierung entnommen und histologisch weiterverarbeitet (siehe 2.5.1).

Nach Anfertigung von 8 µm dicken Paraffinschnitten vom gesamten Duodenum wurde jeweils der erste Schnitt aus einer ca. zwölfzähligen Serie von Fünferschnitten vermessen. Zur Vermessung diente ein Binokular mit der digitalen Zeisskamera (Axio Cam MRc5). Ausgemessen wurde immer der Aussen- und Innenumfang und diese voneinander subtrahiert und statistisch erfasst.

2.7 *In vivo* Bikarbonatmessungen

Die *in vivo* Bikarbonatmessungen dienen der Bestimmung der Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion *in vivo*.

Alle Bikarbonatmessungen wurden an der Medizinischen Hochschule in Hannover im Labor von Frau Prof. Seidler durchgeführt.

Hierfür wurden sowohl α -, β -rescue Mäuse, als auch $cGKI^{-/-}$ und Kontrolltiere mit einer Isoflurannarkose (Forene, Abbott) anästhesiert, die kontinuierlich durch eine Atemmaske verabreicht wurde. Die Körpertemperatur wurde mittels einer Wärmematte konstant bei 37,5°C gehalten. Des Weiteren wurde ein Katheter in die linke Aorta carotis appliziert um den Blutdruck zu überwachen und um eine isotonische Na_2CO_3 Lösung zu verabreichen. Der Ductus pancreaticus wurde mit einem Ligaturfaden abgebunden, um eine Bikarbonatzufuhr aus dem Pankreas zu verhindern.

Ein weiterer Katheter wurde über den Magen in das Duodenum platziert und nach 20- minütiger Pause wurde die basale Bikarbonatsekretion im Intervall von 10 min. gemessen. Anschließend wurde mit einer 5- minütigen Säureapplikation pH 2,5 die Bikarbonatsekretion stimuliert, für 5 min. mit isotonischer Kochsalzlösung ausgewaschen und die Bikarbonatsekretion für eine Stunde im 10 min. Intervall gemessen (Singh et al., 2008).

Je nach Versuchsaufbau wurde gegebenenfalls vor der Bikarbonatmessung eine subdiaphragmatische Vagotomie durchgeführt.

Die Bikarbonatsekretion wurde auf die Gesamtfläche (cm^2) in μmol pro Stunde angegeben. Dazu wurde das Duodenum im Anschluss an die Messung in der euthanisierten Maus vermessen.

2.8 Nervus vagus Stimulation

Nach erfolgter Vagotomie dient die Nervus vagus Stimulation zur Stimulation des nervalen Vagustonus.

Die beiden Seitenäste des subdiaphragmatischen Nervus vagus wurden zwischen eine bipolare Elektrode (www.wpiinc.com) geklemmt, die mit einem elektrischen Stimulationsgerät verbunden waren (www.grasstechnologies.com, SS48).

Dieses Gerät sendete Spannungs- impulse in 5 ms Intervallen von 10 Hz über einen Zeitraum von 10 min. und einer Intensität von 10-20 V.

2.9 Statistik

Alle in einer Statistik aufgeführten Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA (wiederholte Messungen, nicht paarweise Vergleiche), dem t-Test, um Unterschiede zu evaluieren. Das gewählte Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Funktion der cGKII in der Nebenniere

3.1.1 Gewebeexpression der cGMP-abhängigen Proteinkinasen und der PDE2A in der Nebenniere

Wie bereits erwähnt, wird die cGKII in der Nebenniere in der Zona glomerulosa exprimiert. Dieser Bereich ist von großer physiologischer Bedeutung, da dort das Mineralokortikoid Aldosteron produziert wird.

Vorausgegangene Veröffentlichungen haben ergeben, dass die ACTH stimulierte Aldosteronsekretion in Rindernebenieren durch den ANP/cGMP Signalweg inhibiert werden kann. Diesem Mechanismus liegt eine Aktivierung der cGMP abhängigen Phosphodiesterase 2 zugrunde, die eine Hydrolyse des cAMP bewirken (MacFarland et al., 1991).

Darüberhinaus zeigten Experimente in einer weiteren Publikation, dass eine Aktivierung des cGKII-Proteins die Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der Rattennebeniere über die Phosphorylierung des StaR Proteins stimuliert (Gambaryan et al., 2003).

Es ist bekannt, dass in den Glomerulosazellen der Mausnebenieren sowohl die cGKII als auch die PDE2 exprimiert wird (Gambaryan et al., 2003).

Um den kontroversen Einfluss der cGKII auf die Aldosteronsekretion genauer zu untersuchen wurde zunächst das Vorkommen von der cGKI, cGKII und der PDE2A mit spezifischen Antikörpern im Gesamtextrakt der Nebenniere von cGKII-defizienten Mäusen und Kontrolltieren sowie von Rindern mittels Immunoblots analysiert.

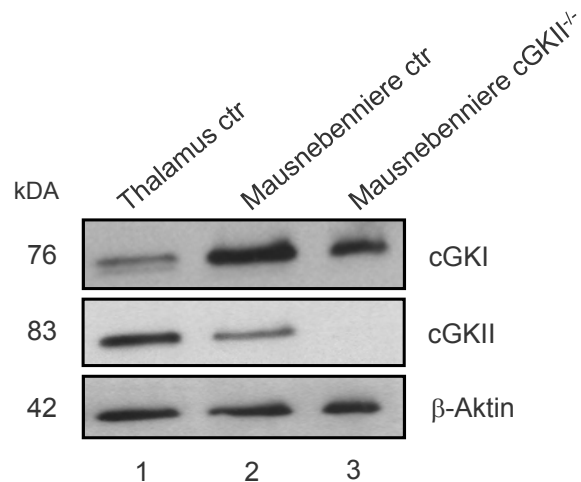


Abb 4: Analyse der Proteinexpression von der cGKI und der cGKII in der Mausnebenniere. Gezeigt ist ein Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Mausnebennieren- und Thalamusgewebe der mit spezifischen Antikörpern gegen cGKI bzw. cGKII immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde.

In den Spuren 1 und 2 handelt es sich um Thalamus- und Mausnebennierengewebe eines Kontrolltieres. In Spur 3 ist das Nebennierengewebe einer cGKII^{-/-}-Mausmutante aufgetragen. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Links ist die Größe des Molekulargewichts angegeben. β-Aktin diente als Ladungskontrolle.

Dabei zeigte sich, dass die cGKI sowohl im Nebennierengewebe der Kontrolltiere als auch in der cGKII-defizienten Mausmutante exprimiert wird (Spur 2 und 3). Dabei ist beim Vergleich der Signalintensität des Kontrollgewebes mit dem Gewebe der cGKII^{-/-}-Mausmutante kein Unterschied zu erkennen. Das Thalamusgewebe einer Kontrollmaus in Spur 1 diente als Kontrolle für die Expression der cGKI und cGKII. In Spur 3 ist keine Expression des cGKII-Proteins zu sehen, da es sich in der Spur um das Nebennierengewebe der cGKII^{-/-}-Mausmutante handelt (Abb. 4).

In Abbildung 5 ist erneut gezeigt, dass die cGKII im Mausnebennierengewebe des Kontrolltieres exprimiert wird (Spur 1). Im Gewebe der Mausnebenniere der cGKII^{-/-}-Mausmutante und im Gewebe der Rindernebenniere, welches wie in 2.3.2 beschrieben aus dem Schlachthof gewonnen wurde, konnte kein cGKII-Protein detektiert werden.

Desweiteren zeigt sich, dass die PDE2A in der Nebenniere sowohl im WT-Gewebe, im Gewebe der cGKII^{-/-}-Mausmutante, als auch im Gewebe der Rindernebenniere exprimiert wird (Spur 1-3). Im Vergleich der Signalintensität ist dabei die PDE2A im Gewebe der Kontroll- und cGKII^{-/-}- Mausnebenniere eine etwas stärkere Bandenintensität von PDE2A zu sehen, was sich im Gewebe der Rindernebenniere mit einer geringeren Bandenintensität darstellt.

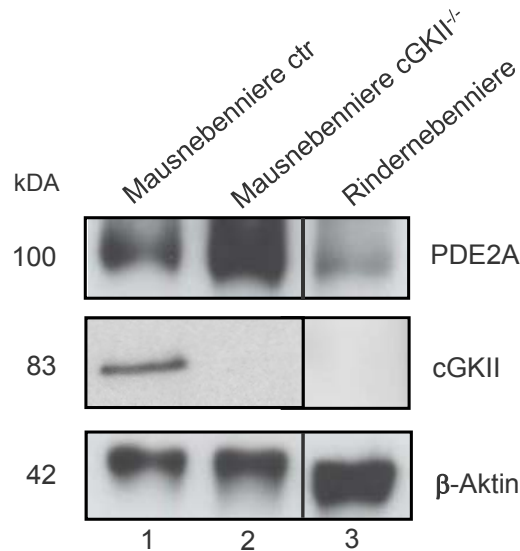


Abb. 5: Analyse der Proteinexpression von der cGKII und der PDE2A in der Maus- und Rindernebenniere. Gezeigt ist ein Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Mausnebennieren- und Rindernebennierengewebe der mit spezifischen Antikörpern gegen cGKII bzw. PDE2A immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde. In den Spuren 1 und 2 handelt es sich um Mausnebennierengewebe eines Kontrolltieres und Nebennierengewebe einer cGKII^{-/-}-Mausmutante. In Spur 3 ist das Nebennierengewebe eines Rindes aufgetragen. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Links ist die Größe des Molekulargewichts angegeben. β-Aktin diente als Ladungskontrolle.

3.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen an der Nebenniere der Maus

Durch immunhistochemische Analysen konnte die Lokalisation des cGKII-Proteins in der Nebenniere verifiziert werden. Die immunhistologische Färbung von der Kontrollnebenniere im Vergleich zu der cGKII^{-/-}-Nebenniere zeigte, dass das cGKII-Protein in der Zona glomerulos der Nebenniere exprimiert wird (braune Färbung; Abb. 6).

Bei den immunhistochemischen Analysen wurde jeweils das Nebennierengewebe der Kontrolle und der cGKII^{-/-}-Mausmutante parallel gefärbt, um gleiche Inkubationsbedingungen zu gewährleisten. Die Nebenniere der cGKII^{-/-}-Mausmutante in Abbildung 6 zeigt dabei keine Braunfärbung in der Zona glomerulosa. Die bei dieser Abbildung auftretende Braunfärbung des umliegenden Gewebes ist eine unspezifische Reaktion des polyklonalen cGKII-Antikörpers.

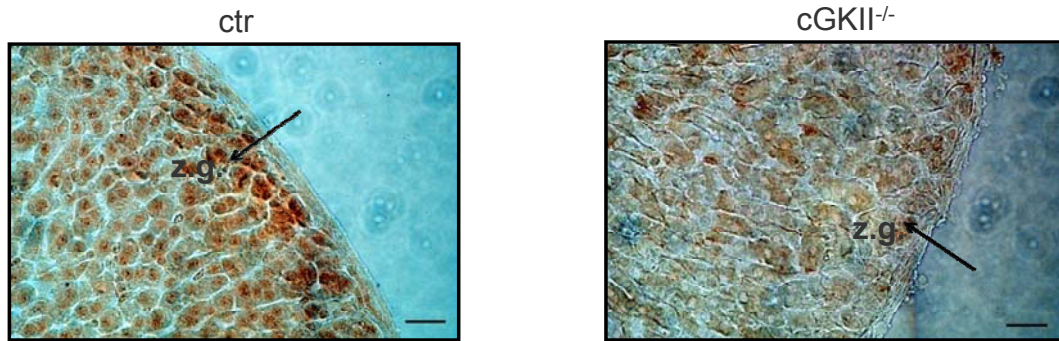


Abb. 6: Analyse der Proteinexpression von der cGKII in der Nebenniere der Maus. Gezeigt ist die immunhistochemische Färbung eines Querschnitts durch die Nebenniere einer Kontrollmaus (links) und einer Nebenniere aus einer cGKII^{-/-}-Mausmutante (rechts) jeweils 7 µm dick. Die Paraffinschnitte wurden mit spezifischen Antikörpern gegen cGKII immundekoriert und mittels POD-konjugierten sekundären Antikörpern, dem ABC-Vectastain Kit und DAB gefärbt. Die Balkenlänge entspricht 40 µm. Die Pfeile deuten die Zona glomerulosa an.

3.1.3 Physiologische Analysen des Aldosteron- und Reninspiegels in der Maus

Die Regulation der Aldosteronproduktion wird zum Einen durch Angiotensin II und zum Anderen über das adrenocorticotropes Hormon (ACTH) gesteuert.

Aufgrund dessen war der nächste Schritt, die basalen Plasmareninkonzentrationen in der Kontrollmaus und in der cGKII^{-/-}-Mausmutante zu bestimmen.

Dafür wurde jeweils acht Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und anschließend abzentrifugiert (siehe 2.6.2). Die Plasmareninkonzentration wurde mittels eines RIA gemessen. Bei der Messung wurde die Angiotensin I-Konzentration bestimmt, diese ist proportional zu Renin.

Die Abbildung 7 zeigt die Plasmareninkonzentration von jeweils acht Kontroll- und cGKII^{-/-}-Mäusen. Die Plasmareninkonzentration befand sich sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den cGKII^{-/-}-Mausmutanten im Normalbereich ($87,9 \pm 13,1$ und $92,2 \pm 19,0$ ng/h · ml Angiotensin I). Die Mittelwerte waren nicht signifikant verschieden.

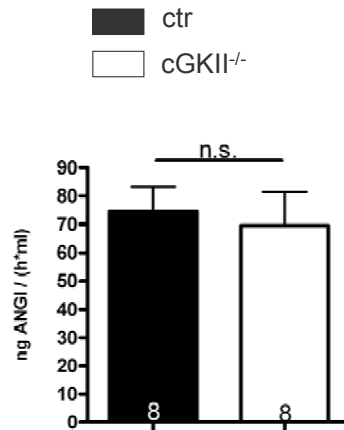


Abb. 7: Analyse der Plasmanreninkonzentration aus der Nebenniere der cGKII Knockout Mäuse. Gezeigt ist die Plasmanreninkonzentration von jeweils acht Kontrolltieren (ctr) und cGKII^{-/-}-Mausmutanten. Die Säulen stellen den Durchschnittswert mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test; n.s.=nicht signifikant.

Das Steroidhormon ACTH sorgt ebenfalls für eine Erhöhung des Aldosteronspiegels. Es bewirkt den Anstieg des cAMP-Spiegels und aktiviert somit die cAMP abhängige Proteinkinase. Der cAMP Spiegel wiederum wird u.a. durch cGMP reguliert, da die Bindung von cGMP an die PDE2 zu einer vermehrten Hydrolyse von cAMP führt.

Dadurch kann cGMP die Wirkdauer von cAMP-vermittelten Effekten terminieren und somit einen negativen Effekt auf die Aldosteronsekretion ausüben.

Das Peptidhormon ANP wirkt über die intrazelluläre cGMP-Erhöhung und anschließende Aktivierung der PDE2 der cAMP-vermittelten Freisetzung von Aldosteron entgegen.

Experimente an isolierten Glomerulosazellen der Rattennebeniere wiederum haben ergeben, dass eine Aktivierung der cGKII eine Erhöhung der Aldosteronsekretion zur Folge hat, da es die Phosphorylierung des „stereogenic acute regulatory“ (StaR) Protein bewirkt (Gambaryan et al., 2003).

Um diese entgegengesetzten Effekte genauer zu analysieren, wurde zunächst die basale Plasmaaldosteronkonzentration in der Kontrollmaus und in der cGKII^{-/-}-Mausmutante bestimmt. Die Mäuse, die für dieses Experiment bestimmt waren, wurden eine Woche zuvor einzeln in die Käfige gesetzt, um gleiche Stressbedingungen für jede einzelne Maus zu gewährleisten.

Nach einer Woche wurden Kontrollmäusen und cGKII^{-/-}-Mausmutanten Blut aus der Schwanzvene entnommen, anschließend abzentrifugiert und mittels RIA die Aldosteronkonzentration bestimmt.

Diese lag im Normalbereich ($371,0 \pm 43,2$ und $488,0 \pm 218,9$ pg/ml Aldosteron) und es konnte im Vergleich beider Genotypen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, obgleich die cGKII^{-/-}-Mausmutante eine leichte Tendenz zu höherem Wert zeigt (Abb.8).

Anschließend wurde beiden Mauslinien 10 mg ACTH · kg⁻¹ intraperitoneal injiziert und nach 30 min. erneut Blut über die Schwanzvene entnommen. Die Zeit von 30 min. wurde gewählt, da zuvor ermittelt wurde, dass nach 30 min. die maximale Aldosteronsekretion stattfindet (Spiessberger et al., 2009). Die Aldosteronbestimmung mittels eines RIAs zeigte einen hochsignifikanten Anstieg der Aldosteronkonzentration im Vergleich zu den Basalwerten. Auch hier zeigte die cGKII^{-/-}-Mausmutante im Vergleich zu Kontrolltieren eine Tendenz zu höheren Werten ($1766 \pm 112,7$ und $2186 \pm 250,2$ pg/ml Aldosteron.) Zwischen den beiden Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Die intraperitoneale Injektion von 10 mg ANP · kg⁻¹ in Kontrolltiere und cGKII^{-/-}-Mausmutanten ergab Werte, die sich nicht signifikant von den Basalwerten unterschieden ($521,5 \pm 193,5$ und $624,8 \pm 216,3$ pg/ml Aldosteron).

Um die zuvor erläuterten kontroversen Einflüsse von ANP und ACTH zu analysieren, wurden nun ACTH und ANP zeitgleich injiziert und erneut nach 30 min. Blut aus der Schwanzvene von Kontrolltieren und cGKII^{-/-}-Mäusen entnommen. Die Bestimmung der Aldosteronkonzentration ergab eine signifikante Verminderung der Aldosteronkonzentration in den Kontrolltieren verglichen mit den Werten nach alleiniger ACTH Injektion ($1032 \pm 182,7$ und $1700 \pm 244,0$ pg/ml Aldosteron). Im Bezug auf die basale Plasmaaldosteronkonzentration ($371,0 \pm 43,2$ und $488,0 \pm 218,9$ pg/ml Aldosteron) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Bei den cGKII^{-/-}-Mausmutanten war allerdings kein signifikanter Unterschied zu der alleinigen ACTH-Injektion zu detektieren ($2186 \pm 250,2$ und $1700 \pm 244,0$ pg/ml Aldosteron), sodass sich daraus schließen lässt, dass ANP keinen Einfluss auf die ACTH stimulierte Aldosteronsekretion hat, wenn das cGKII-Gen inaktiviert ist. Verglichen mit der basalen Plasmaninkonzentration ergibt sich hier ein signifikanter Anstieg der Aldosteronkonzentration (siehe Abb. 8).

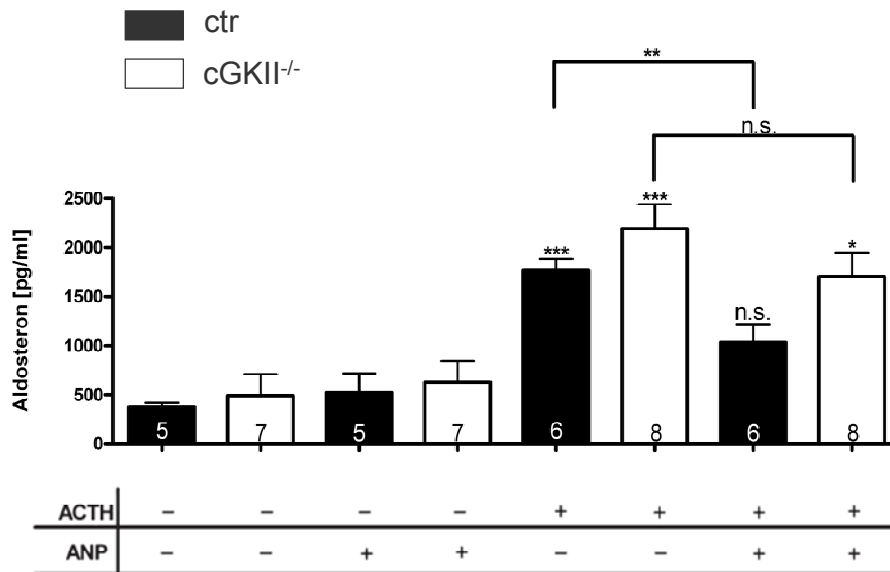


Abb. 8: Analyse der Plasmaaldosteronkonzentration der cGKII^{-/-} Mäuse. Gezeigt sind Mittelwerte der Plasmaaldosteronkonzentrationen von jeweils fünf bzw. sechs Kontrolltieren (ctr) und sieben bzw. acht cGKII^{-/-}-Mausmutanten. Die Tabelle unterhalb zeigt an, ob ANP, ACTH bzw. beides oder keines der beiden intraperitoneal injiziert wurde. Die Säulen stellen den Durchschnittswert mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Signifikanzgrenzen: n.s.=nicht signifikant; * P <0,05; ** P <0,01 und *** P <0,001.

Um auszuschließen, dass die cGKII die Angiotensin stimulierte Aldosteronsekretion beeinflusst, wurden sechs Kontrolltiere und elf cGKII^{-/-}-Mausmutanten sieben Tage lang mit einer speziellen Niedrigsalz-Diät (0,002% Na⁺) gefüttert. Eine weitere Kohorte von vier Kontrolltieren und vierzehn cGKII^{-/-}-Mausmutanten wurden mit einer Normaldiät (0,27% Na⁺) gefüttert. Anschließend wurde beiden Gruppen das Diuretikum Furosemid (40 mg·kg⁻¹) injiziert. Dies wurde von Herrn Dr. Herrmann (Institut für Pharmakologie, TUM) durchgeführt. Der Aldosteronspiegel verachtfachte sich in beiden Gruppen, wobei auch hier die cGKII^{-/-} Mäuse eine Tendenz zu höheren Aldosteronwerten aufwiesen (0,4621 \pm 0,072 ng/ml und 0,3888 \pm 0,1208 ng/ml Aldosteron bei Normaldiät und Niedrigsalz-Diät 2,435 \pm 0,3104 und 3,432 \pm 0,8943) (siehe Abb.9A und B). Im Vergleich beider Genotypen konnte aber kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Damit zeigt sich, dass bei einer Normalen- bzw. Niedrigsalz-Diät die Deletion der cGKII keinen Einfluss auf die Renin- und Aldosteronsekretion hat.

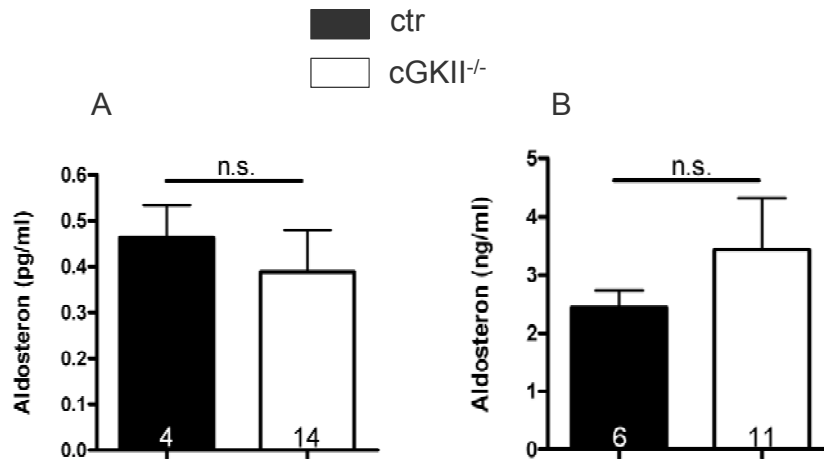


Abb 9: Analyse der Plasmaaldosteronkonzentration der cGKII^{-/-} Mäuse. Gezeigt sind Mittelwerte der Plasmaaldosteronkonzentrationen von jeweils vier bzw. sechs Kontrolltieren (ctr) und vierzehn bzw. elf cGKII^{-/-}-Mausmutanten. A zeigt die Plasmaaldosteronkonzentration noch einer Fütterung mit Normaldiät (0,27% Na⁺), B zeigt die Plasmaaldosteronkonzentration nach einer Fütterung mit einer Nidrigsalz-Diät (0,002% Na⁺). Die Säulen stellen den Durchschnittswert mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Signifikanzgrenzen: n.s.=nicht signifikant.

Telemetrische *in vivo* Blutdruckmessungen, die von Herrn Dr. Bernhard (Institut für Pharmakologie, TUM) durchgeführt wurden, zeigten, dass die Blutdruckwerte sich im Normalbereich befanden und kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden konnte (Abb. 10).

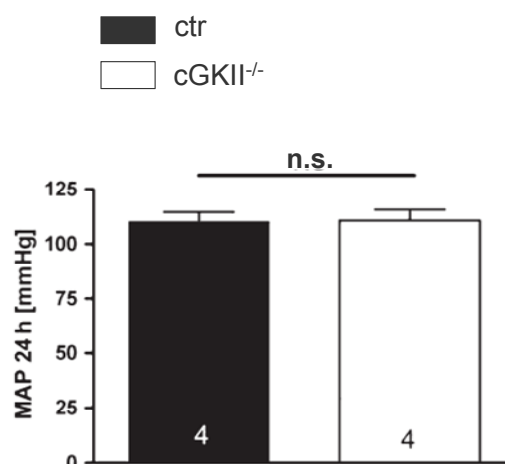


Abb. 10: Statistische Auswertung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) wacher sich frei bewegender Kontroll- und cGKII^{-/-}-Mäusen (jeweils n=4). Die Messung erfolgte 24 h telemetrisch *in vivo*. Die Säulen stellen den Durchschnittswert mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Signifikanzgrenzen: n.s.=nicht signifikant.

3.2 Die Rolle der cGKI α und cGKI β für die duodenale Bikarbonatsekretion

3.2.1 Morphometrische Analysen des Duodenum von Kontrolltieren, cGKI-defizienten Tieren und cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten

Die protoneninduzierte Bikarbonatsekretion schützt das Duodenum vor Säureschäden. Der Signalweg der säurestimulierten Bikarbonatsekretion ist noch nicht vollständig verstanden, eine Beteiligung des CFTR-Kanals wurde aber bereits nachgewiesen (Singh et al., 2008). Dieser Kanal kann über Signalwege, an denen cGMP-abhängige Proteinkinasen beteiligt sind, aktiviert werden (Giannella, 1995). Es wurde bereits gezeigt, dass die cGKI an der Aktivierung des CFTR-Kanals beteiligt ist, jedoch manifestierte sich kein duodenaler Phänotyp in cGKI-defizienten Mäusen (Pfeifer et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist die Rolle der cGKI für die säurestimulierte Bikarbonatsekretion unklar. Einen wichtigen Hinweis auf eine Beteiligung der cGKI an diesem Mechanismus zeigte die Analyse cGKI-defizienter Mausmodelle, die ein massives duodenales Ulkus und ein vergrößertes Duodenum aufweisen. Die Bedeutung des cGKI-Signalweges wird durch die Ergebnisse von Holm und Sugamoto et al (Holm et al., 2001; Sugamoto et al., 2001) gestützt, die zeigten, dass Stickstoffmonoxid (NO) in Ratten Bikarbonatsekretion stimuliert. Da NO die Bildung von cGMP vermittelt, die wiederum eine Aktivierung der cGKI zur Folge haben kann, liegt die Vermutung nahe, dass eine gestörte Bikarbonatsekretion eine entscheidende Rolle bei der Ulkuserstehung spielt.

Um dies zu überprüfen wurde zunächst das Ausmaß der Duodenumproliferation von Kontrollen und cGKI-genmanipulierten Mäusen morphometrisch analysiert. Hierfür wurden histologische Schnitte von je drei Duodeni von 20 Wochen Kontrolltieren, 20 Wochen alten cGKI α - bzw. cGKI β -Rescue Mäusen und sechs Wochen alten cGKI $^{-/-}$ -Mäusen H&E gefärbt (siehe 2.6.4). In Abbildung 11 ist eine exemplarische Färbung für jeden Genotyp gezeigt. Die statistische Auswertung (Abb. 11 E) von jeweils 24 einzelnen Duodenalschnitten aus jeweils drei Tieren ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und cGKI $^{-/-}$ -Tieren (ctr $0,66 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ und cGKI $^{-/-}$ $1,06 \pm 0,08 \text{ mm}^2$). Die cGKI $^{-/-}$ -Mäuse haben ein Duodenalulkus (11 A und B), (Dr. Lukowski, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TUM). Die cGKI α - und cGKI β -rescue Mäuse hingegen zeigen eine massive Gewebhypertrophie, der sich bei den cGKI β -rescue Mäusen bereits in einem Ulkus manifestierte (siehe Abb. 11 C und D, Pfeil). Desweiteren hatten die cGKI α - und cGKI β -rescue Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren eine hochsignifikante Vergrößerung der Durchschnittsfläche (ctr $0,66 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ und cGKI α $2,02 \pm 0,47 \text{ mm}^2$ bzw. cGKI β $1,53 \pm 0,13 \text{ mm}^2$). Die cGKI α - und cGKI β -rescue Mäuse zeigen im Vergleich zueinander keinen signifikanten Unterschied (Abb. 11 E).

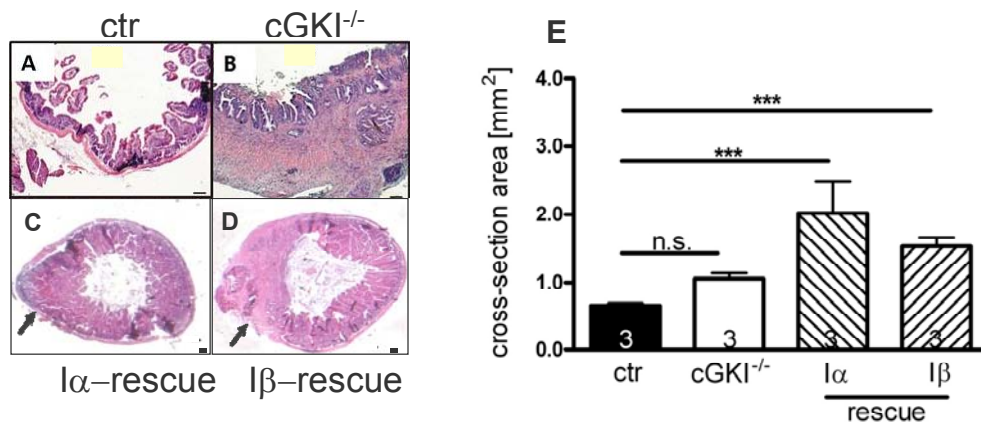


Abb. 11: Morphometrische Analyse der Duodeni. (A) Representative H&E-Färbungen der Duodeni von Kontrolle (ctr), (B) cGKI^{-/-}, (C) cGKI α - (I α -rescue) und (D) cGKI β -rescue (I β -rescue) Maus sind gezeigt. Die Pfeile deuten auf ein manifestes Ulkus hin. (E) Statische Auswertung der morphometrisch vermessenen Duodeni (n = 3 je Genotyp). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Maßstab 10 μ m; Signifikanzgrenzen: n.s. = nicht signifikant; und *** p < 0,001.

Ein positiver Hämokult-Test bei allen cGKI-Mausmutanten bestätigte die massiven Ulzera. Die pH-Werte in den Mägen der Tiere dagegen waren unverändert. Diese lagen bei den ctr sowie den cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten bei pH 2,5.

3.2.2. Kaplan-Meier Überlebenskurve von Kontrolltieren und cGKI-defizienten Tieren nach Verabreichung von Protonenpumpeninhibitoren

Um zu überprüfen, ob die Ulzeraentstehung für die verminderte Lebenserwartung der cGKI^{-/-}-Mäuse auf eine verminderte Säurepufferung zurückzuführen ist, wurden den unterschiedlichen Genotypen Protonenpumpeninhibitoren im Futter verabreicht. Diese sorgen für eine unterdrückte Magensäureproduktion, indem sie die H⁺/K⁺-ATPase (Protonenpumpe) in den Belegzellen des Magens hemmen. Die Lebenserwartung cGKI-defizienter Mäuse mit (n=23) und ohne (n=12) Behandlungen mit Protonenpumpeninhibitoren (Esomeprazol, 8 mg/kg Futter) wurde mit Kontrolltieren (n=42), die ebenfalls PPIs erhielten, verglichen. Die daraus ermittelte Überlebenskurve ist in Abb. 12 dargestellt.

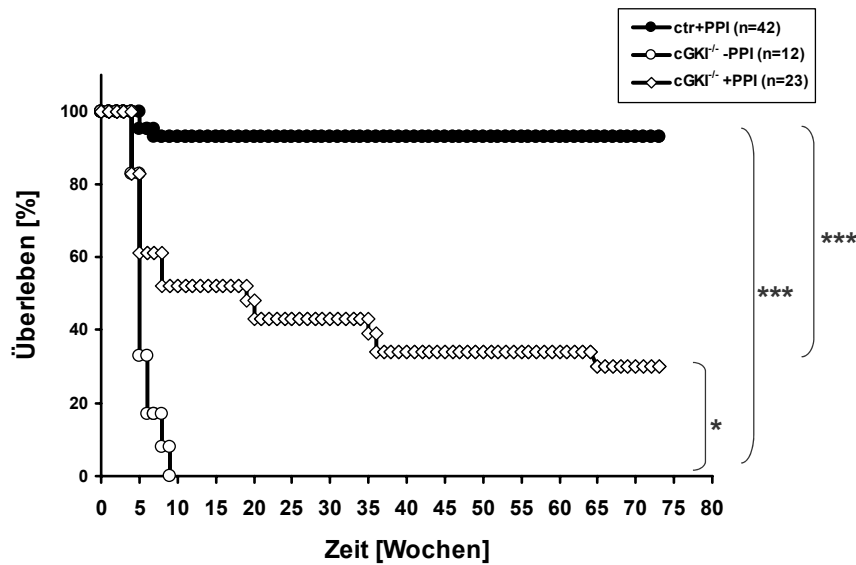


Abb. 12: Kaplan-Meier Überlebenskurve. Verglichen wurden cGKI^{-/-}- Mäuse mit Kontrolltieren (n=42). Eine Kohorte, sowie die Kontrolltiere (n=42, ●+PPI) bekamen Futter mit Protonenpumpeninhibitoren (Esomeprazol, 8 mg/kg Futter) (n=23, ○+PPI), die andere Kohorte bekam normales Zuchtfutter (Fa. Altromin) (n=12). Die Überlebenskurven der cGKI^{-/-}- Mäuse, die mit PPI behandelt wurden (n=23) verlaufen hochsignifikant unterschiedlich zu den cGKI^{-/-}- Tieren ohne Behandlung (n=12, ○-PPI). Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels des log-rank-Tests. Signifikanzgrenzen: * p < 0,05 und *** P < 0,001.

Bereits zwei Wochen nach der Geburt verstarben die ersten cGKI^{-/-}- Mäuse in beiden Kohorten. Nach neun Wochen war keine cGKI^{-/-}- Maus mehr mit normaler Fütterung am Leben. Signifikant unterschiedlich verlief die Überlebenskurve der cGKI^{-/-}- Mäuse, die mit PPI behandelt wurden. Innerhalb der ersten Woche starben 40% der cGKI^{-/-}-Nachkommen von mit PPI behandelten Müttern. Esomeprazol wird praktisch nicht in die Muttermilch sezerniert (Plante et al., 2004). Sieben von 23 cGKI^{-/-}-Mäusen erreichten die 75. Behandlungswoche. Bei den behandelten Kontrolltieren verstarben 3 innerhalb der ersten sechs Wochen nach der Geburt, die restlichen 37 Tiere waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit ebenfalls noch am Leben.

Dennoch ist im Vergleich der cGKI^{-/-}- Tiere mit den Kontrollmäusen ein hochsignifikanter Unterschied in der Überlebensspanne zu verzeichnen. Dieser hochsignifikante Unterschied gilt auch für die cGKI^{-/-}- Mäuse ohne PPI-Behandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren.

3.2.3. Morphometrische Analysen des Duodenums von Kontrolltieren, cGKI-defizienten Tieren und cGKI β -rescue Mausmutanten nach Verabreichung von Protonenpumpen-Inhibitoren

Da die Behandlung mit PPI das Überleben der cGKI-defizienten Mäuse verlängern konnte (siehe Abb. 12) wurde nach achtwöchiger Behandlung das Ausmaß der Gewebehypertrophie bzw. des bereits vorhandenen Ulkuses von cGKI-defizienten Mäusen und I β -rescue Mausmutanten (stellvertretend für die Rescue-Mauslinie), sowie Kontrollmäusen morphometrisch erfaßt. Zusätzlich wurden auch I β -rescue Mausmutanten analysiert, die keiner PPI-Behandlung unterzogen wurden. Hierfür wurden je drei bzw. vier Duodeni von acht Wochen alten cGKI β -rescue Mausmutanten, Kontrolltieren und cGKI $^{-/-}$ -Mäusen histologisch verarbeitet, anschließend die Duodeni am Mikrotom in 8 μ m dicke Stücke geschnitten, einer HE-Färbung unterzogen und einzeln vermessen (siehe 2.6.4) Die Abbildung 13 zeigt beispielhaft jeweils einen Duodenalausschnitt einer jeden Mausmutante und des Kontrolltieres und die jeweilige statistische Auswertung der vermessenen Duodeni. Vermessen wurden jeweils ca. 24 einzelne Duodenalschnitte aus jeweils drei bzw. vier Tieren, wobei die Durchschnittsfläche der Duodeni der Kontrolltiere im Vergleich zu den cGKI $^{-/-}$ -Mausmutanten keinen signifikanten Unterschied zeigen (ctr $0,30 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ und cGKI $^{-/-}$ $0,36 \pm 0,02 \text{ mm}^2$). Die cGKI β -rescue Mausmutanten –PPI hingegen zeigen im Vergleich zur cGKI β -rescue Mausmutanten +PPI einen signifikanten Unterschied (cGKI β – PPI $0,49 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ und cGKI β +PPI $0,39 \pm 0,02 \text{ mm}^2$) mit deutlich erkennbarer Ulzeration (siehe Pfeil, Abb.13). Auch die cGKI β -rescue Mausmutanten –PPI zeigen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Vergrößerung der Durchschnittsfläche (ctr $0,30 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ und cGKI β -PPI $0,49 \pm 0,04 \text{ mm}^2$). Im Vergleich der Kontrolltiere mit den cGKI β -rescue Mausmutanten +PPI zeigte sich kein signifikanter Unterschied (ctr $0,30 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ und cGKI β +PPI $0,39 \pm 0,02 \text{ mm}^2$).

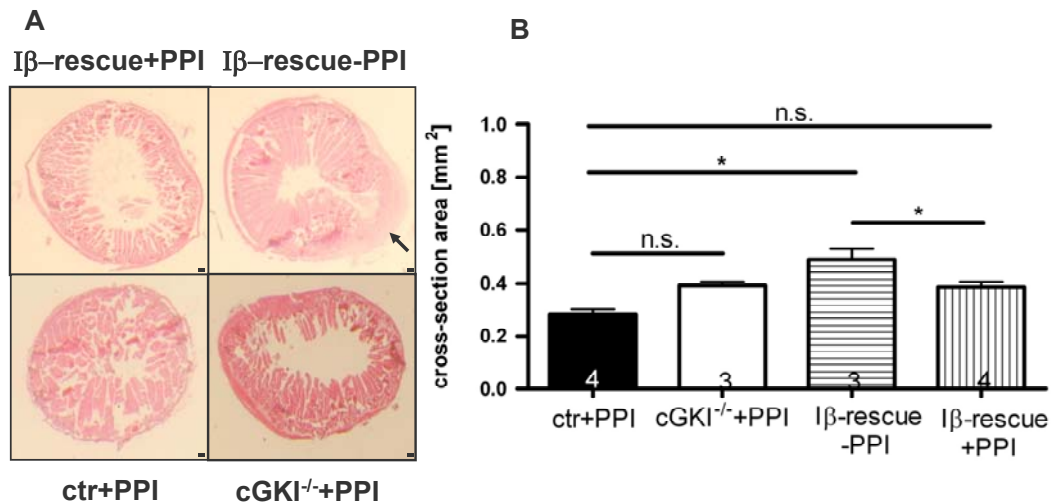


Abb. 13: Morphometrische Analyse der Duodeni. (A) Exemplarische Abbildung einer HE-Färbung je eines Duodenumquerschnitts von jeweils einem Kontrolltier +PPI, einer cGKI β -rescue Mausmutante +PPI, einer cGKI β -rescue Mausmutante -PPI und einer cGKI^{-/-}-Mausmutante+PPI. Der Pfeil deutet auf einen manifesten Ulkus hin. (B) Statische Auswertung der morphometrisch vermessenen Duodeni (jeweils drei bzw. vier Tiere). Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Maßstab 10 μ m; Signifikanzgrenzen: n.s.=nicht signifikant und * $p < 0,05$.

Mittels der Behandlung mit Esomeprazol konnte der pH im Magen der behandelten Mäuse auf ca. pH 5,3 gehoben werden (nicht gezeigte Daten). Dies hatte einen bedeutenden Einfluss auf das Ulzerationsgeschehen im Duodenum und wirkte der Entstehung eines Ulkuses und der Duodenalproliferation entgegen (siehe Abb. 13).

3.2.4 Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinasen im Duodenum

Um den pathologischen Befund der Gewebehypertrophie und der daraus resultierenden Ulzerationen genauer zu untersuchen, wurde zunächst das Expressionsmuster des cGKI α -, cGKI β -, des cGKI β - und des c-Kits-Proteins mit spezifischen Antikörpern im Gesamtextrakt des Duodenums analysiert. Hierfür wurde die Expression der jeweiligen Proteine in cGKI^{-/-}-Mäusen cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten und Kontrolltieren mittels Immunoblot analysiert. Der Thalamus diente als Positivkontrolle für das cGKI β Protein (Abb. 14).

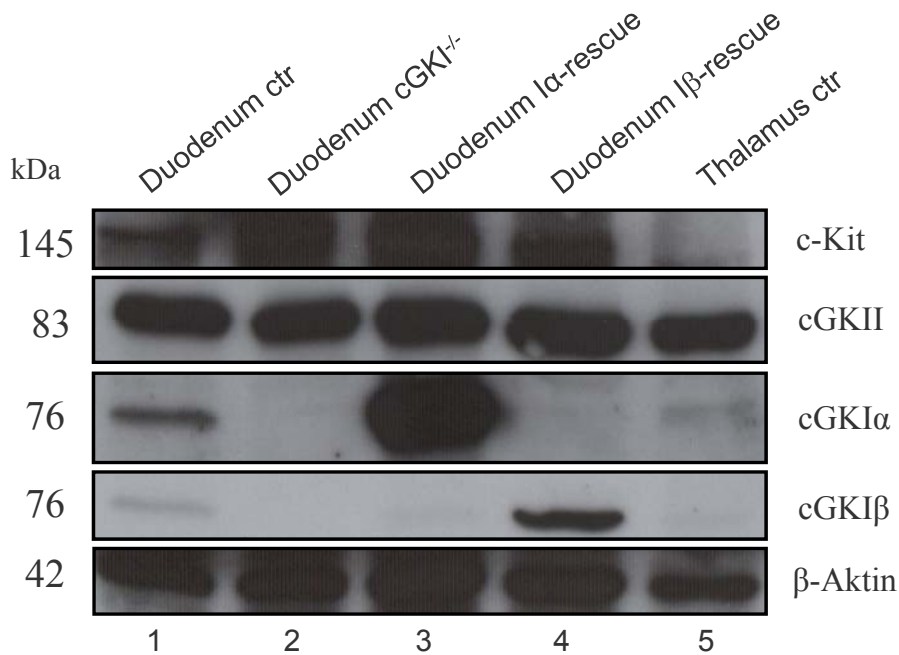


Abb. 14: Immunoblotanalyse der cGKI Isoformen, cGKII sowie cKit im Duodenum. Gezeigt ist ein Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Mausduodenum- und Thalamusgewebe, der mit spezifischen Antikörpern gegen cGKI α , cGKI β , cGKII und c-Kit immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde. In Spur 1 handelt es sich um Duodenealgewebe eines Kontrolltieres. In Spur 2 befindet sich Duodenealgewebe einer cGKI-defizienten Mausmutante. In Spur 3 und 4 ist das Duodenealgewebe einer cGKI α - bzw. cGKI β -rescue Mausmutante aufgetragen. Spur 5 zeigt das Thalamusgewebe eines Kontrolltieres. Es wurden jeweils 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Links ist die Größe des Molekulargewichts angegeben. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

Dabei zeigte sich, dass im Duodenum der Kontrolle sowohl die cGKI α - als auch die cGKI β -Isoform exprimiert wird, wohingegen in den cGKI α - und cGKI β -rescue Mäusen nur die zu erwartende Isoform, cGKI α im cGKI α -rescue, cGKI β im cGKI β -rescue detektierbar war. Die bereits von Weber et al. (Weber et al., 2007) beschriebene Überexpression der jeweiligen Isoform konnte bestätigt werden. Weder die cGKI α noch die cGKI β -Isoform konnte in den cGKI $^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen werden.

Das cGKII Protein war in allen analysierten Mausmodellen detektierbar. Hier zeigt sich kein Unterschied im jeweiligen Expressionslevels zwischen den einzelnen Genotypen. Der Thalamus diente hierbei als Positivkontrolle für die cGKII-Expression (Spur 5). Desweiteren erfolgte eine Detektion von c-Kit Protein in allen Mausmodellen (Spur 1-4). Das c-Kit Protein diente hierbei als Marker für die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC). Auch hier zeigten sich keine Unterschiede in der Bandenintensität zwischen den einzelnen Genotypen mit Ausnahme der ctr, wobei es sich hier um eine geringere Proteinladung handelte im Vergleich zu den anderen Genotypen.

3.2.5 Immunhistochemische Expressionsanalyse der cGKI im Duodenum der Maus

Die Immunoblot-Analysen zeigten bereits die Expression des cGKI-Proteins in der Kontrolle, allerdings ist hierbei keine Aussage möglich, in welchen Zellen des Duodenums die cGKI exprimiert wird. Durch immunhistochemische Analysen konnte die Lokalisation des cGKI-Proteins im Duodenum verifiziert werden. Sowohl im Duodenum der Kontrollen als auch im Duodenum der cGKI β -rescue Mäusen (stellvertretend für die Rescue-Mauslinie) war das cGKI-Protein in der Ring- und Längsmuskelschicht des Duodenums sowie in den Blutgefäßen der Villi exprimiert (braune Färbung; Abb. 15), wohingegen im cGKI-defizienten Duodenum keine Färbung detektiert werden konnte. Da die Blutgefäße der Villi aus glatter Muskulatur bestehen, läßt sich damit die Färbung in den cGKI β -rescue Tieren erklären. Um gleiche Inkubationsbedingungen zu gewährleisten wurden die Färbungen in allen Genotypen parallel durchgeführt und die Farbentwicklung (siehe M&M) zum selben Zeitpunkt gestoppt.



Abb. 15: Proteinexpression der cGKI im Duodenum der Maus. Gezeigt ist die immunhistochemische Färbung eines 8 μ m dicken Querschnitts des Duodenum einer Kontrollmaus (links), einer cGKI $^{-/-}$ -Mausmutante (mitte) und einer cGKI β -rescue Maus. Die Paraffinschnitte wurden mit spezifischen Antikörpern gegen cGKI (1:50) immundekoriert und mittels POD-konjugierten sekundären Antikörpern, dem ABC-Vectastain Kit und DAB gefärbt. Der Maßstab entspricht 40 μ m.

3.2.6 *In vivo* Bikarbonatmessungen an Kontrolltieren, cGKI-defizienten Mäusen und cGKI α - bzw. cGKI β -rescue Mausmutanten

Durch Bikarbonatsekretionsmessungen wurde die sezernierte Bikarbonatmenge nach Säurestimulation (HCl pH 2,5) *in vivo*, wie in 2.7 beschrieben in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Seidler (Hannover) gemessen, um das duodenale Bikarbonatpuffersystem zu untersuchen.

Abbildung 16 zeigt die *in vivo* Protonen-induzierte Bikarbonatmessungen an Kontroll- bzw. cGKI-defizienten Tieren, sowie an cGKI α - und I β -rescue Mausmutanten in $\mu\text{mol} / \text{cm}^2 / \text{h}$. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die cGKI-defizienten Mäuse als auch die I α - und I β -rescue Mausmutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren nach einem Säurestimulus nicht in der Lage sind eine adäquate Menge Bikarbonat zu sezernieren. Dieser Effekt ist auch bei der basalen Bikarbonatmessung zu sehen, wobei die Unterschiede der Bikarbonatkonzentrationen nicht signifikant sind.

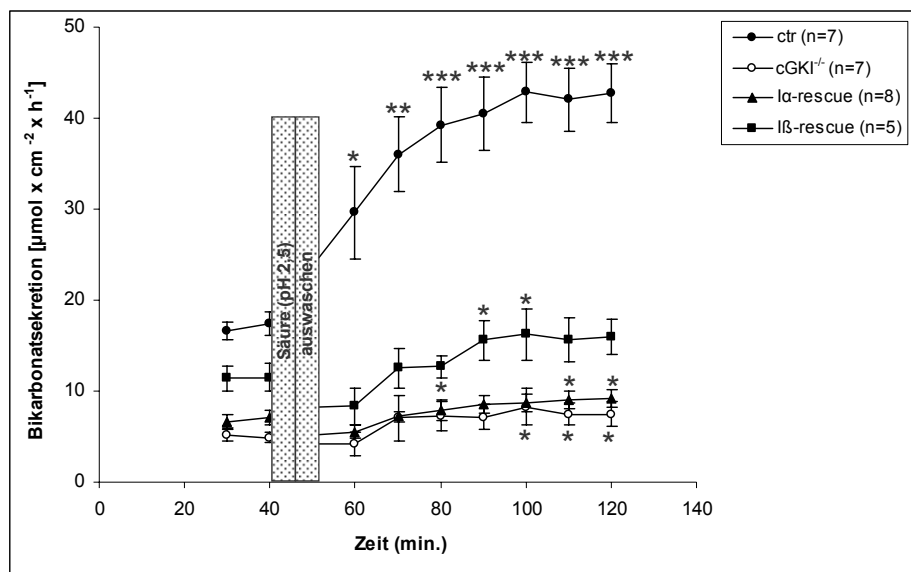


Abb. 16: Zeitverlauf der Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion in Kontrolltieren (●), cGKI^{-/-}- Tieren (○) sowie in cGKI α - (▲) -und I β -rescue (■) Mausmutanten (n=5-8). Die Säurestimulation sowie die Auswaschphase sind als Säulen dargestellt. Gezeigt sind die Durchschnittswert mit Standardfehler (\pm SEM). Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Signifikanzgrenzen: * p < 0,05; ** p < 0,01 und *** p < 0,001.

Um die Bikarbonatmenge jeweils genau zu erfassen zeigt die Abbildung 17 jeweils die maximale Bikarbonatsekretion nach 100 min.

Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die cGKI^{-/-}- Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren hochsignifikant weniger Bikarbonat freisetzen (ctr $27,6 \pm 2,66 \mu\text{mol} / \text{cm}^2 / \text{h}$ und cGKI^{-/-} $3,27 \pm 0,74 \mu\text{mol} / \text{cm}^2 / \text{h}$).

Der gleiche Effekt ist bei den cGKI α - und cGKI β -rescue Mausmutanten zu sehen (ctr $27,6 \pm 2,66 \mu\text{mol} / \text{cm}^2 / \text{h}$ und cGKI α $2,47 \pm 0,63 \mu\text{mol} / \text{cm}^2 / \text{h}$ bzw. cGKI β $6,64 \pm 1,76 \mu\text{mol} / \text{cm}^2 / \text{h}$). Im Vergleich zu den Kontrolltieren ist auch hier die Bikarbonatsekretion hochsignifikant verringert.

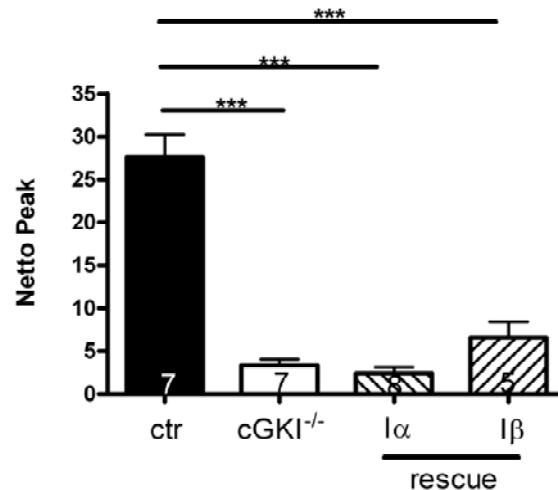


Abb. 17: Netto Peak der Protonen-induzierten Bikarbonatsekretionsmessung in Kontrolltieren, cGKI^{-/-} Tieren sowie in cGKI α –bzw. l β -rescue Mausmutanten. Gemessen wurde in $\mu\text{mol} \times \text{cm}^2 \times \text{h}^{-1}$. Die Säulen stellen den Mittelwert mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Signifikanzgrenzen:*** $p < 0,001$.

3.2.7 Immunfluoreszenzanalysen der cGKI und nNOS-Koexpression im Duodenum der Maus

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten die Expression der cGKI sowohl in der Ring- als auch in der Längsmuskelschicht des Duodenums. In dieser Glattmuskelschicht befinden sich auch nicht-glattmuskuläre Zellen, wie die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC). Die ICCs sind ein wichtiger Mediator der exzitatorischen cholinergen und inhibitorischen nitrinergen Neurotransduktion. Um zu überprüfen, ob das cGKI-Protein in diesen Zellen exprimiert wird, wurden hoch-auflösende Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen cGKI und den Cajalzellenmarker nNOS durchgeführt. Diese Analysen zeigten weder in den Cajalzellen der Kontrollen noch in Cajalzellen der cGKI^{-/-}, cGKI α - und cGKI β -rescue Tieren eine Koexpression der cGKI mit nNOS. Wiederum war nur in den Kontrollen, den cGKI α - und den cGKI β -rescue Mäusen das cGKI-Protein in der Längs- und Ringmuskelschicht detektierbar, wohingegen in keiner der beiden Schichten das cGKI-Protein in den cGKI-defizienten Mäusen nachzuweisen war (Abb. 18).

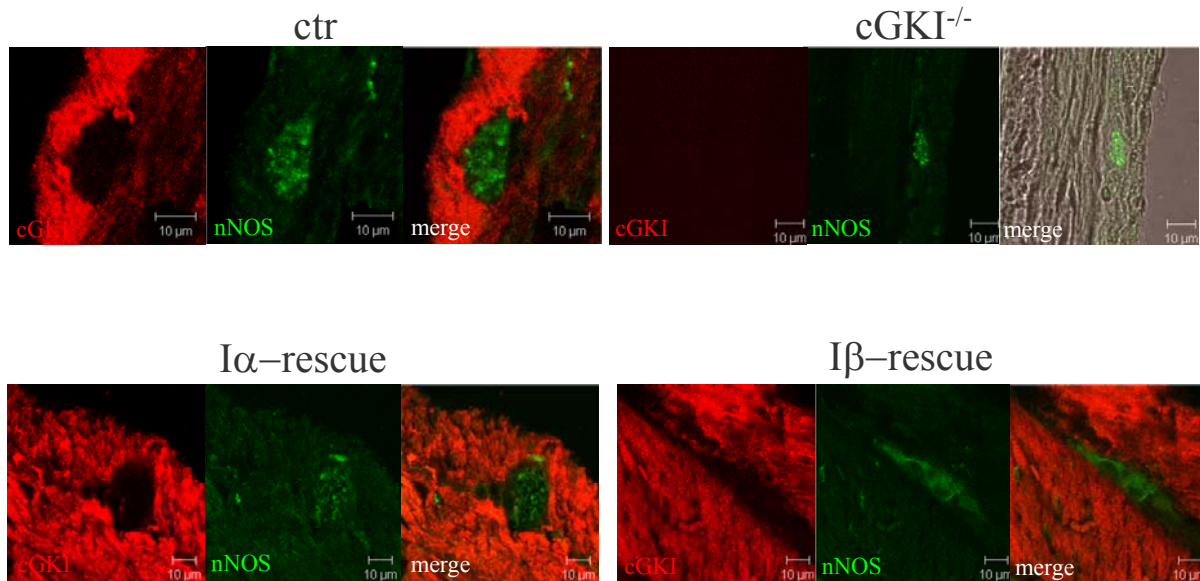


Abb. 18: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von cGKI und nNOS im Duodenum. Die rote Färbung ist der Nachweis für die cGKI, die grüne Färbung für nNOS. Eine Kofärbung war weder in der Kontrolle noch in $cGKI^{-/-}$, $cGKI\alpha$ - und $cGKI\beta$ -rescue Tieren detektierbar. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

3.2.8 RT-PCR-Analysen von beteiligten Bikarbonatsekretionstransportern und *in vivo* Bikarbonatmessungen

Die immunhistochemischen Färbungen lassen auf eine Funktion der cGKI im Duodenum schließen und geben erste Hinweise auf eine mögliche funktionale Beteiligung der cGKI an der Bikarbonatsekretion. Um den möglichen Signalweg der cGKI im Duodenum aufzuklären, wurden die Expressionslevel von in der Literatur beschriebenen Bikarbonatsekretionstransportern mittels RT-PCR analysiert. Unter anderem sind der CFTR- Kanal sowie Transporter der Scl26a Familie an der säurestimulierten Bikarbonatsekretion beteiligt. Aufgrund dessen wurde das Expressionslevel von Sekretin, Na^+/H^+ Austauscher 1 und 3 (NHE 1+3), Anionen-Austauscher 2 (AE 2), Karboanhydrase II (CAII), Cyclooxygenase I und II (COXI+II), Prostaglandin E_2 -Synthase (PGE_2 -S), Prostaglandin E Rezeptor (EP3), Chlorid-Bikarbonat-Austauscher 26A3 (DRA; SLC26A3) und 26A6 (PATI; SLC26A6), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) und Transient receptor potential channel VI (TrypVI) mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert.

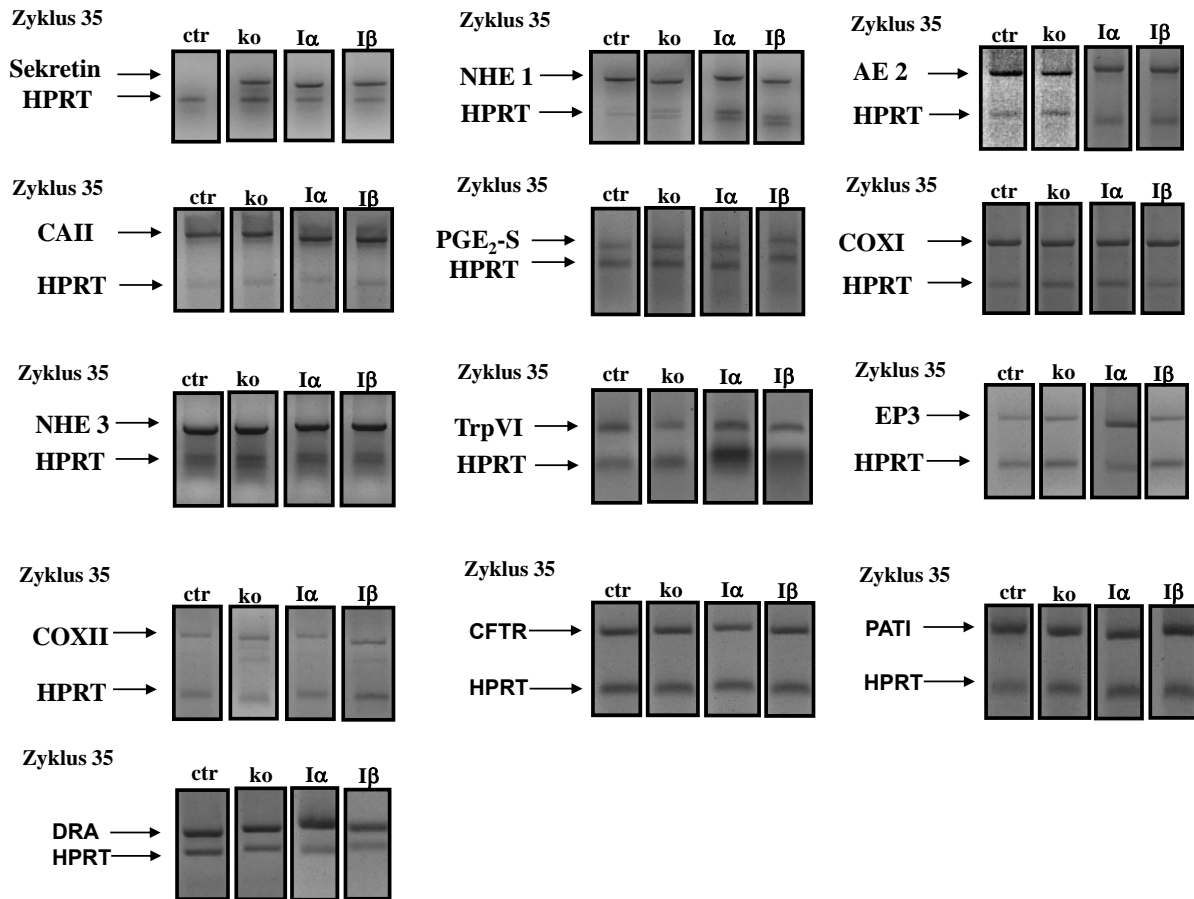


Abb. 19: Semi-quantitative RT-PCR-Analysen von Sekretin, NHE 1, AE 2, CAII, PGE₂-S, COXI, NHE3, TrpVI, EP3, COXII, CFTR, PATI und DRA. Gezeigt ist jeweils der 35. Entnahmezyklus von Gesamtduodenal RNA einer Kontrolle einer cGKI-defizienten Maus sowie einer cGKI α - bzw. cGKI β -rescue Maus. HPRT wurde als interne Kontrolle koamplifiziert. Gezeigt ist jeweils exemplarisch 1 von 3 Ansätzen.

Abbildung 19 zeigt mit Ausnahme von Sekretin bei allen weiteren analysierten Proteinen nach 35 Zyklen keinen Unterschied in der Bandenintensität zwischen den analysierten Genotypen. Die mRNS-Spiegel für Sekretin waren in allen cGKI-genveränderten Mäusen um das Fünffache hochreguliert. Diese Bande ist bei den Kontrolltieren im äquivalenten Entnahmezyklus nicht vorhanden.

Es wird in der Literatur diskutiert, dass die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion über den Nervus vagus reguliert wird (Ballesteros et al., 1991; Jonson et al., 1986). Diese Vermutung wurde durch die Ergebnisse einer Protonen-induzierten Bikarbonatsekretionsmessung nach der bilateralen subdiaphragmären Vagotomie von Kontrollmäusen unterstützt (Abb. 20). Dabei kam es zu einer hochsignifikanten Verminderung der Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion (ctr $286,9 \pm 13,9\%$; ctr Vagotomie $180,8 \pm 13,9\%$). Die basale Bikarbonatsekretion hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied (ctr $104,3 \pm 3,2\%$; ctr Vagotomie $94,6 \pm 5,9\%$).

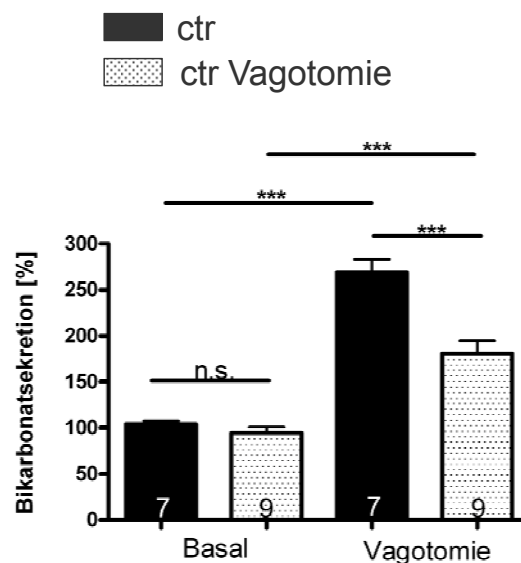


Abb. 20: Basale und Protonen-induzierten Bikarbonatsekretionsmessung nach einer bilateralen subdiaphragmären Vagotomie in Kontrollmäusen. Die Säulen stellen den Mittelwert mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Signifikanzgrenzen: n.s.=nicht signifikant; *** $p < 0,001$.

Dieser Effekt wurde weiterhin untersucht, indem bei Kontrolltieren und $cGKI^{-/-}$ Mäusen nach bilateralen subdiaphragmären Vagotomie der subdiaphragmäre Nervus Vagus mittels elektrischer Feldstimulation (EFS) stimuliert und anschließend die Bikarbonatsekretion in Kontrolltieren und $cGKI^{-/-}$ Mäusen gemessen wurde. Zunächst wurde die Bikarbonatsekretion in Kontrolltieren und $cGKI$ -defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen gemessen. Hier kam es zu einem hochsignifikanten Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den $cGKI$ -defizienten Mäusen (ctr $100 \pm 0,0\%$ und $cGKI^{-/-}$ $67,4 \pm 1,2\%$).

Die basale Bikarbonatsekretion der Kontrolltiere wurde auf 100% gesetzt, unter der Annahme, dass es sich hierbei um eine vollständige Bikarbonatsekretionsantwort handelt.

Nach der subdiaphragmatischen Vagusstimulation mittels EFS kam es in beiden Genotypen zu einem Anstieg der Bikarbonatsekretion, sodass im Vergleich zu den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied zu erkennen war (ctr $128,7 \pm 4,6$ und cGKI^{-/-} $117,1 \pm 1,2\%$). Abbildung 21 zeigt die Bikarbonatsekretion unter basalen Bedingungen sowie während der EFS.

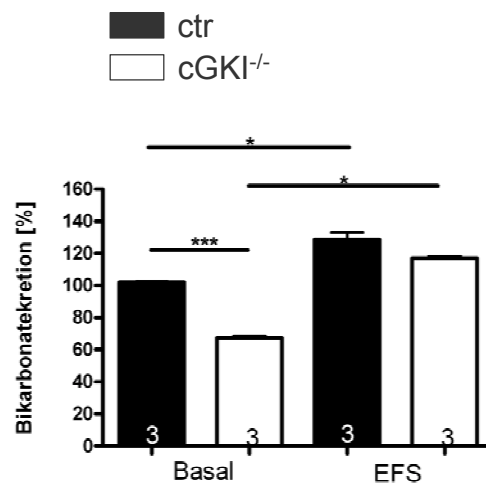


Abb. 21: Bikarbonatsekretion in Kontrolltieren und in cGKI-defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen und während elektrischer Feldstimulation (EFS) des subdiaphragmatischen Vagus. Die Säulen stellen den Durchschnittswert mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test. Signifikanzgrenzen: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Diese Versuche zeigten eindeutig, dass die Vagusaktivierung ein wesentlicher Faktor für die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion des Duodenums ist. Zwar konnten wir immunhistochemisch die Expression der cGKI nur in glatten Muskelzellen nachweisen, andererseits war es möglich das niedrige Konzentrationen von cGKI in Cajalzellen und Darmepithel vorhanden sind, durch die die Bikarbonatsekretion reguliert wird. Diese Möglichkeit wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Greten und Herrn PD. Dr. Saur, Klinikum rechts der Isar, untersucht. Beide Kollegen stellten uns Cre-Mauslinien zur Verfügung mit Hilfe derer das cGKI-Gen in Cajalzellen und Darmepithelzellen inaktiviert wurde (Singh et al. 2011). In diesen Mauslinien war die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion nicht verändert, sodass wir annehmen müssen, dass cGKI die Protonen-stimulierte Bikarbonatsekretion im Vagalschaltkreis beeinflusst.

3.2.9 Analyse der cGKI-Expression in der Medulla von Kontrolltieren, cGKI-defizienten Mäusen und cGKI α - bzw. cGKI β -rescue Mausmutanten

Wie oben gezeigt, wird die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion über den Nervus vagus mit reguliert. Da der afferente intestinale Vagus im Nucleus tractus solitarius (NTS) in der Medulla oblongata auf den efferente Vagusnerv geschaltet wird, wurde immunhistologisch untersucht, ob das cGKI-Protein im NTS exprimiert wird.

Abbildung 22 zeigt die immunhistochemische Analyse. Hierbei konnte die Lokalisation des cGKI-Proteins in der Medulla oblongata im NTS verifiziert werden. Die immunhistologische Färbung einer Kontrollmedulla im Vergleich zur cGKI Knockout Medulla zeigte, dass das cGKI-Protein im NTS der Medulla sowie im Trigeminaltrakt exprimiert wird (braune Färbung; Abb. 22).

Bei den immunhistochemischen Analysen wurde jeweils das Medullagewebe der Kontrolle und der cGKI^{-/-}-Mausmutante parallel gefärbt, um gleiche Inkubationsbedingungen zu gewährleisten. Die Medulla der cGKI^{-/-}-Mausmutante in Abbildung 22 zeigt dabei keine Braunfärbung im NTS und im Trigeminaltrakt.

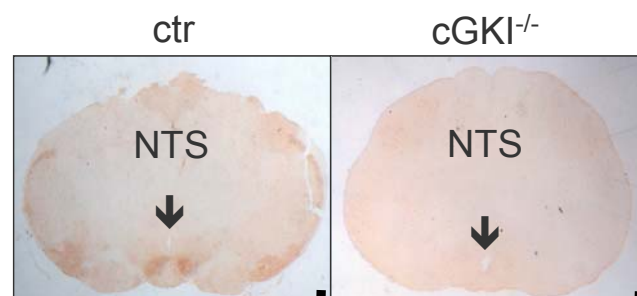


Abb. 22: Analyse der Proteinexpression von der cGKI in der Medulla oblongata der Maus. Gezeigt ist die immunhistochemische Färbung eines Querschnitts durch die Medulla oblongata einer Kontrollmaus (links) und einer cGKI-defizienten Maus (rechts), jeweils 8 μ m dick. Die Pfeile verweisen jeweils auf den NTS. Die Paraffinschnitte wurden mit spezifischen Antikörpern gegen cGKI (1:50) immundekoriert und mittels POD-konjugierten sekundären Antikörpern, dem ABC-Vectastain Kit und DAB gefärbt. Der Maßstab entspricht 40 μ m.

Durch Immunfluoreszenzanalysen wurde die Expression des cGKI-Proteins (rot) in den Neuronen des NTS untersucht.

Dafür wurden Paraffinschnitte einer Kontrollmedulla sowie einer cGKI^{-/-}- Medulla mit spezifischen Antikörpern gegen cGKI bzw. NeuN (mouse Anti-Neuronal Nuclei) und mit einem Cy2- bzw. Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper immundekoriert und mit einem konfokalen Lasermikroskop bei 630-facher Vergrößerung untersucht (Abb. 23).

Das Protein NeuN (grün) diente als Neuronenmarker. Bei der Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollmedulla konnte bei Überlappung der Bilder (merge) eine Gelbfärbung in den Neuronen des NTS detektiert werden. Dies war bei den Färbungen der cGKI Knockout Medulla nicht der Fall, da hier kein cGKI-Protein exprimiert wurde. Es zeigt sich lediglich eine Fluoreszenzfärbung der Neuronen (grün). Somit lässt sich in den Kontrollen eine Kolokalisation von cGKI und NeuN in den Neuronen des NTS nachweisen (siehe Abbildung 23).

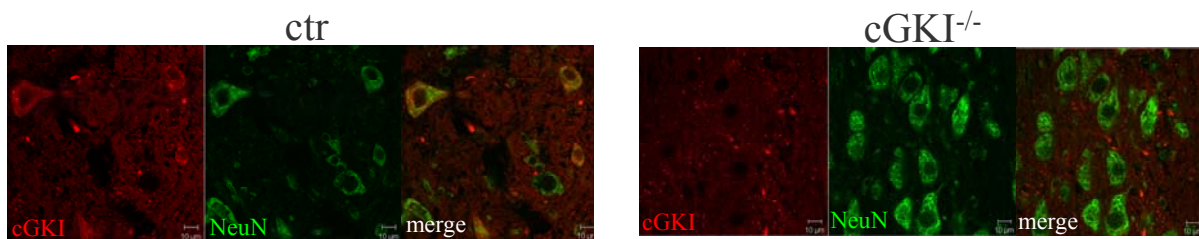


Abb. 23: Detektion der Proteinexpression von cGKI und NeuN in der Medulla im NTS mittels cGKI und NeuN-spezifischer primärer Antikörper und Cy3 bzw. Cy2 gekoppelter sekundärer Antikörper. Gezeigt ist der Querschnitt durch eine Medulla eines Kontrolltieres (cGKI/Cy3 bzw. NeuN/Cy2 und merge), und einer cGKI-defizienten Maus (cGKI/Cy3 bzw. NeuN/Cy2 und merge). Der Maßstab entspricht 10 µm.

Vorangegangene Untersuchungen von Travagli et al. und Baude et al. (Baude et al., 2009; Travagli et al., 2006), zeigen, dass unter anderem die Vagusregulation für den Gastrointestinaltrakt über glutamaterge Neuronen gesteuert werden. Aufgrund dessen wurde durch Immunfluoreszenzanalysen die Expression des cGKI-Proteins (rot) und des vesikulären Glutamattransporter Typ 2-Neuronen (vGLUT2) des NTS untersucht. Dafür wurden Paraffinschnitte einer Kontrollmedulla sowie einer cGKI-defizienten Medulla mit spezifischen Antikörpern gegen cGKI bzw. vGLUT2 mit einem Cy2- bzw. Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper immundekoriert und mit einem konfokalen Lasermikroskop bei 630-facher Vergrößerung untersucht (Abb. 24).

Das Protein vGLUT2 (grün) diente als Nachweis für das Vorkommen des vesikulären Glutamattransporter Typ 2- im NTS-Neuronen.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollmedulla konnte bei Überlappung der Bilder (merge) eine Gelbfärbung in den Neuronen im NTS detektiert werden. Dies war bei den Färbungen der cGKI Knockout Medulla nicht der Fall, da kein cGKI-Protein exprimiert wurde. Hier zeigt sich lediglich eine Fluoreszenzfärbung der vGLUT2 positiven Neuronen (grün). Somit lässt sich eine Kolokalisation von cGKI und vGLUT2 in den Neuronen des NTS der Kontrollen nachweisen (siehe Abbildung 24).

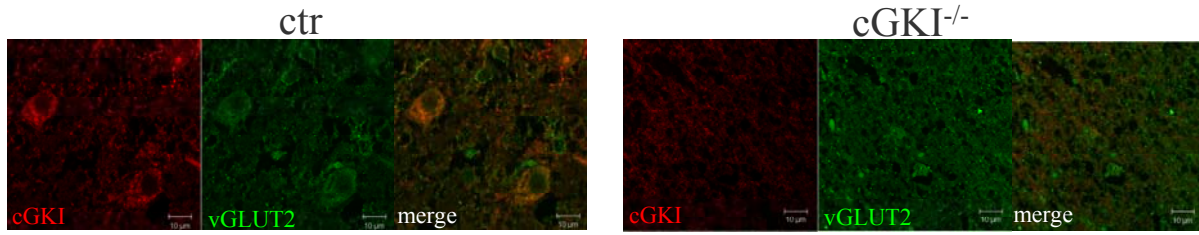


Abb. 24: Detektion der Proteinexpression von cGKI und vGLUT2 im NTS der Medulla mittels cGKI und vGLUT2-spezifischer primärer Antikörper und Cy3- bzw. Cy2- gekoppelter sekundärer Antikörper. Gezeigt ist der Querschnitt durch eine Medulla eines Kontrolltieres (cGKI/Cy3 bzw. vGLUT2/Cy2 und merge) und einer cGKI-defizienten Maus (cGKI/Cy3 bzw. vGLUT2/Cy2 und merge). Der Maßstab entspricht 10 µm.

4. Diskussion

4.1 Analyse der Funktion des cGKII-Proteins in der Mausnebenniere

Vorausgegangene Veröffentlichungen haben ergeben, dass die ACTH stimulierte Aldosteronsekretion in Rindernebnieren durch den ANP/cGMP Signalweg inhibiert werden kann. Diesem Mechanismus liegt eine Aktivierung der cGMP-abhängigen Phosphodiesterase 2 zugrunde, die eine Hydrolyse des cAMP bewirkt (MacFarland et al., 1991).

Darüberhinaus zeigten Experimente in einer weiteren Publikation (Gambaryan et al., 2003), dass eine Aktivierung der cGKII die Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der Rattennebniere über die Phosphorylierung des StaR Proteins stimuliert.

Dieser kontroverse Effekt von cGMP auf die ACTH-stimulierte Aldosteronsekretion wurde genauer analysiert (siehe Abb. 25).

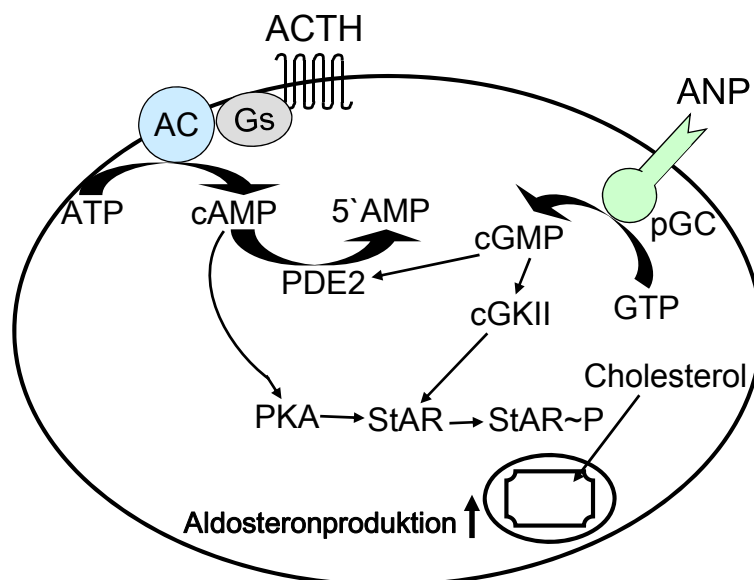


Abb. 25: Schema für die ACTH-abhängige Aldosteronsekretion. Weitere Erklärungen siehe Text.

Das cGKII-Protein wird in der Mausnebniere in der Zona glomerulosa exprimiert und unterstützt damit den Report, dass die cGKII in der Rattennebniere exprimiert wird (Gambaryan et al., 2003).

Allerdings hatte die Deletion des cGKII Proteins weder auf die basale, die Furosemid/Niedrigsalz-Diät, die Angiotensin II oder ACTH stimulierte Plasmaaldosteron -konzentrationen einen detektierbaren Effekt.

Lediglich die zeitgleiche Injektion von ACTH und ANP zeigte, dass in der cGKII^{-/-}-Mausmutante ANP keinen inhibitorischen Effekt auf die Aldosteronsekretion ausübte.

Dies bestätigte die Annahme, dass via den ANP/cGMP-Signalweg eine Aktivierung der cGKII in der Zona glomerulosa erfolgte und somit eine verminderte Aldosteronsekretion bewirkt wurde. Im Gegensatz zu den Ergebnissen um die Arbeitsgruppe Gambaryan et al. (Gambaryan et al., 2003), die eine Steigerung der Aldosteronsekretion durch die cGKII berichtet hatten, wurde bei zeitgleicher Gabe von ACTH und ANP die Aldosteronproduktion/sekretion inhibiert. Meine Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse von Mac Farland et al. und Nikolaev et al. (MacFarland et al., 1991; Mullis & Faloon, 1987; Nikolaev et al., 2005), dass durch die Erhöhung der cGMP-Konzentration eine Aktivierung der PDE2A stattfindet, die zur Verminderung der cAMP-Konzentration und somit auch zu einer Verminderung der ACTH stimulierten Aldosteronsekretion führt.

Überraschenderweise zeigte sich bei den cGKII^{-/-}-Mausmutanten keine Verminderung der ACTH stimulierten Aldosteronsekretion durch ANP. Der molekularbiologische Signalweg, durch den cGKII diesen Effekt auslöst, konnte nicht analysiert werden, da *in vivo* Experimente an isolierten Mäuseglomerulosazellen aufgrund der geringen Zellmenge und Größe nicht durchführbar sind.

Dieser Effekt der cGKII hat allerdings unter normalen Lebensumständen keinerlei Auswirkungen auf den Blutdruck, die Herzfrequenz oder auf die Plasmareninkonzentration der Maus. Die Deletion des cGKII-Proteins hat nur einen Einfluss auf die Regulation der Aldosteronsekretion *in vivo*, die aber nicht zu einer Änderung der Blutdruckregulation führen, obwohl gezeigt werden konnte, dass cGKII die Reninsekretion hemmt (Wagner et al., 1998).

Diese Ergebnisse erweitern die früheren Berichte (Pfeifer et al., 1996; Wagner et al., 1998), da erstmals gezeigt werden konnte, dass die Deletion der cGKII die Blutdruckregulation *in vivo* nicht beeinflusst, obwohl sowohl die Renin- und Aldosteronsekretion beeinflusst werden.

4.2 Analyse der Funktion des cGKI-Proteins bei der Protonen-stimulierten Bikarbonatsekretion

4.2.1 Analyse der Duodenalulzeration nach einer Behandlung mit Protonenpumpeninhibitoren

Die cGKI α - und I β -rescue Mausmutanten und die cGKI $^{-/-}$ - Mäuse entwickeln ohne äußere Einwirkungen ein blutendes Duodenalulkus. Dies konnte mittels eines positiven Hämoculttests gezeigt werden. Je älter die cGKI α - und I β -rescue Mausmutanten wurden, desto massiver zeigte sich eine Gewebhypertrophie und die Ulzeration im Duodenum (siehe Abb. 11). Die Analyse des Magen-pH-Werts der cGKI α - und I β -rescue Mausmutanten und die cGKI $^{-/-}$ - Mäuse zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren und lag bei ca. pH 2,7.

Da bekannt ist, dass Ulzera im Magen des Menschen durch Behandlung mit Protonenpumpeninhibitoren behandelt werden können, wurde der gleiche Behandlungsansatz gewählt, um den Ulzerationen in den cGKI-genmutierten Mäusen entgegenzuwirken.

Es wurden cGKI α - und I β -rescue Mausmutanten und die cGKI $^{-/-}$ - Mäuse, sowie die Kontrolltiere acht Wochen mit einem Protonenpumpeninhibitor (PPI; Esomeprazol) behandelt und anschließend der pH im Magen gemessen, sowie die Duodeni morphometrisch ausgemessen und statistisch erfasst. Hier zeigte sich zum Einen ein deutlicher Anstieg des pH-Werts im Magen der behandelten Tiere von pH 2,5 auf pH 5,3, zum Anderen kam es bei den behandelten Tieren zu keiner Ulzeration (siehe Abb. 13). Eine, wenn auch verminderte Gewebhypertrophie des Duodenums war aber nach wie vor zu verzeichnen. Desweiteren wurde das Überleben der cGKI-defizienten Mäuse mit einer PPI-Behandlung untersucht.

Hier zeigte sich, dass die behandelten Mäuse gegenüber den unbehandelten Mäusen einen deutlichen Überlebensvorteil haben (Abb. 12). Diese cGKI-defiziente Mauskoorte wurde ab der Geburt mit Esomeprazol im Futter behandelt und zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit leben noch sieben Mäuse aus dieser Kohorte. Jedoch ist zu erkennen, dass nach 2, 7, 20, 35 und 63 Wochen Todesfälle zu verzeichnen waren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist einerseits, dass in grossen Würfen (n=12) nicht alle Nachkommen mit der gleichen Menge Muttermilch versorgt werden. Andererseits kann nicht exakt geklärt werden, wie viel Wirkstoff tatsächlich über die Muttermilch bei den Nachkommen ankommt. Beim Menschen liegt der Milch/Plasma-Anteil von Pantoprazol, welches zu 50% aus Esomeprazol besteht, bei 0,022 (Plante et al., 2004). Dieser Wert deutet somit ganz deutlich darauf hin, dass die noch säugenden Mäuse nur eine minimale Dosis an Esomeprazol aufnehmen können.

Sobald die Mäuse anfangen feste Nahrung zu sich zu nehmen, kann gewährleistet werden, dass eine ausreichende Menge an MUPS (multiple unit pellet system, enthält Esomeprazol in der säureresistenten Kapsel) aufgenommen wird, und somit ein therapeutischer Effekt erzielt wurde.

4.2.2 *In vivo* Bikarbonatsekretionsmessungen in α - und β -rescue Mausmutanten, cGKI-defizienten Mäusen, sowie in Kontrolltieren

Da die „Übersäuerung“ des Magenenchymus in den α - und β -rescue Mausmutanten, cGKI-defizienten Mäusen mittels pH-Messungen ausgeschlossen werden konnte, deutet die Entstehung eines Duodenalulkuses stark darauf hin, dass die Bikarbonatsekretion im Duodenum nicht ausreichend ist.

Aufgrund dessen wurden *in vivo* die Protonen-induzierten Bikarbonatmessungen in α - und β -rescue Mausmutanten, cGKI-defizienten Mäusen, sowie in Kontrolltieren gemessen. Nach fünfminütiger Stimulation mit Salzsäure pH 2,5 wurde die sezernierte Bikarbonatsekretionsrate gemessen. Es zeigte sich deutlich, dass die Kontrolltiere mit einer vermehrten Rate an Bikarbonatsekretion auf den Säurestimulus reagieren, bei den α - und β -rescue Mausmutanten sowie den cGKI-defizienten Mäusen war dies aber nicht zu beobachten. Bei den letztgenannten kommt es lediglich zu einer sehr geringen Bikarbonatsekretion, welche im Vergleich zu den Kontrolltieren hochsignifikant verringert ist (Abb. 17). Ebenso zeigte die basale Bikarbonatsekretion in α - und β -rescue Mausmutanten sowie bei den cGKI-defizienten Mäusen verringerte Bikarbonatsekretionsraten (Abb. 16).

4.2.3 Analyse der Genexpression an der Bikarbonatsekretion beteiligter Proteine, sowie Untersuchungen der Expression der cGKI in nicht-glatten Muskelzellen

Der CFTR-Kanal sowie Transporter der Scl26a Familie sind unter anderem an der säurestimulierten Bikarbonatsekretion beteiligt (Allen & Flemstrom, 2005). Aufgrund dessen wurde der Expressionslevel von Sekretin, Na^+/H^+ Austauscher 1 und 3 (NHE 1+3), Anionen-Austauscher 2 (AE 2), Karboanhydrase II (CAII), Cyclooxygenase I und II (COX I+II), Prostaglandin E_2 -Synthase (PGE $_2$ -S), Prostaglandin E Rezeptor (EP3), Chlorid-Bikarbonat-Austauscher 26A3 (DRA; SLC26A3) und 26A6 (PAT1; SLC26A6), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) und Transient receptor potential channel VI (TrypVI) in α - und β -rescue Mausmutanten, cGKI-defizienten Mäusen, sowie Kontrolltiere mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert

(Abb. 19). Mit Ausnahme von Sekretin konnte kein Unterschied im Expressionslevel detektiert werden.

Dies trifft auf alle untersuchten Genotypen zu. Das Peptidhormon Sekretin hingegen zeigt als einziges im Vergleich zu den Kontrolltieren eine fünffache Hochregulation des mRNA-Levels bei den cGKI-defizienten Mäusen und bei den cGKI α - bzw. β -rescue Mausmutanten. Sekretin wird von den S-Zellen im Duodenum gebildet und sezerniert. Der Stimulus zur Sekretion ist ein niedriger pH-Wert (< 4,5) des Speisebreis im Duodenum. Sekretin veranlaßt u.a. das Pankreas dazu, ein bikarbonatreiches Sekret ins Duodenum abzugeben. Um diese Feedback-Regulation zu gewährleisten ist ein intakter afferenter Nervus vagus von Nöten (Chey & Chang, 2003). Die Hochregulation der Sekretin-mRNA zeigt deutlich, dass der „Sensor“ für den sauren Speisebrei funktional ist und eine Bikarbonatsekretion initiiert werden sollte. Dennoch scheint dieser Mechanismus in den cGKI-genmutierten Tieren nicht umsetzbar zu sein. Aufgrund dessen wurden weitere für die gastrointestinale Regulation notwendige Zelltypen auf die Expression der cGKI untersucht.

Die Arbeit von Weber et al. legte bereits dar, dass die cGKI α - und β -Isoform in glatten Muskelzellen exprimiert wird (Weber et al. 2007). Dies konnte in Abb. 15 mittels immunhistologischer Färbung bestätigt werden. Diese Abbildung zeigt deutlich die Expression der cGKI in der Ring- und Längsmuskelschicht des Duodenums, sowie in den Blutgefäßen der Villi. Ebenfalls konnte mittels Western Blot Analyse die (Über-)Expression der beiden Isoformen cGKI α - und cGKI β im Duodenum der jeweils isoformspezifischen Mausmutante bestätigt werden (Abb. 14). Darüberhinaus bestand die Annahme, dass das cGKI-Protein in nicht-glattmuskulären Zelltypen exprimiert sein könnte, wie z.B. in den interstitiellen Zellen von Cajal (ICC). Die ICC stellen u.a. einen wichtigen Mediator für exzitatorisch cholinerge und inhibitorisch nitrinerge Neurotransduktion dar (Sanders & Ward 2007; Sanders, 1996). Mittels immunhistochemischer Kofärbung von cGKI und nNOS konnte eine Kolo-kalisation dieser beiden Proteine in den ICC's von α - und β -rescue Mausmutanten, cGKI-defizienten Mäusen, sowie der Kontrolltiere ausgeschlossen werden (Abb. 18). Um das Vorhandensein geringer Konzentrationen des cGKI-Proteins in den ICC's und im Darmepithel vollständig auszuschließen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Greten und Herrn PD. Dr. Saur, Klinikum rechts der Isar, zwei neue Mauslinien generiert. Durch Verpaarung der cGKI^{L2/L2} mit der villin-Cre- und mit der c-Kit-Cre Linie wurden zum einen Villin-Cre-cGKI^{-/-} und zum anderen c-Kit-cGKI^{-/-}-Mäuse generiert (Singh et al. 2011). In diesen Mauslinien war die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion nicht verändert, sodass wir annehmen müssen, dass die neuronale exprimierte cGKI die Protonen-stimulierte Bikarbonatsekretion beeinflusst (Abb. 26).

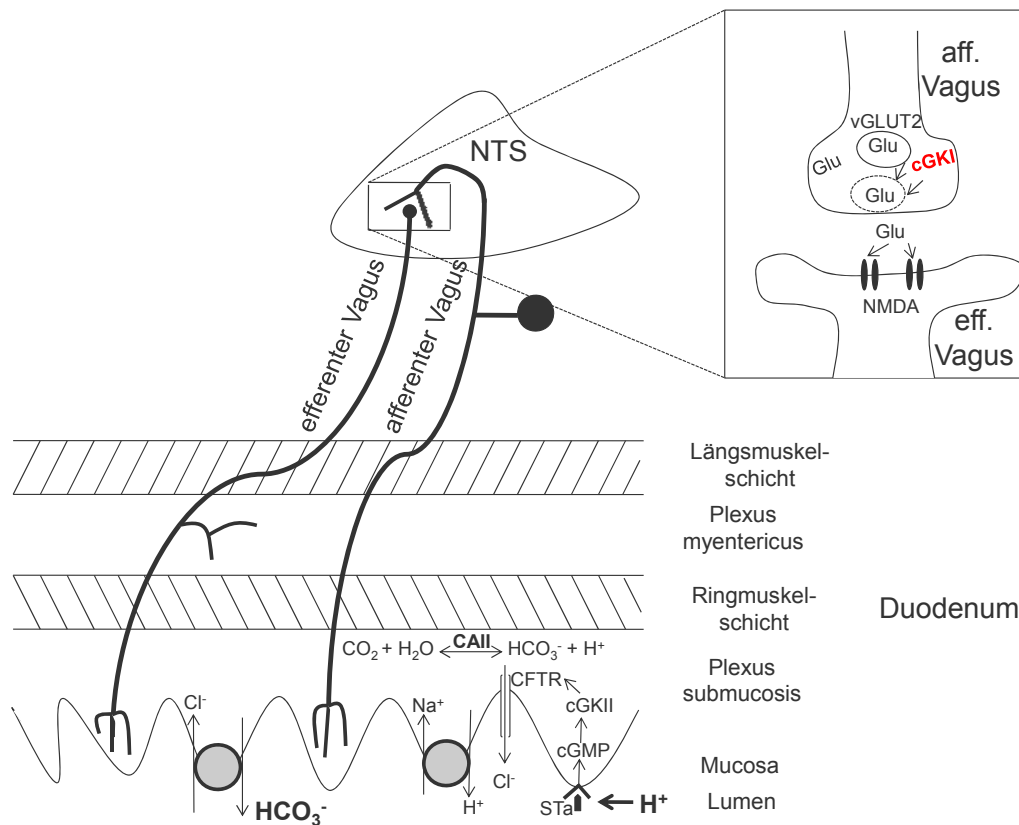


Abb. 26: Schematische Darstellung der neuronalen cGKI-Regulation für die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion. Weitere Erklärungen siehe Text.

4.2.4 Die Beteiligung der cGKI an der zentralen Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion

Die immunhistochemischen Analysen zeigten, dass die cGKI ausschließlich in den Glattmuskelzellen des Duodenums exprimiert wird. Hinzu kommt, dass eine Deletion der cGKII keinen gastrointestinalen Phänotyp aufweist. Dies bestärkt die Annahme, dass die neuronale cGKI essentiell für die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion ist. Einige Veröffentlichungen zeigen, dass für die Bikarbonatsekretion eine nervale Regulation über den Nervus Vagus essentiell ist (Ballesteros et al., 1991; Jonson et al., 1986).

Diese Hypothese bestätigte sich dahingehend, dass Kontrolltiere, welche bilateral subdiaphragmatal vagotomiert wurden, nach einer Säurestimulation eine signifikant verringerte Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion *in vivo* aufwiesen (Abb. 20). Dies führte weiterhin zum Ergebnis, dass umgekehrt die bilaterale subdiaphragmatal Stimulation des Nervus Vagus in Kontrolltieren und cGKI-defizienten Mäusen zu einer vermehrten Bikarbonatsekretion führt.

Nach der subdiaphragmären Vagusstimulation mittels elektrischer Feldstimulation (EFS) kam es in beiden Genotypen zu einem Anstieg der Bikarbonatsekretion, sodass im Vergleich zu den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied zu erkennen war (Abb. 21).

Darüberhinaus ist bekannt, dass der afferente Nervus Vagus über den Nucleus tractus solitarius (NTS) mit dem efferenten Teil des Nervs in der Medulla oblongata verknüpft ist. Vorausgegangene Veröffentlichungen haben berichtet, dass das cGKI Protein im NTS exprimiert wird (Feil et al., 2005; Lein et al., 2007).

Dies konnte immunhistochemisch bestätigt werden (Abb. 22). Ebenso konnte bestätigt werden, dass α - und β -rescue Mausmutanten neuronale cGKI Knockout Mäuse sind (Hofmann et al., 2006). Immunhistochemisch konnte desweiteren gezeigt werden, dass die cGKI in Neuronen des NTS exprimiert wird (Abb. 23).

Die Neuronen konnten darüberhinaus als glutamaterg identifiziert werden, da die vesikulären Glutamatransporter Typ 2-Neuronen mittels Immunfluoreszenzfärbung identifiziert werden konnten.

Vorangehende Untersuchungen von Travagli et al. zeigten, dass unter anderem die Vagusregulation für den Gastrointestinaltrakt über glutamaterge Neuronen (vesikuläre Glutamatransporter Typ 2- Neuronen (vGLUT2) positiv) gesteuert werden (Travagli et al., 2006). Die Koloalstation von cGKI und vGLUT2 zeigt (Abb. 24), dass das cGKI Protein in genau jenen glutamatergen Neuronen exprimiert wird, die eine entscheidende Rolle für die Vagusregulation im Gastrointestinaltrakt spielt. Somit lässt sich verdeutlichen, dass das neuronale cGKI Protein eine entscheidende Komponente ist, um die duodenale Mukosa vor Protonen-induzierten Ulzerationen zu schützen. Der wahrscheinliche Schutzmechanismus erfolgt folgendermaßen:

Die cGKI ermöglicht die Signaltransduktion vom afferenten auf den efferenten Nervus Vagus, indem es eine Glutamatausschüttung fördert (Abb. 26). Dies wiederum ist nötig um eine adäquate Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion zu gewährleisten (Travagli et al., 2006; Zhang et al., 1998). Die Regulation der säurestimulierten Bikarbonatsekretion über den CFTR-Kanal sowie über Transporter der Scl26a Familie sind durch die Deletion der cGKI zwar nicht beeinträchtigt, andererseits ist diese Bikarbonatsekretion alleine nicht ausreichend um die Entstehung eines protoneninduzierten Ulkus zu verhindern. Interessanterweise zeigen auch CFTR-defiziente Mäuse eine gestörte protoneninduzierte Bikarbonatsekretion auf (Singh et al., 2008), entwickeln aber kein Duodenalulcus. Bei diesem Phänomen wird vom „CF-Paradox“ gesprochen. Dabei wird durch das Fehlen der CFTR-Kanäle eine massive zelluläre Übersäuerung verhindert und somit der anschließende Zelltod aufgrund eines niedrigen pH-Werts im Lumen umgangen (Akiba et al., 2005; Hirokawa et al., 2004; Kaunitz & Akiba, 2001).

Der CFTR-Kanal ist aber bei den cGKI-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt und somit funktionstüchtig. Dies ergab sich aus *in vitro* Untersuchungen in der Ussing Kammer (nicht gezeigte Daten).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit ein bisher unbekannter grundlegender Mechanismus für die Bikarbonatsekretion gefunden werden, an dem die neuronale cGKI massgeblich beteiligt ist. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig um den Mechanismus vollständig zu enthüllen, der die Entstehung duodenaler Ulzera verhindert.

5. Conclusion

5.1. cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion

ACTH-stimulated aldosterone secretion can be inhibited by atrio-natriuretic peptid/cGMP. The mechanism behind this modulation involves cGMP-dependent activation of phosphodiesterase 2 and hydrolysis of cAMP in bovine and murine zona glomerulosa of the adrenal gland. cGMP-dependent protein kinase II is expressed in rat and mouse adrenal cortex glomerulosa cells. It was reported that activation of cGKII leads to a phosphorylation of the steroidogenic acute regulatory protein, and increased aldosterone secretion.

The contradictory effects of cGMP in rat and bovine adrenal cell has been analysed in mice that lacked cGKII. The *in vivo* data showed, that injection of atrio-naturetic peptide decreased ACTH-stimulated aldosterone secretion in control mice, but had no effect in cGKII-deficient mice. These results supported the view that cGKII modulates aldosterone secretion in the murine adrenal cortex.

5.2. Neuronal cGMP kinase I is essential for H⁺-stimulated duodenal bicarbonate secretion in mice

Proton-induced bicarbonate secretion protects the duodenum against acid injury. The cGMP kinase type I knockout (cGKI^{-/-}) mice and mice with cGKI α or cGKI β reconstituted solely in all smooth muscles developed a bleeding ulcer and were unable to respond to a physiological H⁺ stimulus with duodenal HCO₃⁻ secretion. The *in vivo* data showed that stimulation of the subdiaphragmal N. vagus re-established duodenal HCO₃⁻ secretion in cGKI^{-/-}-mice suggesting a role of cGKI in the vagal circuit. The cGKI is expressed in the nucleus tractus solitarius that connects the afferent and efferent N. vagus.

These data suggest that protection of the duodenum from intrinsic acid injury requires neuronal cGKI.

Anhang

Primer Sequenzen

Oligonukleotide

Tab. 1: verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Produkt
HPRT	5' - gta atg atc agt caa agg ggg ac - 3' 5' - tgg tta agg ttg caa gct tgc tgg - 3'	175 bp
Sekretin	5' - cca cag agt cat agc tgg ca - 3' 5' - gcc aga gaa cat cct cag ga - 3'	203 bp
NHE 1	5' - gat ccc cac cat ctc aag c - 3' 5' - cca cag agt cat agc tgg ca - 3'	497 bp
NHE 3	5' - tga gga gga acc gag cag - 3' 5' - cag caa gaa atc cag gag tcc - 3'	394 bp
AE 2	5' - gcg cag att ctt tgc aca cg - 3' 5' - ctg cac ctt cat cct ctt gga g - 3'	456 bp
CA II	5' - tga cac agc aac tgc cc - 3' 5' - ctc ctc att gaa gtt cag cg - 3'	599 bp
COX I	5' - tcc tgc tgc cag atc ctg - 3' 5' - ggc aga atg cga gta tag ctc ac - 3'	334 bp
COX II	5' - agt gtg act gta ccc gga c - 3' 5' - tga agt gct ggg caa ag - 3'	454 bp
PGE-S2	5' - gtg ctt gtc tct cta gcc g - 3' 5' - gca aaa ctc ggt cac ctc - 3'	588 bp
EP3	5' - cac gtg gtg ctt cat cag c - 3' 5' - gcc agg cga act gca at - 3'	390 bp
DRA	5' - tcc tgg acc atc tca aag g - 3' 5' - gcg tav aac ccg tag gct - 3'	220 bp
PAT 1	5' - att gct gaa cca gga gca g - 3' 5' - cag gaa gta gat gaa gac ggg - 3'	326 bp

TRPVI	5' - cgt cag ctc tgt tgt cac tct c - 3' 5' - ctg tct gtg gta gct ggc att g - 3'	538 bp
CFTR	5' - ggt aca gac acc act tgg agt tg - 3' 5' - gct ggg tga aga agc agt tg - 3'	343 bp

Genotypisierung PCR Primer

Tab. 2: verwendete Genotypisierungsoligonukleotide

Mauslinie	Primer	Sequenz		Produkt
cGKI ^{-/-}	RF125	5' - gtc aag tga cca cta tg - 3'	RF53 + RF125	ctr: 284 bp
	RF53	5' - cct ggc tgt gat ttc act cca - 3'	RF53 + RF118	cGKI ^{-/-} : 250bp
	RF118	5' - aaa tta ctt gtc aaa ttc ttg - 3'		
cGKI α	RF67	5' - ctc aga gtg gaa ggc ctg ctt - 3'	RF67 + SW16	ctr: 292 bp
	SW12	5' - cgc aag ggt tac tca cca ca - 3'	RF67 + SW12	cGKI α : 150 bp
	SW16	5' - cct cct tga gca tga gaa tct tg - 3'		
cGKI β	RF67	5' - ctc aga gtg gaa ggc ctg ctt - 3'	RF67 + SW16	ctr: 292 bp
	SW8	5' - cgc aag ggt tac tca cca ca - 3'	RF67 + SW8	cGKI β : 195 bp
	SW16	5' - cct cct tga gca tga gaa tct tg - 3'		
cGKII	AV3R	5' - att aag ggc cag ctc att cc - 3'	E2FB-AV + AV3R	cGKII ^{-/-} :450 bp
	E2FB-AV	5' - ggt gaa gtt tta ggt gaa acc aag - 3'	E2FB-AV + AV9R	ctr: 275 bp
	AV9R	5' - ctg ctt aat gac gta gct gcc - 3'		

Antikörper

Primärantikörper

Tab. 3: verwendete Primärantikörper

Antikörper	Herkunft	Anwendung/ Verdünnung	Referenz
vGLUT2	Meer- schweinchen polyklonal	Immunhistochemie 1:200	Millipore
nNOS	Ziege polyklonal	Immunhistochemie 1:200	J. Beavo
cGKIcommon; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:200 Immunhistochemie/1:50	P. Ruth, F. Hofmann
cGKI α ; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:80 Immunhistochemie/1:50	Geiselhöringer et al., 2004a
cGKI β 105-4; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:1000 Immunhistochemie/1:100	Geiselhöringer et al., 2004a
NeuN	Maus monoklonal Alexa Fluor [®] 488 konjugiert	Immunhistochemie 1:100	Millipore
β -Aktin	Kaninchen polyklonal	Westernblot 1:40000	Abcam
cKit	Kaninchen polyklonal	Westernblot 1:500	Santa Cruz
cGKI 78-2;	Kaninchen polyklonal	Immunhistochemie 1:25	Pfeifer et al., 1996

Sekundärantikörper

Tab. 4: verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Anwendung/ Verdünnung	Referenz
Anti-Kaninchen/ Meerrettichperoxidase	Ziege polyklonal	Westernblot 1:100000	Dianova
Anti-Maus/Cy2	Ziege polyklonal	Immunhistochemie 1:500	Dianova
Anti-Kaninchen biotinyliert	Ziege polyklonal	Immunhistochemie 1:200	Vectastain
Anti-Ziege biotinyliert	Kaninchen polyklonal	Immunhistochemie 1:200	Vectastain
Anti-Kaninchen/Cy3	Ziege polyklonal	Immunhistochemie 1:500	Dianova
Anti- Meerscheinchen/Cy2	Ziege polyklonal	Immunhistochemie 1:500	Dianova

6. Literaturverzeichnis

- Allen, A. & Flemstrom, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, **288**(1), C1-19.
- Allen, A., Flemstrom, G., Garner, A. & Kivilaakso, E. (1993). Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev*, **73**(4), 823-57.
- Baude, A., Strube, C., Tell, F. & Kessler, J. P. (2009). Glutamatergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarii: structural and functional characteristics. *J Chem Neuroanat*, **38**(3), 145-53.
- Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. & Zong, X. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **358**(1), 140-4.
- Chey, W. Y. & Chang, T. M. (2003). Secretin, 100 years later. *J Gastroenterol*, **38**(11), 1025-35.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**(24), 5294-9.
- el-Husseini, A. E., Bladen, C. & Vincent, S. R. (1995). Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem*, **64**(6), 2814-7.
- Feil, R., Hofmann, F. & Kleppisch, T. (2005). Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci*, **16**(1), 23-41.
- Flemstrom, G., Hallgren, A., Nylander, O., Engstrand, L., Wilander, E. & Allen, A. (1999). Adherent surface mucus gel restricts diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. *Am J Physiol*, **277**(2 Pt 1), G375-82.
- Forstermann, U. & Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, **113**(13), 1708-14.
- Forstermann, U., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Sheng, H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M. & Murad, F. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, **42**(10), 1849-57.
- Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B. & Keef, K. D. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, **274**(16), 10927-35.
- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**(5789), 373-6.
- Gambaryan, S., Butt, E., Marcus, K., Glazova, M., Palmetshofer, A., Guillon, G. & Smolenski, A. (2003). cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J Biol Chem*, **278**(32), 29640-8.

- Gambaryan, S., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurtz, A. & Lohmann, S. M. (1996). 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), 662-70.
- Giannella, R. A. (1995). Escherichia coli heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do? *J Lab Clin Med*, **125**(2), 173-81.
- Guba, M., Kuhn, M., Forssmann, W. G., Classen, M., Gregor, M. & Seidler, U. (1996). Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃⁻ secretion: proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology*, **111**(6), 1558-68.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D. & Taugner, R. (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*, **70**(4), 1067-116.
- Hepler, J. R. (1999). Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*, **20**(9), 376-82.
- Hirokawa, M., Takeuchi, T., Chu, S., Akiba, Y., Wu, V., Guth, P. H., Engel, E., Montrose, M. H. & Kaunitz, J. D. (2004). Cystic fibrosis gene mutation reduces epithelial cell acidification and injury in acid-perfused mouse duodenum. *Gastroenterology*, **127**(4), 1162-73.
- Hofmann, F., Ammendola, A. & Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113** (Pt 10), 1671-6.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. & Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, **86**(1), 1-23.
- Hogan, D. L., Ainsworth, M. A. & Isenberg, J. I. (1994). Review article: gastroduodenal bicarbonate secretion. *Aliment Pharmacol Ther*, **8**(5), 475-88.
- Holzer, P. (2002). Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain. *Neurogastroenterol Motil*, **14**(5), 459-75.
- Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. & Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, **34**(6), 879-86.
- Jonson, C., Nylander, O., Flemstrom, G. & Fandriks, L. (1986). Vagal stimulation of duodenal HCO₃⁻-secretion in anaesthetized rats. *Acta Physiol Scand*, **128**(1), 65-70.
- Kaunitz, J. D. & Akiba, Y. (2001). Duodenal intracellular bicarbonate and the 'CF paradox'. *Jop*, **2**(4 Suppl), 268-73.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T. P. & Khalequzzaman, M. (2003). Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, **546**(Pt 3), 879-89.

- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramée, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivasay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, **445**(7124), 168-76.
- MacFarland, R. T., Zelus, B. D. & Beavo, J. A. (1991). High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem*, **266**(1), 136-42.
- Markert, T., Vaandrager, A. B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H. R., Jarchau, T. & Lohmann, S. M. (1995). Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest*, **96**(2), 822-30.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. & Hofmann, F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*, **189**(8), 1255-64.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-50.
- Nikolaev, V. O., Gambaryan, S., Engelhardt, S., Walter, U. & Lohse, M. J. (2005). Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem*, **280**(3), 1716-9.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. & Fassler, R. (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, **274**(5295), 2082-6.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. & Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J*, **17**(11), 3045-51.
- Plante, L., Ferron, G. M., Unruh, M. & Mayer, P. R. (2004). Excretion of pantoprazole in human breast. *J Reprod Med*, **49**(10), 825-7.
- Sanders, K. M. (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, **111**(2), 492-515.

- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. & Hofmann, F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, **87**(9), 825-30.
- 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. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*, **404**(6774), 197-201.
- Seidler, U., Blumenstein, I., Kretz, A., Viellard-Baron, D., Rossmann, H., Colledge, W. H., Evans, M., Ratcliff, R. & Gregor, M. (1997). A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO₃⁻ secretion. *J Physiol*, **505** (Pt 2), 411-23.
- Singh, A. K., Sjoblom, M., Zheng, W., Krabbenhoft, A., Riederer, B., Rausch, B., Manns, M. P., Soleimani, M. & Seidler, U. (2008). CFTR and its key role in in vivo resting and luminal acid-induced duodenal HCO₃⁻ secretion. *Acta Physiol (Oxf)*, **193**(4), 357-65.
- Singh A.K.; Spiessberger B., Zheng W., Xiao F., Lukowski R., Wegener J.W., Weinmeister P., Saur D., Klein S., Schemann M., Krueger D., Seidler U., Hofmann F. (2011). Neuronal cGMP kinase is essential for H⁺-stimulated duodenal bicarbonate secretion in mice. (in Revision)
- Sonnenburg, W. K. & Beavo, J. A. (1994). Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, **26**, 87-114.
- Spiessberger, B., Bernhard, D., Herrmann, S., Feil, S., Werner, C., Lupp, P. B. & Hofmann, F. (2009). cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion. *FEBS J*, **276**(4), 1007-13.
- Stocco, D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol*, **63**, 193-213.
- Sugamoto, S., Kawauchi, S., Furukawa, O., Mimaki, T. H. & Takeuchi, K. (2001). Role of endogenous nitric oxide and prostaglandin in duodenal bicarbonate response induced by mucosal acidification in rats. *Dig Dis Sci*, **46**(6), 1208-16.
- 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. & Mendelsohn, M. E. (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, **9**(12), 1506-12.
- Travagli, R. A., Hermann, G. E., Browning, K. N. & Rogers, R. C. (2006). Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu Rev Physiol*, **68**, 279-305.
- 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. (1997). cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type I β . *J Biol Chem*, **272**(7), 4195-200.
- Wagner, C. & Kurtz, A. (1998). Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **7**(4), 437-41.

- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. & Kurtz, A. (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest*, **102**(8), 1576-82.
- Weber, S., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P., Woner, R., Wegener, J. W., Valtcheva, N., Feil, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. & Feil, R. (2007). Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ Res*, **101**(11), 1096-103.
- Wu, A. Y., Tang, X. B., Martinez, S. E., Ikeda, K. & Beavo, J. A. (2004). Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A. *J Biol Chem*, **279**(36), 37928-38.
- Yao, B., Hogan, D. L., Bukhave, K., Koss, M. A. & Isenberg, J. I. (1993). Bicarbonate transport by rabbit duodenum in vitro: effect of vasoactive intestinal polypeptide, prostaglandin E2, and cyclic adenosine monophosphate. *Gastroenterology*, **104**(3), 732-40.
- Zhang, X., Renehan, W. E. & Fogel, R. (1998). Neurons in the vagal complex of the rat respond to mechanical and chemical stimulation of the GI tract. *Am J Physiol*, **274**(2 Pt 1), G331-41.

Originalarbeiten:

Spiessberger, B., Bernhard, D., Herrmann, S., Feil, S., Werner, C., Lupp, P. B. & Hofmann, F. (2009). cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion. *Febs J*, **276**(4), 1007-13.

Desch, M., Sigl K., Hieke, B., Salb, K., Kees, F., Bernhard, D., Jochim, A., Spiessberger, B., Höcherl, K., Feil, R., Feil, S., Lukowski, R., Wegener, J.W., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2010). IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide- mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res*, **86**(3), 496-505.

Singh, A.K.; Spiessberger, B., Zheng, W., Xiao, F., Lukowski, R., Wegener, J.W., Weinmeister, P., Saur, D., Klein, S., Schemann, M., Krueger, D., Seidler, U., Hofmann, F. (2011).

Neuronal cGMP kinase is essential for H⁺-stimulated duodenal bicarbonate secretion in mice. (in Revision)

Abstracts:

Sigl, K., Desch, M., Spiessberger, B., Bernhard, D., Jochim, A., Wegener, J.W., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2007), Analysis of smooth muscle function in IRAG knockout mice. *48. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Desch, M., Sigl, K., Spiessberger, B., Bernhard, D., Jochim, A., Weinmeister, P., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2007), Analysis of smooth muscle function in IRAG knockout mice. *3rd International Conference on cGMP, Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Dresden, Germany)*.

Spiessberger, B., Weinmeister, P., Werner, C., Saur, D., Seidler, U., Zheng, W., Schlossmann, J., Krüger, D., Schemann, M., Hofmann, F., Lukowski, R. (2009). The role of cGMP-cGKI-signaling for duodenal bicarbonate secretion. *4th International Conference on cGMP, Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Regensburg, Germany)*.

Spiessberger, B., Weinmeister, P., Werner, C., Saur, D., Seidler, U., Zheng, W., Schlossmann, J., Hofmann, F., Lukowski, R. (2009). Analysing the role of cGMP-cGKI-signaling for duodenal bicarbonate secretion. *50. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

VI Danksagung:

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

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die freundliche Aufnahme an seinem Institut, der späteren Weiterführung in der AG Carvas 923, sowie der engagierten Betreuung dieser Arbeit, die fachliche Unterstützung und für die stetige Bereitschaft zur Lösung kleinerer und größerer Probleme.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Meyer (Lehrstuhl für Physiologie, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan) für die Berichterstattung vor der Fakultät und das Interesse an meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Seidler und Dr. Singh (Medizinische Hochschule Hannover), sowie Herrn PD. Dr. Saur (Klinikum Rechts der Isar) für die interessante Zusammenarbeit. Vielen Dank, dass ich in ihren Laboren meine Experimente durchführen durfte.

Herrn Dr. Schweda (Lehrstuhl für Physiologie, Regensburg) für die Plasmareninmessungen.

Maria, Eva, Veronika, Enrico, Katrin, Ged, Anne, Julia und Angela und insbesondere Tea, Steffi und Lulu für die grossen Hilfestellungen zur Bewältigung des Laboralltags und für all die aufmunternden Gespräche.

Ein besonderer Dank gilt hierbei Veronika Leiss, die mir viel Hilfestellung im Laboralltag gab und viele korrigierende Blicke in diese Arbeit geworfen hat und für ihre Freundschaft.

Ebenfalls gilt meinen Zeuginnen Maria und Eva ein besonderer Dank für das stets offene Ohr und die unkomplizierte Bereitstellung aller benötigten Arzneimittel für den Laboralltag. Schee war's mit aich am Biederstein!

Den ehemaligen Arbeitskollegen des Erdgeschosses Pascal, Lugo und Lucas für die Ratschläge und Hilfsbereitschaft.

Ein Dankeschön an meine Eltern, v.a. an meine Mama, die mir immer auf ihre sehr individuelle Art geholfen hat, meiner Oma und meiner Tante, meinen Unifreunden und all den anderen Freunden für ihr offenes Ohr und die echte Freundschaft.

Grosser Dank gebührt auch meinem Schwiegervater, der eine große Bereicherung für mein Leben ist. Ohne ihn hätten die Urlaube und Freizeitaktivitäten einen wesentlich geringeren Erholungs- und Unterhaltungswert und es hätte bedeutend weniger zu lachen gegeben. Danke dafür Hasenpapa!

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Klaus, der mir stets mit seiner immerwährender Unterstützung, Geduld und Rückhalt in allen Lebenslagen zur Seite stand und einen unermüdlichen Glauben in mich hat! Vielen Dank dafür Haserl!

VII Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Beate Spießberger
Titel:	Dipl. Biol. univ.
Geburtsort,-datum	München, 15. März 1979
Familienstand	verheiratet
Nationalität	Österreichisch

Studium

Seit 11/2007	Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München mit dem Titel „ <i>Analyse der Funktion der cGMP-abhängigen Proteinkinasen in der Nebenniere und im Duodenum</i> “ (Prof. Dr. F. Hofmann)
12/06 – 09/2007	Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München mit dem Titel „ <i>Renovaskuläre Analyse von IRAG</i> “ (Prof. Dr. F. Hofmann; Prof. Dr. Jens Schlossmann)
10/2002 – 09/2007	Studium der Biologie an der Technischen Universität München (1,3)
Hauptfach:	Mikrobiologie
Nebenfächer:	Pharmakologie und Toxikologie, Limnologie

Ausbildung

09/1999 – 07/2002	Ausbildung an der staatlichen Berufsfachschule für MTLA am Max von Pettenkofer Institut an der LMU München mit Examensabschluss
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Schule

1999	Abitur am Rupprecht-Gymnasium in München
------	------------------------------------------