

**Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München**

***In vivo* Modelle zur Untersuchung der Funktion der
Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I
im glatten Muskel**

Silke Weber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
3. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 29.11.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 19.01.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

A.	EINLEITUNG	1
A.1.	Bedeutung glatter Muskelzellen	1
A.2.	Kalziumregulation und Kontraktion des glatten Muskels	2
A.3.	NO/cGMP/cGKI-Signalweg und Relaxierung des glatten Muskels	2
A.4.	cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs)	5
A.4.1.	Struktur und Vorkommen der cGKs	5
A.4.2.	Wirkmechanismen der cGKs	7
A.4.3.	Isoformen der cGKI (cGKI α/β)	8
A.4.4.	Konventionelle cGKI Knockout Mäuse (cGKI ^{-/-} Mäuse)	9
A.5.	Ziel dieser Arbeit	10
B.	MATERIAL UND METHODEN	11
B.1.	Bakterien und Plasmide	11
B.2.	Anzucht und Stammhaltung	11
B.2.1.	Nährmedium	11
B.2.2.	Durchführung der Bakterienkultur	12
B.2.3.	Transformation von Bakterien	12
B.3.	Molekularbiologische Methoden zur Neukombination von DNS	13
B.3.1.	Isolierung von Plasmid-DNS	13
B.3.2.	Reinigung und Konzentration von DNS-Fragmenten	13
B.3.3.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	14
B.3.4.	Spaltung von DNS mittels Restriktionsenzymen	14
B.3.5.	T4-Polish	15
B.3.6.	Dephosphorylierung linearer DNS durch alkalische Phosphatase	15
B.3.7.	Verknüpfung von DNS-Fragmenten durch T4-DNS-Ligase	15
B.3.8.	Auftrennung von DNS-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	15
B.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
B.4.1.	PCR-Primer	17
B.4.2.	Reagenzien	17
B.4.3.	Standard-PCR	17
B.4.4.	Long-Template-PCR ("Long Range PCR")	18
B.4.5.	RT-PCR	19
B.5.	Sequenzierung von DNS	20
B.6.	Radioaktive Southernblot-Analyse	21
B.6.1.	Isolierung von DNS aus 96 Loch Platten	21
B.6.2.	Restriktionsverdau	22
B.6.3.	Durchführung des Southernblots	22
B.7.	Erzeugung genetisch veränderter Mäuse	25
B.7.1.	Lösungen und Nährmedien	25
B.7.2.	Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	26

B.7.3.	Gewinnung embryonaler Fibroblasten	27
B.7.4.	Allgemeines Vorgehen bei der Kultivierung von ES-Zellen	28
B.7.5.	Homologe Rekombination in ES-Zellen	29
B.7.6.	Identifizierung genetisch modifizierter ES-Zellen	33
B.7.7.	Injektion genetisch modifizierter ES-Zellen in Blastozysten	33
B.7.8.	Testen chimärer Mäuse auf Keimbahntransmission	35
B.7.9.	Haltung und Zucht der Mäuse	35
B.7.10.	Isolierung von DNS/RNS aus Mausgewebe	36
B.7.11.	Isolierung von Protein aus Mausgewebe	36
B.7.12.	Konzentrationsbestimmung von Protein (nach Lowry)	37
B.7.13.	Westernblot	39
B.8.	Kraftmessung am glatten Muskel	41
B.8.1.	Präparation	41
B.8.2.	Auswertung der Versuche	43
B.8.3.	Statistische Methoden	43
B.9.	Erstellen einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier	43
B.10.	Gewichtsanalyse	43
C.	ERGEBNISSE	44
C.1.	Expression der cGKI-Isoformen cGKIα/β unter der Kontrolle des SM22α-Promotors (Generierung der SM-Iα und SM-Iβ Mauslinien)	44
C.1.1.	Eigenschaften und Konstruktion der „Targeting“-Vektoren	44
C.1.2.	Genetische Modifikation von ES-Zellen	48
C.1.3.	Injektion der ES-Zellen in Blastozysten und Generierung chimärer Mäuse	52
C.1.4.	Testen der Chimären auf Keimbahntransmission	52
C.1.5.	Genotypisierung agouti-farbener Nachkommen	54
C.2.	Analyse der SM-Iα und SM-Iβ Mauslinien	56
C.2.1.	RNS Analyse der genetisch modifizierten SM-I α /I β Mäuse	56
C.2.2.	Analyse der Proteinexpression in SM-I α /I β Mäusen mittels Westernblot	58
C.2.3.	Weitere Untersuchungen an SM-I α /I β Tieren	60
C.2.4.	Kraftmessungen an SM-I α /I β Mäusen	60
C.3.	Generierung und Analyse der „Rescue-Linien“ unter Verwendung der SM-Iα und SM-Iβ Linien	63
C.3.1.	Analyse der Proteinexpression in „Rescue“ Mäusen mittels Westernblot	65
C.3.2.	Kaplan-Meier Überlebenskurve	66
C.3.3.	Gewichtsanalyse	68
C.3.4.	Untersuchungen zur Fertilität der „Rescue“ Linien	69
C.3.5.	Kraftmessungen an „Rescue“Mäusen	70
D.	DISKUSSION	74
E.	ZUSAMMENFASSUNG	82

F.	ANHANG	84
F.1.	Verwendete Oligonukleotide	84
F.2.	Verwendete Restriktionsenzyme	84
F.3.	Verwendete Antikörper	85
G.	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	86
H.	LITERATURVERZEICHNIS	88
H.1.	Zitierte Veröffentlichungen	88
H.2.	Eigene Veröffentlichungen	98

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Zelluläre Synthesewege von cGMP.	4
Abb. 2	Schematische Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.	5
Abb. 3	Schema der cGKI-abhängigen Relaxierung der glatten Muskulatur.	8
Abb. 4	Herstellung genetisch veränderter Mäuse.	27
Abb. 5	Homologe Rekombination und zufällige Integration.	30
Abb. 6	Vorgehensweise zur Isolierung von ES-Zell-Klonen.	32
Abb. 7	Restriktions-Analyse	47
Abb. 8	Aufbau der „Targeting“-Vektoren.	47
Abb. 9	PCR-Strategie zur Analyse von ES-Zell-Klonen am 3'-Arm.	48
Abb. 10	„Long-Range“-PCR-Strategie zur Analyse von ES-Zell-Klonen am 5'-Arm.	49
Abb. 11	Beispiele zweier PCR-Analysen der ES-Zell-Klone.	49
Abb. 12	Southernblot-Strategie.	51
Abb. 13	Beispiel einer Southernblot-Analyse.	51
Abb. 14	Isoform-spezifische PCR-Strategien zur Genotypisierung der SM- $I\alpha/\beta$ Mäuse.	54
Abb. 15	Beispiel durchgeführter Genotypisierungen.	54
Abb. 16	RT-PCR-Strategie zur Koamplifikation der SM22 α -WT mRNA und der jeweiligen Knock-in RNS.	56
Abb. 17	RT-PCR-Analyse.	57
Abb. 18	Sequenz-Analyse der SM- $I\alpha/\beta$ Knock-in RNS.	57
Abb. 19	Westernblot-Analyse der cGKI-Expression in SM- $I\alpha/\beta$ Mäusen.	59
Abb. 20	Originalregistrierungen der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur von SM- $I\alpha/\beta$ Mäusen.	61
Abb. 21	KWKs der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur von SM- $I\alpha/\beta$ Mäusen.	61
Abb. 22	Schematische Darstellung der cGKI-Expression in SM- $I\alpha/\beta$ „Rescue“ Mäusen.	63
Abb. 23	Zuchtschema zur Generierung Glattmuskel-spezifischer „Rescue“ Tiere.	64
Abb. 24	Westernblot-Analyse der cGKI-Expression in SM- $I\alpha/\beta$ „Rescue“ Mäusen.	65
Abb. 25	Kaplan-Meier-Überlebenskurve.	66
Abb. 26	Gewichtsanalyse der SM- $I\alpha/\beta$ „Rescue“ Linien.	68
Abb. 27	Originalregistrierungen der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur der „Rescue“ Linien.	70
Abb. 28	KWKs der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung auf CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur der „Rescue“ Linien.	71
Abb. 29	Originalregistrierungen der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung Phe-vorkontrahierter Aorten der „Rescue“ Linien.	72
Abb. 30	KWKs der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung Phe-vorkontrahierter Aorten der „Rescue“ Linien.	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Plasmide.	11
Tabelle 2	Zellkultur Parameter.	26
Tabelle 3	Angaben zur Herstellung von Trenngelen.	40
Tabelle 4	Angaben zur Herstellung des Sammelgels.	40
Tabelle 5	Angaben zur Herstellung der Tyrodelösung zur Kraftmessung.	41
Tabelle 6	Zusammenstellung aller ES-Zell-Klone mit erfolgreicher Integration der cGKI α/β -cDNS in den endogenen SM22 α -Genort.	50
Tabelle 7	Zusammenstellung generierter Chimären.	52
Tabelle 8	Auflistung aller Chimären und Zuordnung zum jeweiligen ES-Zell-Klon.	53

A. Einleitung

A.1. Bedeutung glatter Muskelzellen

Die glatte Muskulatur reguliert über ihren kontraktilen Tonus viele physiologische Prozesse, wie z.B. die Durchmischung und den Transport der Nahrung im Magen-Darm-Trakt, die Urinausscheidung oder den Blutdruck.

Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) unterscheiden sich in Aufbau und Funktion von quergestreifter Muskulatur. SMCs sind einkernig und zeigen ein erhöhtes Aktin zu Myosin Verhältnis, wobei diese beiden kontraktilen Proteine nicht, wie im Falle der quergestreiften Muskulatur, in Sarkomeren organisiert vorliegen. Dadurch wird in glatten Muskeln eine lange Gleitstrecke der Filamente und somit eine Kraftentwicklung über einen sehr weiten Bereich ermöglicht. Zusätzlich können SMCs aufgrund einer geringen ATPase Aktivität erzeugte Kontraktion unter geringem Energieverbrauch aufrechterhalten (Schauf, 1993). SMCs sind daher im Körper überall dort zu finden, wo ein gewisser Spannungszustand über längere Zeit aufrechterhalten werden muss.

Im Unterschied zur Skelettmuskulatur wird die glatte Muskulatur nicht willkürlich, sondern durch Hormone und das vegetative Nervensystem reguliert.

Neben ihrer Beteiligung an wichtigen physiologischen Vorgängen, sind SMCs auch in diverse Krankheitsprozesse involviert. Untersuchungen an Mausmodellen zeigten beispielsweise, dass Funktionsstörungen von SMCs zu Blasenüberfunktion (Persson et al., 2000), Störungen im Magen-Darm-Trakt (Pfeifer et al., 1998) oder Erektionsstörungen (Hedlund et al. 2000) führen können. Neuere Studien geben Hinweise darauf, dass SMCs bei Asthmatikern auch an Entzündungsprozessen der Atemwege durch Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen beteiligt sind (Panettieri et al., 2002). Auch bei Krankheiten des kardiovaskulären Systems, wie z.B. Bluthochdruck oder Atherosklerose, spielen SMCs eine Rolle. Dabei kommt es u.a. durch Proliferation, Dedifferenzierung und Migration der SMCs zu Veränderungen der Gefäße (Ross, 1999; Owens et al., 2004).

Aufgrund der Bedeutung bei der Ausführung lebenswichtiger physiologischer Funktionen und der Beteiligung an unterschiedlichsten Krankheiten, ist die Kenntnis der genauen zellulären Abläufe, die zur Steuerung des Tonus des glatten Muskels sowie zur Entstehung von Funktionsstörungen der SMCs führen, von großem Interesse. Ein genaues Verständnis dieser Prozesse könnte Ansätze zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten liefern.

A.2. Kalziumregulation und Kontraktion des glatten Muskels

Kalziumionen (Ca^{2+}) spielen bei vielen biologischen Vorgängen als intrazelluläres Signalmolekül eine wichtige Rolle. Neben dem Herzschlag, dem Verarbeiten von Informationen im Gehirn, Steuerung von Transkription und Proliferation reguliert ein Anstieg und Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vor allem die Kontraktion und Relaxierung der glatten Muskulatur (Berridge et al., 2000). Diese Ca^{2+} -abhängige Kontraktion wird über eine Hormon-Rezeptor-Bindung initiiert, wodurch ein extrazellulärer Reiz intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Agonisten, wie z.B. Carbachol, Noradrenalin oder Bradykinin, aktivieren über eine Rezeptorbindung die GTP-bindenden Proteine (G_q oder G_{11}) und dadurch die Phospholipase $C\beta$ ($\text{PLC}\beta$). Nach Bildung der sekundären Botenstoffs Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3), aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC) und IP_3 den IP_3 -Rezeptor Typ1 ($\text{IP}_3\text{R1}$), einen Kalziumkanal des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Dies bewirkt den Ca^{2+} -Ausstrom aus intrazellulären Speichern in das Zytosol. Darauf folgt ein Einstrom extrazellulären Ca^{2+} durch spannungsabhängige und –unabhängige Ca^{2+} -Kanäle der Zytoplasmamembran. Insbesondere der spannungsabhängige $\text{Ca}_v1.2$ ist bei diesem Prozess von großer Bedeutung (Hofmann et al., 1999; Moosmang et al., 2003; Wegener et al., 2004). Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und zur Phosphorylierung der Myosin-Leichten-Kette (MLC), wodurch es schließlich zur Kontraktion kommt (Hofmann et al., 2000; Feil et al., 2003).

Neben der Kontraktion durch Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gibt es Mechanismen, die zu einer Kontraktion des glatten Muskels bei gleich bleibender $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen. Somlyo et al. geben einen genauen Überblick über diesen als Ca^{2+} -Sensitisierung bezeichneten Prozess (Somlyo et al., 2003).

A.3. NO/cGMP/cGKI-Signalweg und Relaxierung des glatten Muskels

Bewirkt der Anstieg der zytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine Kontraktion des glatten Muskels (A.2.), führt eine darauf folgende Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Dephosphorylierung der MLC durch die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (SMPP-1M für „smooth muscle myosin phosphatase“) und somit zur Relaxierung der glatten Muskulatur. Diese Verminderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann z.B. durch Aktivierung des NO/cGMP/cGKI Signalwegs erfolgen.

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) spielt als gasförmiger Botenstoff bei unterschiedlichsten physiologischen Prozessen wie z.B. bei der Blutdruckregulation, der Immunantwort oder beim Lernen eine Rolle (Rapoport et al., 1983; Kasperska-Zajac et al.,

2000; Jacklet, 1997; Feil et al., 2003; Feil et al., 2005 (a)). Seine gefäßerweiternde Wirkung wurde in den 80er Jahren entdeckt (Furchgott et al. 1980; Ignarro et al., 1987) und die Pionierarbeiten von Murad, Furchgott und Ignarro zur Bedeutung dieses Signalmoleküls 1998 mit dem Nobelpreis für Physiologie/Medizin ausgezeichnet. Insbesondere die Bedeutung von NO im kardiovaskulären System wird seitdem eingehend erforscht.

Im Organismus wird NO von NO-Synthasen (NOS) bei der Umwandlung der Aminosäure L-Arginin zu Citrullin gebildet (Abb. 1). NOS katalysieren dabei die Oxidation des terminalen Stickstoffs der Guanidinogruppe des L-Arginins zu NO (Loscalzo und Welch, 1995; Lloyd-Jones und Bloch, 1996). In der Familie der NOS sind bislang drei Isoformen bekannt. Man unterscheidet die beiden konstitutiv exprimierten, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Isoformen nNOS/NOS-1 und eNOS/NOS-3, die in Neuronen und Endothelzellen vorliegen, von der Kalzium-unabhängigen induzierbaren Isoform iNOS/NOS-2, die hauptsächlich in Makrophagen und Neutrophilen vorkommt.

NO kann leicht durch Zellmembranen diffundieren und in Zellen verschiedenste Reaktionen, wie z.B. die Entstehung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffradikale oder die ADP-Ribosylierung von Proteinen, auslösen. Ebenso aktiviert NO die lösliche Guanylylzyklase (sGC) durch Bindung an deren Hämgruppe, woraufhin die Bildung des intrazellulären sekundären Botenstoffes zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) katalysiert wird (Friebe und Koesling, 2003). cGMP kann auch durch die partikuläre Guanylylzyklase (pGC) generiert werden, deren Isoformen A, B und C u.a. durch natriuretische Peptide (ANP, BNP und CNP) aktiviert werden (Garbers und Lowe, 1994; Kuhn, 2003).

In eukaryotischen Zellen wurden bisher drei unterschiedliche Zielstrukturen für cGMP identifiziert. In der Retina oder im olfaktorischen System werden durch cGMP sog. „durch zyklische Nukleotide aktivierbare Ionenkanäle“ („cyclic nucleotide gated channels“; CNG Kanäle) geöffnet, ein Vorgang, der für die Signalverarbeitung im Seh- bzw. Riechprozess notwendig ist (Biel et al., 1998). Ebenso werden cAMP-spezifische Phosphodiesterasen (PDE) und dadurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration reguliert (Sonnenburg und Beavo, 1994). Die dritte Zielstruktur sind cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) (Pfeifer et al. 1999; Ruth, 1999), die u.a. zur Relaxierung des glatten Muskels (Pfeifer et al. 1998; Sausbier et al., 2000) beitragen. Die Mechanismen cGKI vermittelter Relaxierung werden in Abschnitt A.4.2. erläutert.

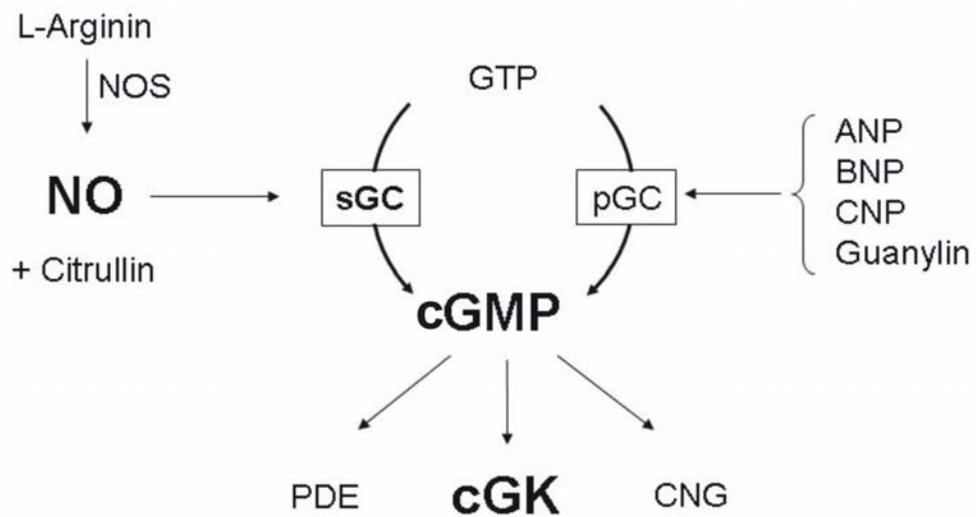


Abb. 1: Zelluläre Synthesewege von cGMP. Aus L-Arginin wird durch die NO-Synthasen (NOS) NO und Citrullin gebildet. NO aktiviert die lösliche Guanylylzyklase (sGC), die die Bildung von cGMP aus GTP vermittelt. cGMP kann zudem von der partikulären Guanylylzyklase (pGC) nach Aktivierung durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) oder Guanylin gebildet werden. cGMP-abhängige Effektoren sind Phosphodiesterasen (PDE), cGMP-abhängige Kinasen (cGK) und Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle).

A.4. cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs)

A.4.1. Struktur und Vorkommen der cGKs

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen, welche die Aminosäuren Serin und Threonin eines Substrates spezifisch phosphorylieren. Im Genom von Vertebraten existieren zwei verschiedene Gene, die für die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) und Typ II (cGKII) kodieren.

Es handelt sich um Homodimere, deren monomere Untereinheiten ein Molekulargewicht von 76-78 kDa (cGKI) bzw. von 87 kDa (cGKII) aufweisen. Sowohl die cGKI als auch die cGKII sind aus einer regulatorischen und katalytischen Domäne aufgebaut (Abb.2). Die regulatorische Domäne setzt sich aus einem Aminotermius, der in eine Isoleucin/Leucinzipper-Region und eine Linker-Region unterteilt werden kann, und zwei cGMP-Bindungstaschen zusammen. Der Aminotermius besitzt drei Funktionen:

- 1) Dimerisierung durch die Isoleucin/Leucinzipper-Region;
- 2) Autoinhibierung der katalytischen Domäne bei Abwesenheit von cGMP (Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000);
- 3) intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms (Atkinson et al., 1991; Hofmann et al., 1992).

Durch alternativen Transkriptionsstart zweier für den Aminotermius kodierender Exons entstehen die beiden Isoformen der cGKI: cGKI α und cGKI β , siehe A.4.3..

Die katalytische Domäne enthält eine ATP- und Substratbindungsstelle, letztere bewirkt das Übertragen des γ -Phosphatrests von ATP auf ein Serin oder Threonin des Substratproteins.

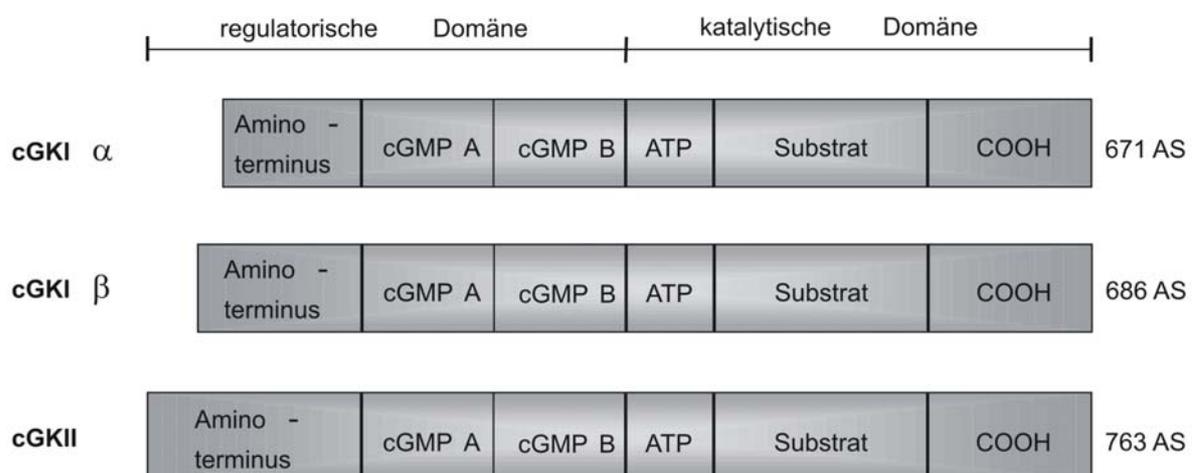


Abb. 2: Schematische Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.

Während sich cGKI und cGKII strukturell sehr ähnlich sind, unterscheiden sie sich jedoch in ihrer subzellulären Lokalisation, Gewebeverteilung und Funktion (Hofmann et al., 1992 und 2000).

Die membrangebundene cGKII wird im Thalamus, Bulbus olfactorius, Cortex, in Chondrozyten, in der Niere und im Bürstensaumepithel des Dünndarms exprimiert (El-Husseini et al., 1995; Markert et al., 1995; Pfeifer et al., 1996; Gambaryan et al., 1996). Die cGKII wird durch Myristoylierung in der Plasmamembran verankert. Nur die membrangebundene cGKII kann den CFTR Chloridkanal (zystische Fibrose Transmembran-Leitfähigkeitsregulator) phosphorylieren (Vaandrager et al., 1998).

Die Expression der löslichen cGKI erfolgt insbesondere in Thrombozyten (Waldmann et al., 1986), in Purkinjezellen des Kleinhirns (Lohmann et al., 1981) und in visceralen und vaskulären glatten Muskelzellen (Keilbach et al., 1992). Außerdem wird die cGKI auch in Endothelzellen von Blutgefäßen (Draijer et al., 1995), im Herz (Kumar et al., 1999), in Zellen der Nierengefäße (Joyce et al., 1986), in Spinalganglien (Qian et al., 1996), in neuromuskulären Endplatten (Chao et al., 1997) und in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Pryzwansky et al., 1995) sowie im Hippocampus (Kleppisch et al., 1999), exprimiert. Eine neue Studie zeigt, dass die cGKI in weiteren Hirnregionen sowie der Retina gebildet wird (Feil et al., 2005 (c)).

A.4.2. Wirkmechanismen der cGKs

Die cGKs regulieren eine Vielzahl physiologischer Mechanismen. Die cGKII ist an der Regulation der intestinalen Chlorid/Wasser-Sekretion durch die Phosphorylierung des CFTR Chloridkanals (Vaandrager et al., 1997; Pfeifer et al., 1996), der enchondralen Ossifikation des Knochenwachstums (Pfeifer et al., 1996) und der Reninfreisetzung in der Niere (Wagner et al., 1998) durch die Phosphorylierung noch unbekannter Proteine beteiligt.

Die cGKI, die u.a. die Aggregation von Thrombozyten hemmt (Horstrup et al., 1994; Massberg et al., 1999) sowie im Nervensystem viele Effekte von NO vermittelt (Feil et al., 2005 (a)), ist insbesondere zur Relaxierung des glatten Muskels wichtig (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000). Einige Mechanismen, die unter Beteiligung der cGKI zur Relaxierung führen, sind nachfolgend beschrieben und in Abb. 3 zusammengefasst:

Durch Phosphorylierung der Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle (BK_{Ca}) wird deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Membran und damit zum Schließen der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (z.B. der L-Typ Kalziumkanäle), wodurch die $[Ca^{2+}]_i$ sinkt (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999).

Neuere Studien haben gezeigt, dass die cGKI durch eine direkte Bindung RGS-2 phosphoryliert (RGS für „Regulator of G-protein signaling“), was zu dessen Bindung an das G_q -Protein führt (Tang et al., 2003). Dadurch erhöht sich die GTPase Aktivität des G-Proteins um ein Vielfaches (100-1000-fach), wodurch die Halbwertszeit des an das G-Protein gebundenen GTPs wiederum verringert wird (Hepler, 1999). Dies führt zur Hemmung des IP_3/Ca^{2+} -Signalweges (Yan, et al., 1997; Neill et al., 1997).

Durch Phosphorylierung des IP_3 -Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrates (IRAG) wird die $[Ca^{2+}]_i$ ebenfalls reguliert. IRAG bildet zusammen mit der cGKI β und dem IP_3 -Rezeptor 1 einen trimeren Komplex an der Membran des ERs (Schlossmann et al., 2000; Ammendola et al., 2001). Die Phosphorylierung von IRAG durch die cGKI β inhibiert den Kalziumausstrom aus den intrazellulären Speichern des ER.

Ein weiterer Mechanismus der cGKI-abhängigen Relaxierung glatter Muskeln ist die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit (MYPT1 für „myosin targeting subunit“) der SMPP-1M (Surks et al., 1999). Diese Phosphorylierung unterbindet eine weitere Phosphorylierung der SMPP-1M durch die MYPT1K (MYPT1K für „MYPT1 kinase“), welche die SMPP-1M deaktivieren würde. Durch verhinderte Deaktivierung der SMPP-1M erfolgt eine verstärkte Dephosphorylierung der MLC, wodurch eine Kontraktion unterbunden wird (Wooldridge et al., 2004).

Weitere Studien lieferten Hinweise einer Regulation der IP_3 -Synthese durch die cGKI über Inaktivierung der G_{α_q} oder Phosphorylierung der Phospholipase $C\beta_3$ (Ruth et al., 1993; Xia

et al., 2001; Tang et al., 2003). Dass diese Phosphorylierung für die Relaxierung der glatten Muskulatur von Bedeutung ist, konnte bisher nicht gezeigt werden.

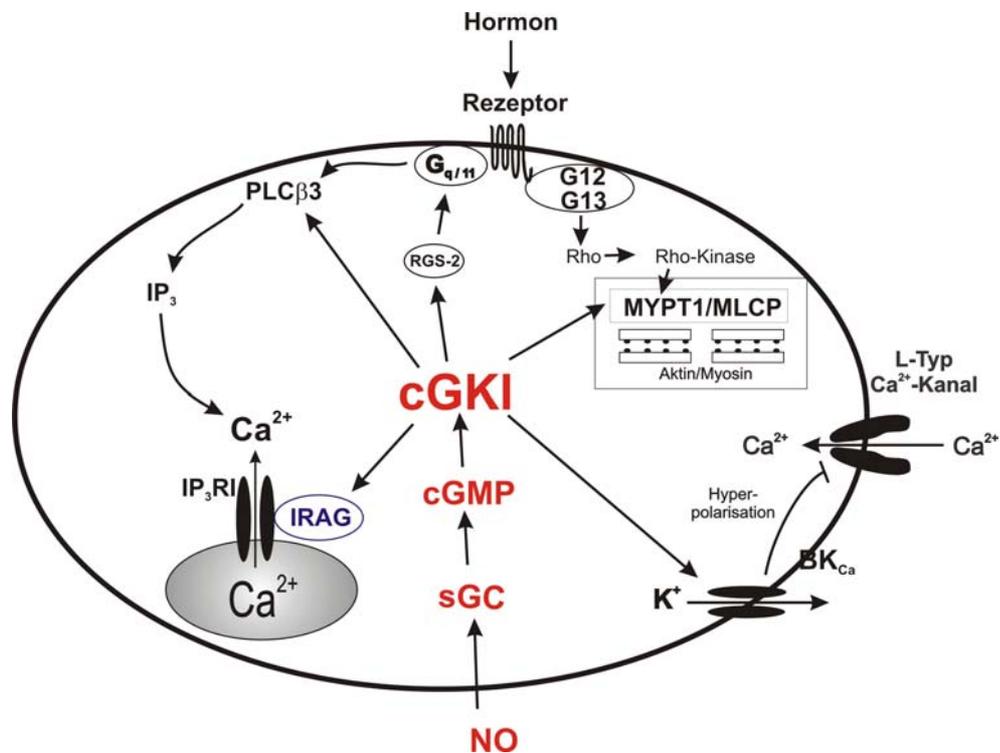


Abb. 3: Schema der cGKI-abhängigen Relaxierung der glatten Muskulatur. BK_{Ca}, RGS-2, IRAG, MYPT1 und PLCβ3 sind Substratproteine der cGKI. Die Phosphorylierung dieser Substrate bewirkt eine Relaxierung der glatten Muskulatur. Weitere Erklärungen im Text.

A.4.3. Isoformen der cGKI (cGKI α/β)

Durch alternativen Transkriptionsstart zweier für den Aminoterminus kodierender Exons entstehen die beiden Isoformen der cGKI: cGKI α und cGKI β . Beide Isoformen werden in einzelnen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Die Expression der α -Isoform erfolgt insbesondere in Herz, Lunge und Cerebellum, die β -Isoform wird in Neuronen des Hippocampus, des Olfaktorischen Bulbus und in Thrombozyten gebildet. Beide Isoformen werden in glatten Muskelzellen exprimiert. In Uterus, Aorta und Trachea erfolgt eine leicht erhöhte Expression der cGKI β im Vergleich zur cGKI α (Keilbach et al., 1992; Geiselhöringer et al., 2004 (a)).

cGKI α und cGKI β unterscheiden sich lediglich in ihren ersten ca. 100 Aminosäuren (AS), während eine sonstige Sequenzidentität beider Enzyme vorliegt (Wernet et al., 1989, Ruth et al., 1997). Da der Aminoterminus der cGKI u.a. die Affinität und das Zusammenwirken der beiden cGMP-Bindungsstellen und somit die Kinaseaktivität der Enzyme reguliert, bestehen zwischen den beiden Isoformen Unterschiede in ihrer Aktivierbarkeit. So benötigt die cGKI β

zur Aktivierung *in vitro* eine 15-fach höhere Konzentration an cGMP als die cGKI α (Ruth et al., 1991). Die Regulation der Substraterkennung erfolgt ebenfalls durch den Aminoterminus der cGKI (Lohmann et al., 1997), weshalb unterschiedliche Substratproteine beider Isoformen zu vermuten sind. Bisher konnte gezeigt werden, dass der Aminoterminus der cGKI α spezifisch mit der Myosin-Bindungsstelle der Myosin-Phosphatase (Surks et al., 1999) und der Aminoterminus der cGKI β spezifisch mit IRAG interagiert (Ammendola et al., 2001).

Die relative Bedeutung beider Isoformen bei der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ in glatten Muskelzellen konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Schlossmann et al. hemmten in einem *in vitro* Modell an transfizierten COS-7 Zellen die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch Aktivierung der cGKI β und Phosphorylierung von IRAG. Dies deutete auf eine wichtige Rolle der cGKI β bei der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ hin (Schlossman et al., 2000). Feil et al. zeigten, dass in Primärkulturen glatter Muskelzellen eine Hemmung der Hormon-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung durch Aktivierung der cGKI α nicht aber der cGKI β erfolgte (Feil et al., 2002).

Während die Biochemie beider Isoformen der cGKI erforscht ist, sind die jeweiligen zellulären *in vivo* Funktionen in glatten Muskelzellen noch immer weitgehend ungeklärt.

A.4.4. Konventionelle cGKI Knockout Mäuse (cGKI $^{-/-}$ Mäuse)

Die Inaktivierung der cGKI (cGKI $^{-/-}$) führte in Mäusen zu einem multiplen Phänotyp (Pfeifer et al., 1998). cGKI $^{-/-}$ Mäuse besitzen eine massiv reduzierte Lebenserwartung. Ca. 50% der Tiere sterben bereits innerhalb von 6-8 Wochen nach der Geburt. In cGKI $^{-/-}$ Tieren ist die Passagezeit der Nahrung gegenüber Kontrolltieren (CTR) stark verlängert. Zusätzlich weisen cGKI $^{-/-}$ Mäuse eine starke Dehnung von Magen und Darm und Anzeichen einer Pylorusstenose auf. Experimente mit Muskelpräparaten aus Magen und Pylorus haben gezeigt, dass die NO/cGMP-abhängige Relaxierung der intestinalen glatten Muskulatur gestört ist (Pfeifer et al., 1998). Die beeinträchtigte Relaxierung vaskulärer glatter Muskulatur in cGKI $^{-/-}$ Mäusen erzeugt bei jungen Tieren transient einen erhöhten basalen Blutdruck (Pfeifer et al., 1998). Ebenso ist die Fortpflanzungsfähigkeit männlicher cGKI $^{-/-}$ Tiere, die das Erwachsenenalter erreichen, aufgrund von Erektionsstörungen stark eingeschränkt (Hedlund et al., 2000). cGKI $^{-/-}$ Mäuse zeigen zudem eine gestörte Thrombozytenaggregation und Entzündungsantwort (Massberg et al. 1999, Werner et al., 2005). Aufgrund dieses multiplen Phänotyps ist die genaue Ursache der geringen Lebenserwartung der cGKI $^{-/-}$ Mäuse bislang unbekannt.

A.5. Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Generierung neuer *in vivo* Systeme zur Untersuchung der Funktion der cGKI-Isoformen (cGKI α/β) im glatten Muskel.

Zum einen sollten transgene Mauslinien erzeugt werden, die entweder die cGKI α - oder die cGKI β -Isoform selektiv in glatten Muskelzellen überexprimieren (SM-I α und SM-I β Linien). Zum anderen sollten transgene Mauslinien auf der Basis der cGKI^{-/-} Mäuse (A.4.4.) generiert werden, bei denen die Expression jeweils einer Isoform der cGKI in glatten Muskelzellen wiederhergestellt ist. An diesen Mäusen sollte die relative Bedeutung der jeweiligen Isoform im glatten Muskel, u.a. bei der cGMP-vermittelten Relaxierung, geklärt werden.

B. Material und Methoden

B.1. Bakterien und Plasmide

Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte in den *Escherichia coli* Stämmen XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)*]) und XL1-blue MRF' ($\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCN-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F'*proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^f)*]) (Stratagene). Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann und Low (1990).

Verwendete Plasmide:

Die zur Klonierung der „Targeting“-Vektoren verwendeten Plasmide sind mit ihrem jeweiligen Verwendungszweck in Tabelle 1 zusammengefasst. Diese Plasmide waren alle bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Feil zur Verfügung gestellt. Die genaue Vorgehensweise der Vektorkonstruktion ist in Abschnitt C.1.1. dargestellt.

Plasmid	Verwendungszweck
pUCI α cassette	Aminoterminus der cGKI α ; Common-Region der cGKI
pcDNA3/I β	Aminoterminus der cGKI β
pCreER(GR)L	Vektorbackbone; pA Rest
pCMV-cGKI α FL-EGFP	Common-Region der cGKI mit EGFP fusioniert
pUC18-SMcentral	5'Arm des SM22 α -Genortes
pSM3'(pBR322)	3'Arm des SM22 α -Genortes sowie Resistenz-Gene

Tabelle 1: Verwendete Plasmide.

B.2. Anzucht und Stammhaltung

B.2.1. Nährmedium

Die Kultivierung von Bakterien wurde in dem Vollmedium Luria-Bertani (LB-Medium) durchgeführt, welches zuvor 20 min bei 120°C und 1 bar autoklaviert worden war. Zur Herstellung von Festmedium wurden pro Liter LB-Medium 16 g Agar zugesetzt und ebenfalls

autoklaviert. Die Zugabe Temperatur-empfindlicher Zusätze erfolgte nach Sterilfiltration und Abkühlen des Mediums auf 50°C (Festmedium) oder vor Inokulation (Flüssigmedium).

Luria-Bertani Medium (LB-Medium); pH=7,4

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1l

B.2.2. Durchführung der Bakterienkultur

Zur Neukombination von DNS in bakteriellen Vektoren wurden gängige Methoden der enzymatischen Modifikation von DNS angewendet (Sambrook et al., 1989). Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte i.d.R. in dem *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm XL1-blue (Stratagene) in Gegenwart von Ampicillin. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte bei 37°C aerob in LB-Medium oder auf Festmedium-Agarplatten. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Bakteriensuspensionen auf Agarplatten ausgestrichen. *E. coli* Stämme können bei 4°C etwa 4 bis 6 Wochen lang aufbewahrt werden. Zur längeren Aufbewahrung wurden 0,5 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur mit 0,5 ml autoklaviertem Glycerin (80%) gemischt und bei -80°C gelagert.

B.2.3. Transformation von Bakterien

B.2.3.1. Transfer von DNS in *E. coli*

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von Plasmid-DNS in Bakterienzellen. Dazu müssen kompetente Zellen eingesetzt werden, die in der Lage sind, exogene DNS aufzunehmen. In dieser Arbeit wurde die Methode der Elektroporation durchgeführt. Hierbei können durch einen kurzen Hochspannungspuls lokale Perforationen der Zellhülle erreicht werden, wodurch die Transformation möglich ist. Unter geeignetem Selektionsdruck (Antibiotikazugabe) wird das in die Zelle eingeschleuste Plasmid stabil an Tochterzellen weitergegeben.

B.2.3.2. Herstellung elektrokompenter Zellen (Hanahan, 1983, modifiziert)

500 ml LB Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft und bis zu einem OD-Wert (optische Dichte) zwischen 0,5-0,7 unter leichtem Schütteln (175 rpm) angezogen. Die Bakterien wurden für 30 min auf Eis gekühlt und danach geerntet. Es folgten insgesamt drei Waschschrte, wobei das Zellpellet zunächst in 450 ml und 250 ml eisgekühltem Wasser, dann in 10 ml gekühltem 10%igem Glycerol

resuspendiert wurde. Nach dem letzten Abzentrifugieren wurde das Pellet je nach Größe in ca. 10 ml kaltem 10%igem Glycerol resuspendiert. 50 µl Aliquots der Zellsuspension wurden in vorgekühlte Eppendorfgefäße pipettiert und nach Schockgefrieren bei -80°C gelagert.

B.2.3.3. Durchführung der Elektroporation

Aliquots der eingefrorenen kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNS oder 100-500 ng aufgereinigtem Ligationsansatz (B.3.7.) vorsichtig gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem GenePulser™ und dem Puls Controller der Firma BioRad, wobei folgende Geräteeinstellungen vorgenommen wurden:

Spannung	2,5 kV
Kapazität	25 µF
Widerstand	200 Ω

Die durchschnittliche Zeitkonstante sollte bei 4,5 ms liegen. Nach der Transformation wurden die Bakterien in LB-Medium überführt und i.d.R. 60 min bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen. Erhaltene Klone wurden nach Plasmid-Isolierung (B.3.1.) durch geeignete Restriktions-Analyse (B.3.4.) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft.

B.3. Molekularbiologische Methoden zur Neukombination von DNS

B.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS

Für die Gewinnung hochwertiger Plasmid-DNS für präparative Zwecke (Klonierung und Sequenzierung) wurden die kommerziell verfügbaren Plasmid-Isolierungskits Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) und Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Alle benötigten Puffer und Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Prinzip dieser Isolierungsmethode ist der Zellaufschluß durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und eine anschließende DNS-Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Die Präparation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

B.3.2. Reinigung und Konzentration von DNS-Fragmenten

Mittels EtOH-Fällung erfolgte die Reinigung, Aufkonzentration und Umpufferung DNS-haltiger Lösungen. Ca. 50 µl der zu fällenden Probe wurden mit 5 µl einer Na-Acetat Lösung (3 M) versetzt, optional tRNS zugegeben und das 2,5 fache Volumen an 100%igem EtOH zugegeben. Die DNS wurde bei -80°C für 15 min präzipitiert und danach abzentrifugiert (4°C,

15 min, 18.000xg). Die gefällte DNS wurde mit 70%igem EtOH gewaschen. Nach Trocknen in der Speed Vac wurde die DNS in 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen.

Die Abtrennung amplifizierter PCR-Fragmente von Agenzien der PCR-Reaktion sowie die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch Verwendung des QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

B.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1,0:

- 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNS
- 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngiger RNS
- 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngigem Oligonukleotid

Die Reinheit von DNS und RNS kann aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

B.3.4. Spaltung von DNS mittels Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen (auch Restriktionsenzyme genannt) bilden eine Klasse bakterieller Enzyme, die Nukleinsäuren sequenzspezifisch spalten. Die Restriktionsendonukleasen lassen sich in drei Gruppen unterteilen, wobei in dieser Arbeit nur Enzyme des Typs-II verwendet wurden. Diese Enzyme schneiden DNS innerhalb der Erkennungssequenz von vier bis acht Basen, die palindromisch aufgebaut ist. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung DNS-Fragmente mit Einzelstrangüberhängen oder Fragmente mit komplett basengepaarten glatten Enden. Restriktionsfragmente mit Einzelstrangüberhängen können durch Basenpaarung mit Fragmenten, die durch das gleiche Restriktionsenzym entstanden sind, assoziieren, wodurch eine enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) möglich ist.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme und Erkennungssequenzen sind in Tabelle F.2. zusammengefasst.

Restriktionsansätze wurden bei 37°C durchgeführt, wobei die Verdauzeit eines analytischen Ansatzes 1,5-2 h und eines präparativen Verdaus 8-10 h betrug. Je nach Ansatz und Enzym wurden zwischen 3 bis 10 Einheiten (U) Enzym eingesetzt. Ein U Restriktionsendonuclease entspricht der Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 μg Substrat-DNS in einer Stunde unter optimalen Bedingungen vollständig zu schneiden.

Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch auf Korrektheit und Vollständigkeit hin untersucht (B.3.8.).

B.3.5. T4-Polish

Um DNS Fragmente mit Einzelstrangüberhängen (B.3.4.) in Fragmente mit komplett basengepaarten glatten Enden zu überführen, wurde die T4-Polymerase verwendet. Zu der geschnittenen DNS wurden 5 μ l 2 mM dNTPs und 2 μ l T4-Polymerase gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Erhitzen (75°C, 15 min) inaktiviert.

B.3.6. Dephosphorylierung linearer DNS durch alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP "calf intestine phosphatase") spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNS-Molekülen ab. Durch ein Restriktionsenzym linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluss (Religation) während der Ligation zu verhindern und so die Klonierungseffizienz von Fremd-DNS zu erhöhen. Mit der gereinigten, linearisierten DNS (ca. 5 pmol) wurde 1 U CIP (Roche) und dazugehöriger Puffer für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durchgeführt (75°C, 10 min).

B.3.7. Verknüpfung von DNS-Fragmenten durch T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende doppelsträngiger DNS oder RNS. Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden. Die Ligase wurde verwendet, um Fremd- und Vektor-DNS kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNS zu verknüpfen. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNS wurden in Ligasepuffer gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend durch Gelelektrophorese analysiert und durch EtOH-Fällung (B.3.2.) in Anwesenheit von t-RNS zur nachfolgenden Transformation gereinigt.

B.3.8. Auftrennung von DNS-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen, weshalb sie im elektrischen Feld zur Anode wandern. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Gelelektrophorese zu Nutze. DNS-Fragmente werden im elektrischen Feld in Agarosegelen nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär und superhelikal) aufgetrennt, wobei Fragmente umgekehrt proportional zum log der Fragmentlänge wandern. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können getrennte Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNS-Standard (1 kb Ladder, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer die Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol zugegeben.

Die zu isolierende DNS-Bande wurde möglichst rasch im UV-Licht sichtbar gemacht, der entsprechende Gelbereich ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Die DNS wurde anschließend mittels QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) isoliert (B.3.2.).

verwendete Lösungen:

10x TBE

Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA, pH 8,0	20 mM

Elektrophoresepuffer

1x TBE (10x TBE mit H₂O_{bidest} verdünnt)

Auftragspuffer (6x dye)

Ficoll Typ 400	18% (w/v)
EDTA, pH 8,0	0,12 mM
TBE	6x
Bromphenolblau	0,1% (w/v)
Xylencyanol FF	0,1% (w/v)

Ethidiumbromidstammlösung

10 mg/ml, wässrig

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 0,1 bis 15 kb wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) verwendet. 1-2% (g/v) Agarose (SeakemLE, Biozym) wurden in 1x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen. Vor dem Gießen des Gels in einer horizontalen Kammer wurde Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 300 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE als Laufpuffer bei 150 V.

B.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaktion“, PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro*-Amplifikation definierter DNS-Segmente aus einem Gemisch von Nukleinsäuren an einem DNS-Template (Saiki et al., 1988). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess und beruht auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNS-Polymerase (Taq-Polymerase). Durch die mehrfache Wiederholung eines Replikationszykluses (Denaturierung, Primeranlagerung, Polymerisation) wird eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den beiden Primern liegenden DNS-Abschnittes erreicht. Durch Basenaustausch in den Sequenzen verwendeter Primer ermöglicht die PCR-Analyse es auch gerichtet Mutationen in der Sequenz des Produktes einzuführen. Dadurch können z.B. neue Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme generiert werden (C.1.1.).

B.4.1. PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Sequenzen und Genlokalisierung sind in Tabelle F.1. zusammengefasst. Die lyophilisierte Primer-DNS wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen und Lösungen der Konzentration $100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ hergestellt. Arbeitslösungen der Konzentration $25 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ und $0,8 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ wurden durch Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ hergestellt.

B.4.2. Reagenzien

Folgende Polymerasen wurden verwendet:

Taq DNS Polymerase ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$, Roche) zur Amplifikation kurzer Fragmente.

“**Expand™ Long Template PCR System**” ($3,5 \text{ U}/\mu\text{l}$; Roche) Gemisch aus Taq und Pwo DNS Polymerase.

Die Reaktionsansätze wurden gemäß den Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Arbeitslösung der dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP [NEB]) wurden auf 10 mM eingestellt.

B.4.3. Standard-PCR

(für DNS-Fragmente bis ca. $1,5 \text{ kb}$)

10x PCR Puffer (mit dNTPs)

KCl	500 mM
Tris-HCl	100 mM, pH 8,0
MgCl ₂	15 mM
dNTPs	je 2 mM

Ansatz:

DNS (ca. 10 ng Plasmid oder 500 ng genomische DNS)	2 µl
Primer A (25 pmol/µl)	0,25 µl
Primer B (25 pmol/µl)	0,25 µl
evtl. Primer C (25 pmol/µl)	0,25 µl
10x PCR-Puffer (mit dNTPs)	2,5 µl
Taq-DNS Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl

Standardbedingungen der Amplifikation:

initiale Denaturierung	94°C, 5 min	
Denaturierung	94°C, 15 sec	} 35x
Primeranlagerung (Annealing)	55°C, 30 sec	
Polymerisation (Elongation)	72°C, 30 sec	
finale Polymerisation (Elongation)	72°C, 5 min	

Die Standardbedingungen wurden je nach Größe des zu amplifizierenden DNS-Fragmentes und in Abhängigkeit der verwendeten Primer optimiert. Amplifizierte DNS-Fragmente, die zur Konstruktion von Plasmiden eingesetzt wurden, sind sequenziert worden, um mögliche Fehler der Polymerasen zu erkennen (B.5).

B.4.4. Long-Template-PCR (“Long Range PCR”)

(für Amplifikate größer als 1,5 kb)

Ansatz:**Mix 1:**

DNS	2-5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
Primer I (25 pmol)	0,6 µl
Primer II (25 pmol)	0,6 µl
DMSO	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl

Mix 2:

10xPuffer	5 µl
Taq +Pwo (Roche)	0,8 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl

Mix 1 und Mix 2 zusammen geben und PCR Reaktion durchführen.

B.4.5. RT-PCR

Die RT-PCR (RT für „Reverse Transcription“) wird zur Herstellung von cDNS aus mRNS eingesetzt. Diese Methode besteht aus zwei Einzelschritten. Der erste Schritt macht sich die Fähigkeit viraler Reverser Transkriptasen zu nutze, RNS in DNS zu transkribieren. Diese kann dann durch eine PCR Strategie amplifiziert werden. Um bei der RNS-Gewinnung (B.7.10.2.) evtl. verschleppte DNS zu entfernen, muss vor der RT-PCR ein DNase-Verdau durchgeführt werden.

DNase-Verdau

Zur Durchführung der RT-PCR wurde die gewonnene RNS zunächst mit DEPC-(Diethylcarbonat)-Wasser ohne dNTPs auf 0,1 µg/µl eingestellt. DEPC hemmt durch Modifizierung von Histidinresten zu N-Carbethoxyhistidin Enzyme, unter anderem auch RNAsen. Danach wurde die RT-PCR-Reaktion durchgeführt.

RT-PCR-Ansatz

RNS (0,5 µg)	5 µl
10x RT-Puffer (mit dNTPs)	5 µl
Primer A (0,25 pmol/µl)	0,5 µl
Primer B (0,25 pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 45 µl

Standardbedingungen zur Reversen Transkription

Denaturierung	94°C, 5 min
auf 50°C abkühlen lassen	(von 94°C auf 50°C in 10 min; 0,07 °C/sec)
5 µl MMLV-RT (10 U/µl) zugeben	50°C, 20 Minuten
Taq Polymerase zugeben, 2,5 U	
Danach PCR unter Standardbedingungen (siehe B.4.3.) durchführen	

B.5. Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). DNS-Fragmente werden dabei mittels "Terminator Cycle Sequenzierung" enzymatisch synthetisiert und durch den Einbau verschiedener, fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Nach Einbau eines solchen markierten Didesoxynukleotids kommt es zu einem Kettenabbruch, wodurch Fragmente verschiedener Länge entstehen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem Sequenzierautomaten ("ABI Prism™ Sequence-Analyser", Perkin-Elmer Applied Biosystems). Dabei erkennt ein Laser die Abfolge fluoreszenzmarkierter DNS-Fragmente, die durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt worden sind. Mittels Computer wird die Sequenz aus den Rohdaten errechnet (Multiscan 100ES, Sony).

Durchführung des "Terminator Cycle Sequenzierung":

Ansatz

DNS (50-500 ng)	2 µl
Ready Reaction Mix ^a (RRM)	4 µl
Primer (0,8 pmol/µl)	4 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

^a enthält AmpliTaq DNS Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Perkin Elmer Applied Biosystems)

Synthese der DNS-Abbruchfragmente

Denaturierung	95°C, 2 min	} 25x
Denaturierung	95°C, 30 sec	
Primeranlagerung	50°C, 40 sec	
Polymerisation	60°C, 4 min	

Die Reinigung der Sequenzierprodukte erfolgte mit "Centri Sep Spin Columns" (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach Vorgaben des Herstellers.

Die getrocknete DNS wurde in 20 µl "Template Suppression Reagent" (Perkin-Elmer Applied Biosystems) gelöst und vor der Analyse 3 min bei 95°C denaturiert.

B.6. Radioaktive Southernblot-Analyse

Als "Southernblotting" (Southern, 1975) bezeichnet man ein Verfahren, bei dem DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran übertragen und dort immobilisiert werden. Das im Gel vorliegende Trennmuster der DNS-Fragmente bleibt dabei erhalten. Durch Hybridisierung der Membran mit einer ^{32}P -markierten DNS-Sonde können DNS-Fragmente lokalisiert werden, die eine zur Sonde komplementäre Region enthalten.

In dieser Arbeit wurde das „Southernblotting“ zum Nachweis korrekt rekombinierter ES-Zell-Klone eingesetzt.

B.6.1. Isolierung von DNS aus 96 Loch Platten

Lösungen

Lysepuffer für 96 Loch Platten

NaCl	10 mM
Tris-HCl	10 mM, pH 7,5
EDTA, pH 8,0	10 mM
N-Laurylsarcosine	0,5% (w/v)

bei RT lagern

+25 mg/ml Proteinase K (immer frisch zugeben)

Proteinase K (Roche)

50 mg/ml in 1x TE

EtOH/NaCl

10 ml 100% EtOH
+150 μl 5 M NaCl

Durchführung

In jedes Loch einer 96 Loch Platte wurden 50 μl Lysepuffer pipettiert und die Platte über Nacht bei 59°C inkubiert (Platte wegen Verdunstungsgefahr mit Parafilm umkleben, in Frischhaltefolie einwickeln und in einem geschlossenen Gefäß inkubieren). Am nächsten Morgen wurde die Platte auf RT abgekühlt und die DNS durch Zugabe von je 100 μl EtOH/NaCl (150 μl 5 M NaCl in 10 ml 96% EtOH) pro Loch gefällt, wobei die DNS an der Plastikoberfläche haftete. Nach vorsichtigem Abkippen des Fällungsreagenz wurde zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen, danach die Platte schräg zum Trocknen aufgestellt.

Für die Southernblot-Analyse wurde ein Restriktionsverdau (B.6.2.) durchgeführt, zur Analyse mittels PCR wurde die DNS in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst. Getrocknete oder gelöste DNS kann bei -20°C gelagert werden.

B.6.2. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der isolierten DNS erfolgte direkt in der 96 Loch Platte. Der Enzymmix wurde auf die getrocknete DNS gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Enzymmix (je Loch)

10x Puffer	5 µl
100x BSA	0,5 µl
Restriktionsenzym (10-50 U/µl)	1-3 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

B.6.3. Durchführung des Southernblots

Lösungen

Hybridisierungslösung (Church-Puffer)

BSA	1%
Na-Phosphat-Puffer	0,5 M; pH 7,4
SDS 10%	7%
EDTA,	1 mM; pH 8,0
ssDNS (Sigma)	0,1 mg/ml
bei RT lagern	

10x SSC; pH 7,0

NaCl	1,5 M
Natriumcitrat	0,15 M
bei RT lagern	

10x TE

Tris-HCl	0,1 M pH 8,0
EDTA	10 mM; pH 8,0
autoklavieren	
bei RT lagern	

Waschlösung

SSC	0,4x bis 2x
SDS	0,1%
bei RT lagern	

Die mittels Restriktionsverdau fragmentierte DNS wurde durch Agarosegelelektrophorese (i.d.R. 0,8% Agarose in 1x TBE) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit angelegtem Lineal fotografiert.

Zur Depurinierung wurde das Gel nach Elektrophorese 15 Minuten lang in 0,4 M HCl geschwenkt (Verfärbung des Farbmarkers nach gelb) und kurz in H₂O gewaschen. Die Denaturierung der DNS erfolgte durch Schwenken in einer Mischung aus 0,5 M NaOH/1,5 M

NaCl für 30 Minuten (Verfärben des Farbmärkers nach blau). Abschließend wurde das Gel in einem Bad aus 0,5 M Tris (pH 7,5)/3 M NaCl für 45 Minuten neutralisiert. Über Nacht erfolgte der Transfer der DNS aus dem Gel auf die Trägermembran ("HybondTM-N", Amersham Biosciences).

Aufbau des Southernblots:

In einer mit 10x SSC gefüllten Metallwanne wurde ein Schwamm gelegt, der etwas größer als das Gel und die Trägermembran war. Nachdem der Schwamm gut mit 10x SSC getränkt war, wurden drei Lagen Gelblottingpapier (Whatman GB002) darauf platziert, diese ebenfalls mit 10x SSC getränkt und nun das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Die in H₂O_{bidest} getränkte und auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran wurde luftblasenfrei aufgelegt und mit drei Lagen 10x SSC getränktem Gelblottingpapier bedeckt.

Durch Auflegen einer dicken Lage Zellstoff, welche durch ein Gewicht beschwert wurde, erfolgte der Transfer der DNS durch Kapillarkräfte auf die Trägermembran.

Prähybridisierung:

Nach dem Transfer (12-16 h) wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen mit Bleistift markiert und die Membran zurechtgeschnitten. Zur Immobilisierung der DNS auf der Membran wurde diese mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker, Stratagene) und 1 h bei 80°C getrocknet. Die Membran mit der immobilisierten DNS wurde mit 50 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung in einem Hybridisierungsbeutel (Research Product International Corp.) eingeschweißt und im Wasserbad für 4 h bei 60°C prähybridisiert.

Herstellung ³²P-markierter DNS-Sonden durch „Random-Primed Labeling“:

Die DNS-Sonde (ca. 130 bp) wurde durch Restriktionsverdau aus dem Plasmid (pSM3') ausgeschnitten (B.3.4.) und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektroelution aufgereinigt. Etwa 100 ng Sonden-DNS dienten als Matrize zur Markierung mit dem „NEBlot™ Kit“ (New England Biolabs) nach Vorschrift des Herstellers mit α³²P-dCTP (10 µCi/µl, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH). Anschließend wurde die gelabelte DNS durch Säulen-chromatographie über eine „Nick™Column“ (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) nach Herstellerangaben von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und mit 500 µl 1x TE eluiert. Die Messung der spezifischen Aktivität der ³²P-markierten Sonde erfolgte durch Szintillationszählung (ca. 1x10⁵ cpm/µl). Anschließend wurde die DNS-Sonde 10 Minuten lang aufgeköcht und bis zur Hybridisierung auf Eis aufbewahrt.

Hybridisierung:

Zur Hybridisierung wurde die Sonde auf eine Konzentration von 5×10^6 cpm/ml in Hybridisierungslösung verdünnt und diese dann in einer Hybridisierungstasche auf die prähybridisierte Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Schüttel-Wasserbad bei 60°C. Am nächsten Tag wurde die Membran aus der Tasche genommen und mehrfach mit Waschlösung im Wasserbad gewaschen. Dabei wurde die Stringenz schrittweise durch eine Erniedrigung des Salzgehaltes der Waschlösung und durch eine Temperaturerhöhung bis auf 72°C gesteigert. Es wurde solange gewaschen, bis die Radioaktivität des Blots unter 50 Raten pro Sekunde gefallen war. Die Membranen wurden auf Filterpapier getrocknet und in Plastikfolie eingeschlagen. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte durch Erstellen eines Autoradiogramms. Dazu wurden die Membranen auf Phosphoimagerplatten (BAS-MP) gelegt und zwischen 24-72 h exponiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphoimager der Firma Raytest (BAS-1500).

B.7. Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

1989 beschrieb Capecchi die Methode des „Gene Targeting“, die es erlaubt, definierte Mutationen in das Erbgut von Mäusen einzubringen (Capecchi, 1989). Seit dieser Zeit hat sie sich zu einem wichtigen Werkzeug der Generierung genetisch veränderter Mäuse etabliert. Die Technik des „Gene Targeting“ beruht im wesentlichen darauf, dass pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus *ex vivo* kultiviert, gezielt genetisch verändert und wieder in die Keimbahn der Maus eingebracht werden. Die notwendigen Schritte zur Herstellung einer genetisch veränderten Mauslinie sind in Abb. 3 dargestellt. Die detaillierte Methodik wird in den nachfolgenden Kapiteln genauer dargestellt. Die Generierung einer Mausmutante ist sehr zeitaufwendig und benötigt ca. 2-3 Jahre. Genauere Ausführungen zur Theorie und Praxis des „Gene Targeting“ sind der Fachliteratur zu entnehmen (Wassermann & DePamphilis, 1992; Hogan et al., 1994; Schenkel, 1995; Torres & Kühn 1997; etc).

B.7.1. Lösungen und Nährmedien

DMEM

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (Gibco-BRL), mit Glutamax^{ITM} (Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin), 4500 mg/l D-Glukose und Natriumpyruvat,
Lagerung bei 4°C

FBS

fötales Rinderserum (Gibco-BRL), Eignung für die ES-Zellkultur testen und größere Charge reservieren vor Gebrauch hitzeinaktivieren (30 min, 56°C)
Aliquots à 50 ml bei -20°C lagern

LIF

Maus „Leukämie-inhibierender Faktor“ („ESGROTM“, Chemicon, 1x10⁷ U/ml)
Arbeitslösung: 0,5x 10⁶ U/ml EF-Medium, sterilfiltrieren,
Aliquots à 1 ml bei 4°C lagern

2-Mercaptoethanol (β-ME) (Sigma)

Arbeitslösung: 50 mM, Endkonzentration: 0,1 mM, sterilfiltrieren,
Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

G418

Geneticin®/G418-Sulfat (Gibco-BRL)
Endkonzentration: 0,4 mg/ml
Aliquots à 5 ml bei -20°C lagern,

GANC

Cymeven®/Ganciclovir-Natrium (Roche)
Endkonzentration: 2 µM
Aliquots à 50 µl bei -20°C lagern,

EF-Medium (Feederzellen)

DMEM 450 ml
FBS 50 ml

ES-Medium (ES-Zellen)

DMEM 400 ml
FBS 100 ml
500x LIF 1 ml
500x β-Me 1 ml

Selektionsmedien

ES/G418-Medium: ES-Medium + Zusatz von 5 ml 100x G418 (Endkonzentration 0,4 mg/ml)

ES/G418/GANC-Medium: ES/G418-Medium + Zusatz von 50 μ l 10^4 x GANC (Endkonzentration 2 μ M)

Kulturgefäß	Fläche	Medium-Volumen	Trypsin-Volumen
Flasche	175 cm ²	20 ml	5 ml
Flasche	75 cm ²	15 ml	3 ml
Petrischale	55 cm ²	10 ml	2 ml
Flasche	25 cm ²	5 ml	2 ml
6 Loch Platte	6 x 9 cm ² =54 cm ²	3 ml/Loch	700 μ l/Loch
24 Loch Platte	24 x 2,3 cm ² =55 cm ²	1 ml/Loch	300 μ l/Loch
96 Loch Platte	96x 0,32 cm ² =31 cm ²	200 μ l/Loch	30 μ l/Loch

Tabelle 2: Zellkultur Parameter.

B.7.2. Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

ES-Zellen sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden. Sie lassen sich kultivieren, genetisch manipulieren und wieder in Ammenmäuse reimplantieren. Allerdings können aus ES-Zellen nur dann Mauslinien etabliert werden, wenn sie in der Keimbahn der Mäuse weitergegeben werden. Um die „Keimbahngängigkeit“ der ES-Zellen zu erhalten bzw. um eine Differenzierung der Zellen zu verhindern, muss ihre Kultivierung unter optimalen Bedingungen erfolgen. Da die Differenzierung von ES-Zellen in Anwesenheit des Maus „Leukämie-inhibierenden Faktors“ (LIF) unterdrückt wird, wurde dem Nährmedium LIF zugegeben. Darüber hinaus wurden die ES-Zellen auf einem Zellrasen embryonaler Fibroblasten („Feederzellen“) kultiviert, die neben anderen Wachstumsfaktoren auch LIF bilden. Dadurch bleiben die ES-Zellen pluripotent und proliferieren weiterhin ohne zu differenzieren. Eine hohe Zelldichte und Passagenzahl (>25) sollte vermieden werden, da dadurch die Keimbahngängigkeit beeinträchtigt werden kann.

In dieser Arbeit wurden R1 ES-Zellen (Nagy et al., 1993) verwendet, die aus Blastozysten von agouti-farbenen 129/Sv Mäusen gewonnen wurden (Passage 15 vom Februar 1999).

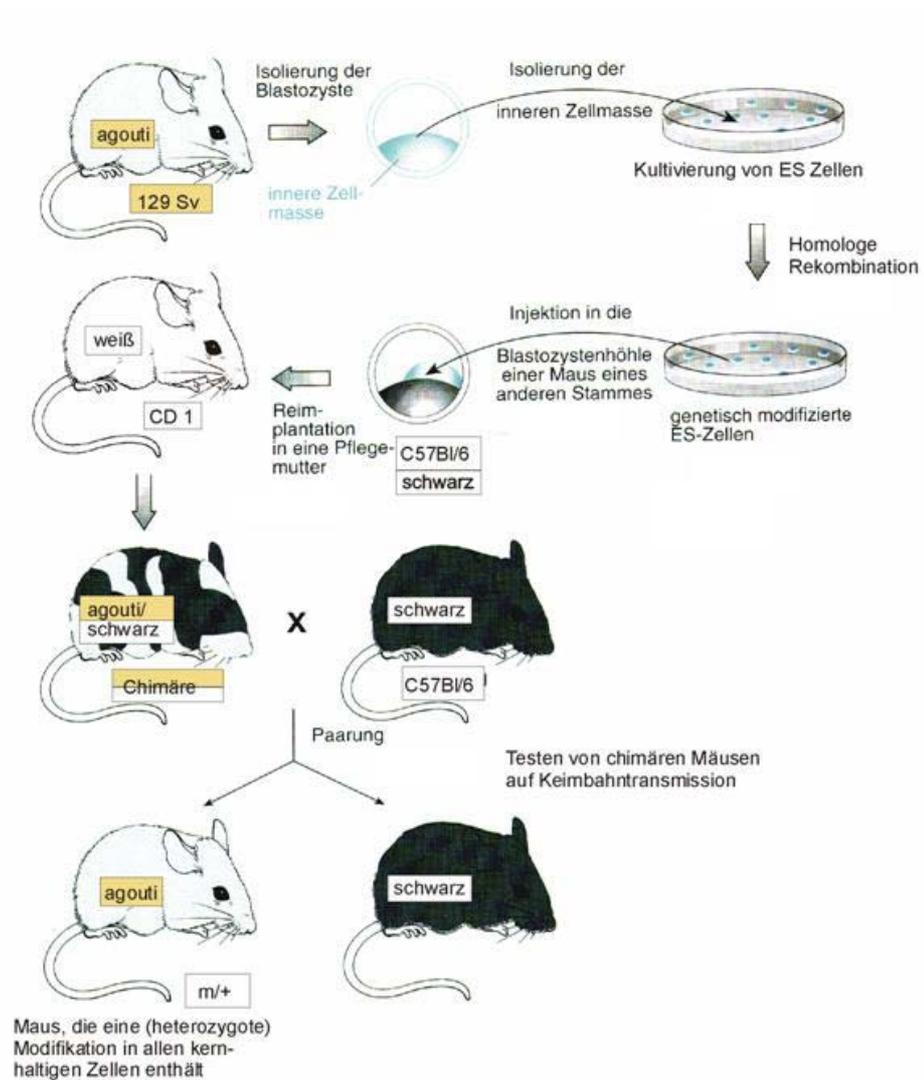


Abb. 4: Herstellung genetisch veränderter Mäuse. Modifiziert nach Strachan und Read, 1996; weiter Erläuterungen im Text.

B.7.3. Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten („Feederzellen“) wurden aus Embryos am Tag 14,5 p.c. isoliert. Um die Selektion rekombinanter ES-Zellen mit G418 zu überleben, müssen die Feederzellen ein Neomycinresistenzgen besitzen. Für die Erzeugung der Embryos wurden Mäuse, die homozygot ein Neomycinresistenzgen enthalten, mit Wildtyp Mäusen (WT) verpaart. In dieser Arbeit wurden für die Verpaarung $CNG3^{-/-}$ Mäuse verwendet (freundlicherweise von Herrn Prof. M. Biel, Department Pharmazie, LMU München zur Verfügung gestellt). Aus einem Embryo konnten Feederzellen für die Kultivierung in 2 Zellkulturflaschen (175 cm²)

gewonnen werden. Die Zellen einer 90-100% konfluent bewachsenen Flasche wurden durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen teilungsunfähig gemacht und bis zur ihrer Verwendung eingefroren. Jede Präparation von Feederzellen wurde vor Gebrauch auf ihre Eignung für die Kultivierung von ES-Zellen getestet. Je nach Qualität und Quantität (Passagenzahl) konnte der eingefrorene Inhalt einer Zellkulturflasche (175 cm²) auf 100-200 cm² ausgebracht werden.

Durchführung

- Verpaarung von CNG3^{-/-} Männchen mit je 2 C57BL/6 Weibchen; Weibchen mit Vaginalpfropf (Plug) am Tag 0,5 p.v. separieren
 - 1-3 schwangere Weibchen am Tag 14,5 p.c. töten, in EtOH baden und Uterus entnehmen, Embryos in Petrischale mit PBS legen, den Kopf und alle blutführenden Gewebe entfernen
 - Torso in kleine Stücke schneiden und mit 1 ml Trypsin pro Embryo 10 min bei 37°C inkubieren
 - Gewebe mit Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml) mechanisch zerkleinern, 5 min bei 37°C inkubieren und mit einer 2 ml Pipette gut homogenisieren
 - Pro Embryo 2 Zellkulturflaschen (175 cm²) ansetzen; bei 37°C und 6% CO₂ bis zu 90-100%iger Konfluenz wachsen lassen (4-6 Tage)
 - Zellen trypsinieren, ca. 80% der Zellsuspension entnehmen, den Rest weiter kultivieren (steigende Passagezahl)
 - Entnommene Zellen zur Teilungsinhibition mit 5000 Rad bestrahlen
 - Zellen zentrifugieren (RT, 5 min, 180xg) und in 3 ml Einfriermedium (90% EF-Medium + 10% DMSO) pro geernteter Flasche aufnehmen, Aliquots von 1 ml in flüssigem Stickstoff lagern
- Es können bis zu 6 Passagen gewonnen werden.

B.7.4. Allgemeines Vorgehen bei der Kultivierung von ES-Zellen

B.7.4.1. Auftauen und Aussäen von Gefrierkulturen

Eingefrorene, in Kryoröhrchen gelagerte Kulturen wurden im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut. Der Inhalt (1 ml) wurde in 4 ml ES-Medium aufgenommen, zentrifugiert (RT, 5 min, 180xg) und die Zellen in ES-Medium suspendiert. Der Inhalt eines Kryoröhrchens konnte i.d.R. auf eine Fläche von 50 cm² ausgesät werden.

B.7.4.2. Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 6% CO₂ in ES-Medium. Am Abend vor dem Ausbringen der ES-Zellen wurden Feederzellen aufgetaut und in ES-Medium ausgebracht. Am nächsten Morgen wurden ES-Zellen in ES-Medium auf die Feederzellen ausgebracht. Jeden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei 60-80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst (5-10 min bei 37°C), das Trypsin durch Zugabe des ein- bis zweifachen Volumens ES-Medium deaktiviert, suspendiert, zentrifugiert (RT, 5 min, 180xg) und auf das 3-fache der ursprünglichen Fläche ausgesät (1:3 „Splitting“). Bei jedem Ablösen mit Trypsin stieg die Passagenzahl.

Je nach Kulturgefäß bzw. Fläche wurden verschiedene Volumina an Medium und Trypsin benötigt (Tabelle 2).

B.7.4.3. Anlegen von Gefrierkulturen

Die Zellen einer ca. 80% konfluenten Zellkulturflasche (75 cm²) wurden mit 3 ml Trypsin abgelöst (37°C, 5-10 min), 10 ml ES-Medium zugegeben, suspendiert und zentrifugiert (RT, 5 min, 180xg). Das Zellpellet wurde in 6 ml Einfriermedium (90% ES-Medium + 10% DMSO) aufgenommen, Aliquots à 1 ml in Kryoröhrchen abgefüllt, bei -80°C eingefroren (ca. 24h) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

B.7.5. Homologe Rekombination in ES-Zellen

Das „Targeting“ chromosomaler DNS über homologe Rekombination in ES-Zellen ermöglicht die gezielte Einführung von Mutationen in das Genom von Mäusen. Das Prinzip des „Gene Targeting“ ist in Abb. 5 dargestellt. Mit Hilfe kurzer Hochspannungsimpulse wird die Permeabilität der Zytoplasmamembran kurzzeitig erhöht (Elektroporation), so dass der „Targeting“-Vektor in das Innere der Zellen eingeschleust wird. Die DNS wird nun entweder durch zweifaches „crossing over“ homologer Regionen gezielt an einen vorbestimmten Genort eingebaut (homologe Rekombination; Abb. 5A), zufällig in das Genom integriert (Abb. 5B) oder aber überhaupt nicht eingebaut. Um diejenigen ES-Zellen anzureichern, die die fremde DNS in ihr Genom integriert haben, enthält das „Targeting“-Konstrukt Selektionsmarker, z.B. ein Neomycinresistenz-Gen (neo) und ein Herpes simplex Virus Thymidinkinase-Gen (tk). Nur Zellen, die das neo-Gen enthalten, können in Anwesenheit von G418 wachsen (positive Selektion). Das tk-Gen wird außerhalb der homologen Region des „Targeting“-Konstrukts platziert, so dass es nach homologer Rekombination nicht erhalten bleibt, während es bei zufälliger Integration der DNS meist ebenfalls in das Genom eingebaut wird (Abb. 5B). In Gegenwart von Ganciclovir wachsen nur Zellen, die das tk-Gen nicht enthalten (Negativselektion), so dass ES-Zell-Klone mit homologer Rekombination gegenüber Zellen mit zufälliger Integration des „Targeting“-Vektors angereichert werden. Die Frequenz der homologen Rekombination ist von der Länge und Isogenität der zum Zielgen homologen Arme des „Targeting“-Konstrukts abhängig (langer Arm ≥ 3 kb; kurzer Arm ≥ 1 kb).

Für das „Targeting“ von ES-Zellen muss ein Zeitraum von ca. 4-5 Wochen veranschlagt werden. Die Frequenz, mit der man korrekt modifizierte ES-Zell-Klone erhält, beträgt je nach Zielgen, DNS-Konstrukt und Selektionsmethode ca. 0,1-10%, d.h. man sollte etwa 500 bis 1000 Klone isolieren (B.7.5.6.) und analysieren (B.7.6.).

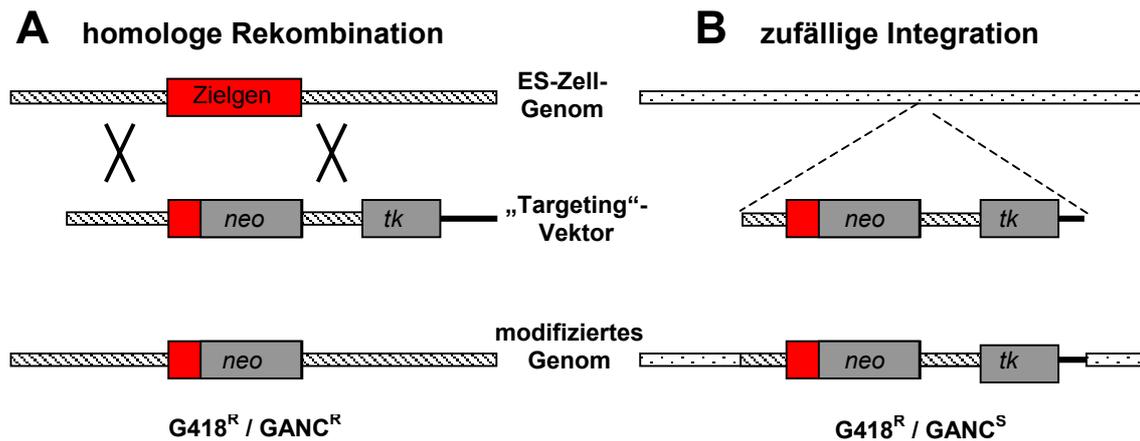


Abb. 5: Homologe Rekombination und zufällige Integration. (A) Homologe Rekombination. Kreuze deuten das „crossing over“ homologer Regionen des Genoms und „Targeting“-Vektors an. (B) Zufällige Integration. Linien deuten nicht homologe Integration an.

B.7.5.1. Vorbereitung der DNS

25-50 μg der „Targeting“-Vektor-DNS wurden durch Restriktionsverdau mit *AscI* linearisiert, mit EtOH gefällt (B.3.2.) und unter einer Sterilbank getrocknet. Nach Lösen in 100 μl PBS wurde mit Hilfe eines Agarosegels die DNS-Konzentration abgeschätzt. 2-5 pmol (entspricht ca. 20-50 μg eines 15 kb Konstrukts) linearisierte DNS wurde für die Elektroporation (B.7.5.3) eingesetzt.

B.7.5.2. Vorbereitung der ES-Zellen

Wie unter 7.4.1 beschrieben, wurden ES-Zellen aufgetaut, in 25 cm^2 Flaschen ausgebracht (Passagenzahl dokumentiert), bei 60-80% Konfluenz auf eine 75 cm^2 Flasche passagiert und erneut bis 60-80% Konfluenz kultiviert (3-6 Tage). Die Zellen einer 75 cm^2 Flasche waren für eine Elektroporation ausreichend. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin abgelöst (37°C, 5-10 min), suspendiert, nach Zugabe von 7 ml ES-Medium zentrifugiert (RT, 5 min, 180xg) und in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde ein letztes Mal zentrifugiert (RT, 5 min, 180xg). Das Pellet wurde in 0,9 ml PBS resuspendiert.

B.7.5.3. Elektroporation

Der linearisierte, in 0,1 ml PBS gelöste „Targeting“-Vektor, wurde der Zellsuspension zugegeben. Die Suspension wurde gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben.

Elektroporationsbedingungen („Gene PulserTM“ ohne „Pulse Controller“, BIO-RAD):

Spannung: 0,23 kV
Kapazität: 500 μF

Es sollte sich eine Zeitkonstante von ca. 6 ms ergeben.

Nach 5 min bei RT, wurden die Zellen in 9 ml ES-Medium suspendiert und je 1 ml auf 10 Petrischalen (55 cm²) mit Feederzellen in ES-Medium verteilt.

B.7.5.4. Selektion mit G418

24 h nach der Elektroporation wurde mit der Neomycinselektion begonnen. Dem Nährmedium wurde ab diesem Zeitpunkt G418 mit einer finalen Konzentration von 400 µg/ml zugesetzt. Nur Zellen, welche den „Targeting“-Vektor in ihr Genom integriert hatten, sollten weiterhin wachsen können. Das Medium wurde täglich gewechselt.

B.7.5.5. Selektion mit G418/Ganc

Weitere 24 h später erfolgte die zusätzliche Negativselektion mit Ganciclovir auf das tk-Gen. Dazu wurde dem G418-Selektionsmedium zusätzlich Ganciclovir in einer Endkonzentration von 2 µM zugesetzt. Ganciclovir, ein Nucleosidanalogen, ist für Zellen toxisch, welche das tk-Gen tragen und die Thymidinkinase exprimieren können. Die Thymidinkinase katalysiert die Umwandlung des Ganciclovirs zum entsprechenden Triphosphat, welches bei der DNS-Replikation anstelle des physiologischen Substrates Desoxyguanosin in die DNS eingebaut werden kann. Dadurch erfolgt ein Kettenabbruch der schließlich zum Zelltod führt. Mit dieser Negativselektion werden ES-Zellen abgetötet, bei denen ein Einbau des „Targeting“-Vektors nicht über Homologe Rekombination stattgefunden hat. Das Medium wurde täglich gewechselt. Das Absterben nicht resistenter Zellen setzte i.d.R. 4-6 Tage nach der Elektroporation ein. G418/Ganc resistente Zellklone waren an ihren klaren Umrissen zu erkennen.

B.7.5.6. Isolierung von ES-Zell-Klonen

Je nach Zielgen und Konstrukt erhält man 300-1000 G418/Ganc resistente Klone. Das allgemeine Vorgehen zur Isolierung von ES-Zell-Klonen ist in Abb. 5 gezeigt. Die Klone werden isoliert und auf zwei 96 Loch Platten (A, B) aufgeteilt. Platte A wird bei 70-80% Konfluenz eingefroren (in Nährmedium + 10% DMSO), Platte B wird vervielfältigt (Platten B, C, D). Aus diesen Platten wird DNS isoliert und analysiert, um Klone mit korrekt integriertem Konstrukt zu identifizieren (B.7.6). Diese ES-Zell-Klone werden schließlich aus der eingefrorenen Platte A wieder in Kultur genommen und zur Injektion in Blastozysten (B.7.7) verwendet.

Die ersten Klone konnten 7-9 Tage nach der Elektroporation gepickt werden. Je nach Wachstum der Zellen konnte das Picken alle 1-2 Tage wiederholt werden (insgesamt bis zu 3 Mal). Die Klone waren mit bloßem Auge auf dem Boden der Petrischalen zu erkennen. Pro Tag konnten 100-300 Klone isoliert werden. Dazu wurden am Morgen Feederzellen in ES/G418-Medium in 96 Loch Platten ausgebracht (150 µl pro Loch) und pro 96 gepickten Klone zwei Platten vorbereitet (Platte A und B). Ebenso wurden weitere 96 Loch Platten

vorbereitet, in die PBS vorgelegt wurde (30 μ l pro Loch). In diese Platten wurden die gepickten Klone überführt. Das Picken der Klone erfolgte mit einer 20 μ l Pipette (auf 2 μ l eingestellt) durch Abkratzen der Klone vom Boden der Petrischale. Zum Vereinzeln der Zellen einer gepickten Kolonie wurden 30 μ l 2x Trypsin in jedes Loch gegeben, 10 min bei 37°C inkubiert, suspendiert, 60 μ l ES/G418-Medium zugegeben und nochmals suspendiert. Je 60 μ l suspendierte Zellen wurden auf die zwei Platten mit Feederzellen (Platte A und B) verteilt und kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Bei 60-80% Konfluenz (3-4 Tage nach dem Picken) wurde die Platte A eingefroren (B.7.5.7) und Platte B auf 3 weitere 96 Loch Platten (B, C, D) passagiert (B.7.5.8).

Beim Picken wurde außerdem auf folgendes geachtet:

Das verwendete Stereomikroskop („Stemi SV6“, Zeiss) wurde unter einer Sterilbank aufgebaut, wobei Klone am besten im Dunkelfeld bei etwa 25facher Vergrößerung gepickt werden konnten. Die ausgewählten Klone waren mit bloßem Auge erkennbar, mit klar umrissenem, hellem Rand, nicht ausgefranst (differenziert) und deutlich vereinzelt (keine Mischklone). Um jeden Klon wurde der Feederzellrasen mit der Pipette abgelöst und möglichst die gesamten Zellen eines Klons mit der Pipette aufgenommen, um ein erneutes Anwachsen des gleichen Klons zu verhindern. Für jeden Klon wurde eine neue Pipettenspitze verwendet.

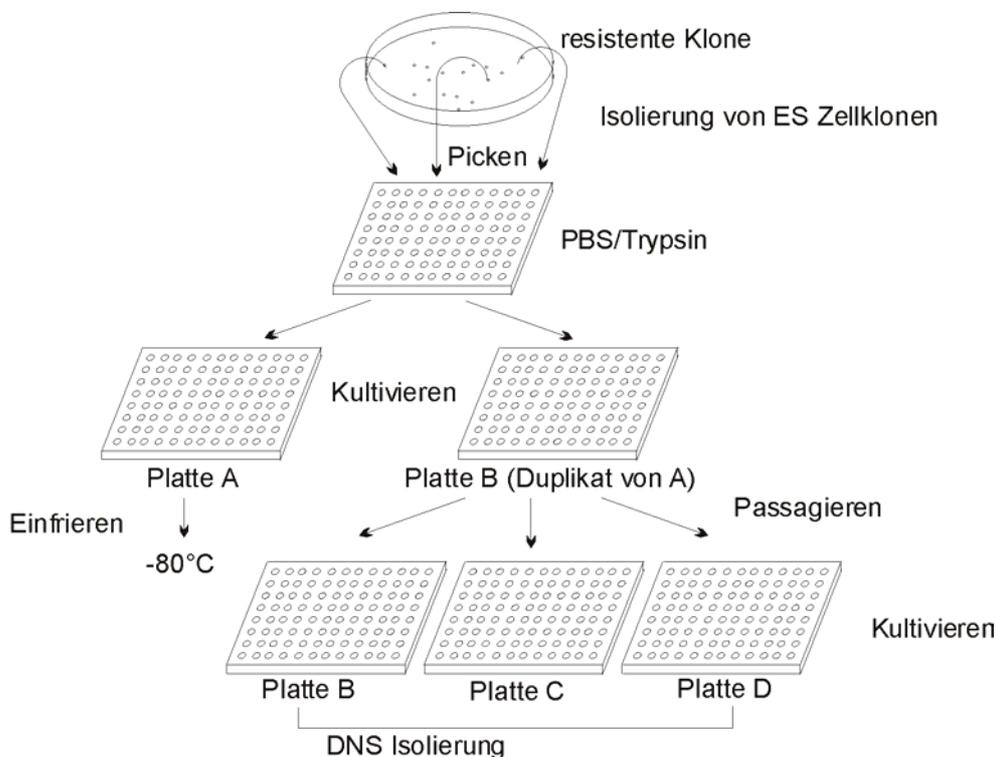


Abb. 6: Vorgehensweise zur Isolierung von ES-Zell-Klonen. Resistente ES-Zell-Klone werden isoliert und auf zwei 96 Loch Platten (A, B) dupliziert. Platte A wird bei 70-80% Konfluenz eingefroren (in Nährmedium + 10% DMSO) und Platte B wird zur DNS Isolierung vervielfältigt (Platten B, C, D). Weitere Erklärung im Text.

B.7.5.7. Einfrieren

Das Medium der Platte A, deren Klone eventuell zur späteren Injektion verwendet werden sollten, wurde abgekippt, die Zellen mit PBS gewaschen (180 µl pro Loch), mit 30 µl Trypsin pro Loch abgelöst (10 min, 37°C), 180 µl Einfriermedium pro Loch (90% ES-Medium + 10% DMSO, frisch angesetzt) zugegeben und suspendiert. Anschließend wurde die Platte mit Autoklavierband verschlossen, langsam eingefroren (1-3 h, -20°C) und bei -80°C gelagert.

B.7.5.8. Passagieren

Von der Platte B, welche ein genaues Duplikat der Platte A darstellt, wurden zwei weitere Kopien erzeugt, um identische DNS und somit mehr Möglichkeiten der Analyse der Klone zu erhalten. Dazu wurden in zwei 96 Loch Platten (Platte C und D, ohne Feederzellen) je 150 µl ES-Medium pro Loch vorgelegt, das Medium der Platte B abgekippt, die Zellen mit PBS gewaschen (180 µl pro Loch), mit 30 µl Trypsin abgelöst (10 min, 37°C), 120 µl ES-Medium zugegeben und suspendiert. Danach wurden je 50 µl aus Platte B in Platte C und D überführt. Die Platte B wurde mit 150 µl ES-Medium aufgefüllt und die Zellen bis zu 100% Konfluenz wachsen gelassen (3-4 Tage). Das Medium von Platten B, C und D wurde dann abgekippt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und getrocknet. Die DNS Isolierung erfolgte sofort oder die Platten wurden bei -20°C gelagert.

B.7.6. Identifizierung genetisch modifizierter ES-Zellen

Die korrekte Integration des DNS-Konstrukts wurde per PCR-Analyse (B.4.) überprüft. Erfolgreich modifizierte Klone wurden auch mittels Southernblot-Analyse überprüft (B.6.) Der Zeitaufwand von der Isolierung der DNS bis zur Identifizierung der korrekt modifizierten ES-Zell-Klone betrug je nach Anzahl der gepickten Klone 2-4 Wochen.

B.7.7. Injektion genetisch modifizierter ES-Zellen in Blastozysten

Zur Generierung genetisch veränderter Mäuse müssen genetisch modifizierte ES-Zellen in Blastozysten injiziert und diese in Ammentiere implantiert werden. Die Vorgehensweise ist in Abb. 4. schematisch dargestellt. In dieser Arbeit verwendete ES-Zellen stammten aus dem Mausstamm 129/Sv (Tiere dieses Stammes tragen ein agouti-farbenes „gelbes“ Fell). Korrekt getargetete ES-Zellen wurden in Blastozysten schwarzer C57BL/6 Mäuse injiziert, die am Tag 3,5 p. c. aus Weibchen isoliert worden waren. Zur Erzeugung dieser Blastozysten wurden C57BL/6 Weibchen mit C57BL/6 Männchen verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen sichtbaren vaginalen Pfropf (plug) hin untersucht. War dieser Pfropf vorhanden, befand sich das Weibchen im Falle einer Befruchtung am Tag 0,5 der Schwangerschaft. 3 Tage später konnten aus diesen positiven Weibchen die Blastozysten isoliert werden und die Injektion der modifizierten ES-Zellen erfolgen.

Die veränderten Blastozysten wurden anschließend in scheinchwangere Weibchen, die als Ammenmütter (foster) fungierten, reimplantiert. Diese scheinchwangeren Weibchen erhielt man durch Verpaaren mit vasktomierten Männchen. Sowohl die Blastozysteninjektion als auch die Reimplantation wurde von Frau Dr. Susanne Feil durchgeführt. Als Leihmütter wurden Weibchen des Mausstammes CD-1 verwendet. Um die veränderten Blastozysten austragen zu können, mussten die Leihmütter vor der Reimplantation im richtigen Schwangerschaftsstadium, d.h. Tag 2,5 p.c., sein. Dazu wurden sie mit vasktomierten FVB Männchen verpaart, am nächsten Morgen dem „plug check“ unterzogen und „plug-positiven“ Weibchen wurden ungefähr 2,5 Tage später die Blastozysten in den Uterus eingesetzt. Befanden sich unter den Nachkommen chimäre Tiere, deren Fellfarbe gelb und schwarz gemischt war, so war die Injektion der modifizierten ES-Zellen und die Reimplantation der Blastozysten erfolgreich.

Vorbereitung der ES-Zellen für die Injektion

Die ES-Zellen wurden 7-9 Tage vor Injektion in Kultur genommen (B.7.4). Dazu wurden die eingefrorenen 96 Loch Platten mit ES-Zell-Klonen (Platte A) bei 37°C aufgetaut, der Inhalt aus jedem Loch, das einen korrekten ES-Zell-Klon enthielt, direkt in ein Loch einer 24 Loch Platte ausgesät und in ES-Medium auf Feederzellen kultiviert. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt. Bei 60-80% Konfluenz (nach 3-5 Tagen) wurden die Zellen in 6 Loch Platten passagiert (B.7.4.2). Bei 60-80% Konfluenz der 6 Loch Platten (nach ca. 3 Tagen) wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte (1:3 und 1:10 „Splitting“) in 6 Loch Platten passagiert (B.7.5.8.), um sicher zu gehen, dass zum Zeitpunkt der Injektion genügend Zellen zur Verfügung standen. Von den restlichen Zellen wurden Gefrierkulturen angelegt (pro Loch einer 60-80% konfluenten 6 Loch Platte 2-3 Kryoröhrchen, (B.7.5.7.)).

Am Injektionstag wurden die Zellen aus einem Loch einer 6 Loch Platte (ca. 60% konfluent, nicht differenziert) mit Trypsin abgelöst und in 3-5 ml ES-Medium aufgenommen. 1-1,5 ml davon wurde zur Injektion benötigt (B.7.7.), der Rest zur DNS Präparation verwendet (um den Genotyp der ES-Zellen nochmals überprüfen zu können).

ES-Zellen zur Injektion (1-1,5 ml) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (RT, 2 min, 180xg), der Überstand bis auf ca. 50 µl abgehoben und die Zellen in den verbleibenden 50 µl gut suspendiert. Die Zellen sollten am besten sofort injiziert werden, wenn nötig für maximal 1-2 h bei 4°C gelagert werden.

B.7.8. Testen chimärer Mäuse auf Keimbahntransmission

Chimäre Mäuse besitzen einen Anteil an Zellen, der aus den Blastozysten der schwarzen C57BL/6 Spendertiere stammt und einen Anteil an Zellen, der aus den injizierten ES-Zellen hervorgegangen ist. Da die ES-Zellen von agouti-farbenen 129/Sv Mäusen abstammten, kann deren Anteil leicht am Fell abgelesen werden. Um eine genetisch veränderte Mauslinie zu etablieren, muss das mutierte Allel von der Chimäre weiter vererbt werden, d.h. die genetisch modifizierten ES-Zellen müssen zur Bildung von Keimzellen der Chimäre beitragen bzw. „keimbahngängig“ sein. Alle männlichen Chimäre wurden mit schwarzen C57BL/6 Weibchen verpaart und die Fellfarbe der Nachkommen überprüft. Da agouti dominant über schwarz vererbt wird, kann das modifizierte Gen nicht an die Nachkommen mit schwarzem Fell übertragen worden sein. Dagegen sind agouti-farbene Nachkommen bezüglich ihres Genoms heterozygot (129/Sv/C57BL/6), d.h. je ein Allel stammt aus dem 129/Sv bzw. C57BL/6 Genom. Das Genom jeder agouti-farbenen Maus muss daraufhin analysiert werden, ob bezüglich der eingeführten genetischen Veränderung das Wildtyp (+) oder das mutierte (m) Allel von der Chimäre weitergegeben wurde.

Für diese Analyse wurden Schwanzbiopsien von agouti-farbenen Tieren entnommen und DNS isoliert. Anschließend wurden mittels PCR (B.4.) die Tiere identifiziert, die auf einem Allel die genetische Mutation enthielten (+/-).

B.7.9. Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden in einem dafür geeigneten Tierstall den Anforderungen nach in Makrolon Käfigen gehalten (bis zu 5 adulte Tiere in einem Typ II Käfig, bis zu 12 adulte Tiere oder 2 Weibchen mit ihren Würfen in einem Typ III Käfig; Tierversuchsgenehmigung AZ: 211-2531-120/99 vom 10.02.04). Als Einstreu wurden autoklavierte Späne (Altromin) verwendet, die bei Bedarf noch mit Nistmaterial („Nestlets“, Emsicon) ergänzt wurden. Die Fütterung („Zuchtdiät–Ratten und Mäuse“) und Wasserversorgung erfolgte *ad libidum*. Zur Zucht wurden i.d.R. jeweils zwei Weibchen im paarungsfähigen Alter (5-30 Wochen) zu einem Männchen (6 Wochen–1¹/₂ Jahre) gesetzt. Nachkommen wurden durch PCR-Analyse von Schwanzbiopsien genotypisiert (B.7.10) und im Alter von 3-4 Wochen von der Mutter abgesetzt. Dabei erfolgte eine Trennung von Männchen und Weibchen.

Die Inzuchtstämme C57BL/6 (C57BL/6N CrI BR) und FVB/N (FVB/N CrI BR) sowie der Auszuchtstamm CD-1 [CrI:CD[®]-1(ICR) BR] wurden von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen. Die Vasektomie von FVB/N Männchen wurde von der Fa. Iffa Credo, Lyon durchgeführt. Die 129/Sv Inzuchtmäuse stammten aus dem Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried (Prof. Dr. A. Pfeifer, persönliche Mitteilung).

B.7.10. Isolierung von DNS/RNS aus Mausgewebe

B.7.10.1. Isolierung von DNS

Zur Genotypisierung wurde 7-14 Tage alten Mäusen ca. 2 mm des Schwanzes abgeschnitten (tail) und über Nacht in 50 µl Lysepuffer unter Zusatz von Proteinase K lysiert. Am nächsten Tag wurde das Lysat kurz bei 18.000xg abzentrifugiert, die flüssige Phase von verbliebenem Gewebe abgehoben, in PCR-Reaktionsgefäße überführt und 15 Minuten bei 95°C denaturiert. Diese DNS-Lösungen wurden entweder sofort zur Analyse mittels PCR eingesetzt (siehe B.4.3.) oder bei -20°C gelagert.

Lysepuffer (pro tail)

H ₂ O	44 µl
PCR-Puffer (Promega)	5 µl
Proteinase K (50 mg/ml in 1xTE)	1 µl

B.7.10.2. Isolierung von RNS

Zur Durchführung von RT-PCR-Analysen wurde RNS aus verschiedensten Geweben gewonnen.

Durchführung

- Gewebe (50-100mg) in 1 ml „peqGold RNSPure™“ (Peqlab) mit einem UltraTurrax (IKA Werk) homogenisieren, kurz abzentrifugieren, um nicht homogenisierte Gewebestücke abzutrennen, Überstand überführen, 0,2 ml Chloroform zugeben und vortexen, zentrifugieren (RT, 5 min, 18.000xg), obere wässrige Phase abheben und mit 0,5 ml Isopropanol RNS über Nacht bei 4°C fällen
- am nächsten Morgen zentrifugieren (4°C, 5 min, 18.000xg) und zweimal mit je 1 ml 75%igem EtOH waschen, die RNS kurz lufttrocknen und je nach Gewebe in 30-300 µl H₂O_{DEPC} lösen, RNS bei -20°C lagern
- 1:50 Verdünnungen zur Quantifizierung (B.3.3.) einsetzen
- alle benötigten Lösungen wurden mit H₂O_{DEPC} (0,05% Diethylpyrocarbonat in H₂O, gut schütteln, 1 h bei RT inkubieren und autoklavieren) hergestellt.

Die Durchführung der RT-PCR-Analyse ist in Abschnitt B.4.5. dargestellt.

B.7.11. Isolierung von Protein aus Mausgewebe

Die Isolierung von Proteinen verschiedenster Mausgewebe erfolgte durch Zerkleinerung der Gewebe mit dem Ultra Turrax in Lysepuffer. Nach 10 minütigem Erhitzen auf 95°C und kurzem Vortexen wurde das Lysat abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C weggefroren.

Lysepuffer

1M Tris/HCl, pH 8,3	210 µl
SDS, 10%	670 µl
β-Mercaptoethanol	170 µl
PMSF (100 mM in 100% EtOH)	20 µl
H ₂ O _{bidest}	ad. 10 ml

Der Lysepuffer wurde stets frisch hergestellt und zur späteren Proteinbestimmung aufbewahrt.

B.7.12. Konzentrationsbestimmung von Protein (nach Lowry)

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels der Lowry-Methode, welche auf der Kombination der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz basiert. In alkalischem Milieu bilden sich durch Anlagern von Cu²⁺-Ionen an Proteine Cu²⁺-Protein-Komplexe, welche das zugegebene Folin-Ciocalteu-Reagenz reduzieren. Dabei werden Molybdat bzw. Wolframat-Komplexe reduziert.

Zur Proteinbestimmung wurde der Protein Assay Kit P 5656 der Firma Sigma verwendet, vorhandene Reagenzien nach Anleitung eingesetzt, wobei die Verbrauchsmengen auf 1/5 der angegebenen Mengen reduziert werden konnten. Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine neue Eichkurve mit dem Standardprotein BSA hergestellt.

Durchführung:

- Herstellung der Standardlösungen: Es wurden BSA-Stammlösungen der Konzentrationen 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml verwendet. Davon wurden je 200 µl mit H₂O_{bidest} auf 1 ml verdünnt
- von den zu bestimmenden Proben wurden je nach Ursprungsgewebe und geschätztem Proteingehalt 2-30 µl eingesetzt und auf 1 ml mit H₂O_{bidest} aufgefüllt, davor wurden die Proben 5-10 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert
- als Referenzwert diente eine entsprechende Verdünnung des verwendeten Lysepuffers mit H₂O_{bidest}
- Zugabe von 100 µl „DOC Solution“ (Deoxycholat hilft beim Präzipitieren kleiner Proteinmengen) -gut mischen- 10 Minuten bei RT inkubieren
- Zugabe von 100 µl Trichloressigsäure (TCA, 72%)- mischen
- 10 Minuten bei RT mit 18.000xg zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet mit 200 µl Lowry-Reagenz resuspendieren
- Zugabe von 200 µl H₂O_{bidest}, gut mischen, 20 Minuten bei RT inkubieren
- Zugabe von 100 µl „Folin-Ciocalteu´s Phenol Reagent Working Solution“ sofort gut mischen- 30 Minuten bei RT inkubieren; Blaufärbung sollte erkennbar sein
- Proben in Küvetten überführen (Einmalküvetten aus Plastik)
- Absorption bei 750 nm im Photometer bestimmen, Proben innerhalb von 30 Minuten vermessen
- Erstellen einer Standardkurve und Berechnen der jeweiligen Proteinkonzentration

B.7.12.1. Proteinfällung (nach Wessel und Flügge)

Vor der Westernblot-Analyse erfolgte eine Fällung der zu analysierenden Proteine durch Methanol-Chloroform-Fällung und Aufnahme der gefällten Proteinpellets in 2x Probenpuffer.

Durchführung:

- 150 µl Probe
- Zugabe von 600 µl Methanol (Roth)
- Zugabe von 150 µl Chloroform (Roth)
- Kräftiges Vortexen
- Zugabe von 450 µl H₂O_{bidest}
- Kräftiges Vortexen
- Probe zentrifugieren (RT, 1 min, 18.000xg)
- Obere organische Phase abziehen und verwerfen
- Zugabe von 450 µl Methanol
- Vortexen
- Zentrifugieren (RT, 2 min, 18.000xg); Pellet befindet sich am Boden
- Überstand verwerfen und Pellet ca. 10 Minuten trocknen lassen
- Pellet in entsprechendem Volumen 2x Probenpuffer aufnehmen, um gewünschte Endkonzentration zu erhalten

6x Probenpuffer

4x Tris HCl/SDS, pH 6,8	7 ml
Glycerol (Roth)	3,6 ml
SDS	1 g
DTT (Roth)	0,93 g
Bromphenolblau	1,2 mg
H ₂ O _{bidest}	ad. 10 ml

B.7.13. Westernblot

Zur Expressions-Analyse der cGKI auf Proteinebene wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Dabei wurden Proteine zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970) und danach die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore) überführt, d.h. „geblottet“. Dazu wurde folgender Blotaufbau durchgeführt:

- 2 in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere
- 2 in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere
- PVDF Membran (zuerst mit Methanol und dann mit Anodenpuffer II befeuchtet)
- SDS-Polyacrylamidgel
- 4 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere

Nach dem Blotten wurden die Membranen für eine Stunde in 5%iger Magermilchlösung (MP, Roth) in 1x TBST geschwenkt, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurden die Membranen zurechtgeschnitten und in Lösungen der entsprechenden Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zweimal mit 1x TBST und einmal mit 1% MP in 1x TBST bei RT gewaschen, bevor die Membranen mit dem in 1% MP in 1x TBST verdünntem sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurde durch die „Enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Methode die Blots entwickelt und Banden sichtbar gemacht.

Dazu wurde eine 1:1 Mischung der beiden Lösungen des ECL-Kits (Amersham) über die Membran gegeben, und Signale auf einem Röntgenfilm festgehalten. Das Prinzip der ECL-Methode beruht auf der Kopplung des sekundären Antikörpers mit einer Meerrettich-Peroxidase („horse radish peroxidase, HRP). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidion) zu 5-Aminophtalsäure durch H₂O₂. Die dabei freiwerdende Energie wird durch Chemilumineszenz abgegeben und wird durch chemische Verstärker, meist Phenole, vergrößert.

4x Tris HCl/SDS, pH 8,8

Tris-Base 18,2 g
SDS 0,4 g
H₂O_{bidest} ad.100 ml
pH auf 8,8 mit HCl einstellen
Filtrieren

4x Tris HCl/SDS, pH 6,8

Tris-Base 6 g
SDS 0,4 g
H₂O_{bidest} ad. 100 ml
pH auf 6,8 mit HCl einstellen
Filtrieren

	8%	9%	11%	12%
30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid (Roth)	4 ml	4,5 ml	5,5 ml	6 ml
4x Tris HCl/SDS, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
H ₂ O _{bidest}	7,25 ml	6,75 ml	5,75 ml	5,25 ml
APS (30%)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED (Roth)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 3: Angaben zur Herstellung von Trenngelen.

30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid (Roth)	0,65 ml
4x Tris HCl/SDS pH 8,8	1,25 ml
H ₂ O _{bidest}	3,05 ml
APS (30%)	12,5 µl
TEMED (Roth)	5 µl

Tabelle 4: Angaben zur Herstellung des Sammelgels.

10x SDS-Laufpuffer

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

Anodenpuffer I, pH 10,4

Tris	36,3 g
techn. Methanol	200 ml
H ₂ O _{bidest}	ad. 1l
pH mit HCl auf 10,4 einstellen	

10x TBST

Tris/HCl, pH 8,0	100mM
NaCl	1,5 M
Tween 20	0,05% (v/v)

Kathodenpuffer, pH 7,6

2g ε-Aminohexansäure (Roth)	5,2 g
Tris	3,04 g
techn. Methanol (Roth)	200 ml
H ₂ O _{bidest}	ad. 1 l
pH mit HCl auf 7,6 einstellen	

Anodenpuffer II, pH 10,4

Tris	3,02 g
techn. Methanol	200 ml
H ₂ O _{bidest}	ad. 1 l
pH mit HCl auf 10,4 einstellen	

B.8. Kraftmessung am glatten Muskel

Die isometrische Kraftentwicklung von Muskelpräparaten wurde mit induktiven Kraftmessern (Myograph601, Danish Myo Technology www.dmt.dk) und Datenerfassungssystemen durchgeführt. Unter isometrischen Bedingungen kann keine Verschiebung der Myosinfilamente erfolgen und das Verengen des Gefäßlumens der Ringmuskelpreparate oder die Verkürzung des Muskels wird verhindert.

Es wurden sowohl Messungen an der Aorta thoracalis als auch am Jejunum durchgeführt.

Alle Versuche wurden an adulten Tieren im Alter von 6-10 Wochen, im Falle der „Rescue“ Linien im Alter von 6-8 Wochen, durchgeführt.

B.8.1. Präparation

Mäuse wurden durch transzervicale Dislokation euthanasiert, und auf dem Rücken fixiert. Die Aorta thoracalis bzw. das Jejunum wurde unter Vermeidung von Zug und Druck entnommen und in einer mit Tyrode-Pufferlösung (auf 37°C vorgewärmt) gefüllten Petrischale von umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit. Über eine Kanüle wurde die freipräparierte Aorta mit der Pufferlösung durchgespült und das Gefäß in etwa 5 mm lange Ringsegmente geschnitten. Das Endothel wurde durch mechanische Einwirkung zerstört, indem eine gebogene Kanülenspitze vorsichtig entlang der inneren Gefäßwand gezogen wurde. Das Jejunum wurde mittels einer Spritze mit Tyrode durchspült und in etwa 5 mm lange Segmente geschnitten. An diese Segmente wurden zwei Schlaufen in Längsrichtung, jeweils an gleicher Position am Anfang und Ende eines Segmentes, angenäht.

	mM	g/L
NaCl	137	8
KCl	5,4	0,4
CaCl ₂	1,8	0,265
MgCl ₂	1	0,2
NaHCO ₃	12	1
NaH ₂ PO ₄	0,42	0,058
Glucose	5,6	1

Tabelle 5: Angabe zur Herstellung der Tyrode-Lösung zur Kontraktionsmessung. pH 7,4 (4°C).

B.8.1.1. Durchführung der Versuche

Die Aortenpräparate wurden zur isometrischen Kraftmessung zwischen einem fixierten Metallhaken und einem Kraftaufnehmer eingespannt. Jejunumpräparate wurden an den angenähten Schlaufen eingehängt. Die mit 5 ml Tyrodelösung befüllten Organbäder wurden mit einer Heizung konstant auf 37 °C gehalten und mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid, begast. Somit konnte ein stabiler pH-Wert von 7,0 eingestellt werden.

Da die Kontraktionskraft durch α -Agonisten von der angelegten Vordehnung des Muskels abhängig ist (Aalkjaer et al., 1983), wurde vor jeder Messung eine definierte Vordehnung (zwischen 2 und 5 mN) vorgenommen.

Anschließend wurden die Aortenringe und Jejunumsegmente im Organbad äquilibriert. Nach Erreichen des stabilen Ausgangsniveaus wurde mit den Kontraktionsversuchen begonnen. Durch Zugabe des α -Adrenorezeptor-Agonisten Phenylephrin (3 μ M) wurde ein stabiler Tonus der Aortenpräparate erzeugt. Zur Gewährleistung einer vollständig unterdrückten NO-Synthaseaktivität im Endothel wurde 100 μ M des eNOS-Inhibitors N_o-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME, 100 μ M) appliziert.

Bei Jejunumpräparaten erfolgte die Erzeugung des Tonus durch Zugabe von Carbachol (10 μ M).

Zur Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) wurden kumulativ steigende Konzentrationen des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP auf den stabilen Tonus gegeben. Die Gesamt-Messzeit lag zwischen ca. 40 und ca 330 Minuten.

Stammlösungen:

Phenylephrin-Stammlösung:

Phenylephrin 1 mM, gelöst in H₂O_{bidest}, lagern bei 4°C

Carbachol-Stammlösung:

Carbachol 1 mM, gelöst in H₂O_{bidest}, lagern bei 4°C

L-NAME-Stammlösung:

L-NAME 100mM, gelöst in H₂O_{bidest}, lagern bei (-20°C)

IBMX-Stammlösung (3-Isobutyl-1-methylxanthin):

IBMX 100mM, gelöst in DMSO, lagern bei (-20 °C)

B.8.2. Auswertung der Versuche

Alle Experimente wurden mit Hilfe der Software Origin 6.1 und der Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software) ausgewertet. Das Maximum der Phenyloprin- bzw. Carbachol-induzierten Kontraktion wurde als Bezugspunkt gleich 100% gesetzt. Zur Definition des Nullbezugspunkts wurden die Präparate nach jeder Messreihe mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100 μ M) maximal relaxiert. Die durch Zugabe einer bestimmten Konzentration 8-Br-cGMP bewirkte Relaxierung wurde als prozentualer Anteil dieser Maximalrelaxierung bestimmt.

B.8.3. Statistische Methoden

Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Original-Registrierung oder Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Signifikanz der Daten wurde mit dem Student's t-Test für ungepaarte Daten berechnet, wobei n die Anzahl der Messwerte angibt. Der Student's t-Test dient zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten. Ein Sternchen (\star) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten an. Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in p angegeben, wobei $p < 0,05$ signifikant (\star), $p < 0,01$ sehr signifikant ($\star\star$) und $p < 0,001$ ($\star\star\star$) extrem signifikant bedeutet. Die Berechnungen der Signifikanz, des Mittelwerts und der Standardabweichung wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 4.0 erstellt, wobei n die Anzahl der untersuchten Präparate angibt.

B.9. Erstellen einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier

Zum Vergleich der Lebenserwartung konventioneller cGKI^{-/-} mit SM-I α bzw. SM-I β „Rescue“ Tieren, wurde Geburt und Todeszeitpunkt einer Anzahl an Tieren jedes Genotyps festgehalten. Die ermittelten Überlebensdaten in Wochen wurden mit Hilfe des Programms Prism 4.0 statistisch ausgewertet und eine Kaplan-Meier Kurve erstellt.

B.10. Gewichtsanalyse

Um Unterschiede in den Gewichten der „Rescue“ Mäuse und cGKI^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren (CTR) zu erhalten, wurden mehrere Würfe sowohl im Alter von 2 Wochen als auch von 10 Wochen gewogen. Die gemittelte Masse der CTR eines Wurfes wurden gleich 100% gesetzt, die anderen Massen als Prozent dieser Werte bestimmt.

C. Ergebnisse

C.1. Expression der cGKI-Isoformen cGKI α / β unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors (Generierung der SM-I α und SM-I β Mauslinien)

Die Glattmuskel-spezifische (Über-)expression einer der beiden Isoformen der cGKI sollte unter Verwendung des Glattmuskel-spezifischen SM22 α -Promotors erzielt werden. Bereits im Jahr 2000 wurde erfolgreich eine transgene Mauslinie unter Verwendung dieses Promotors generiert (Kuhbandner et al., 2000 und 2001), der stark und selektiv in visceralen und vaskulären glatten Muskelzellen aktiviert wird (Solway et al., 1995; Li et al., 1996).

C.1.1. Eigenschaften und Konstruktion der „Targeting“-Vektoren

Um die beiden Isoformen der cGKI unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors in glatten Muskelzellen zu exprimieren, wurden zwei „Targeting“-Vektoren (*pSM-cGKI α* und *pSM-cGKI β*) durch Integration der jeweiligen cGKI-cDNS-Sequenz, eines daran fusionierten SV40 pA-Signals und eines neo-Gens in den SM22 α -Genort konstruiert. Die cGKI-cDNS-Sequenz wurde direkt an das SM22 α -Translationsstartcodon fusioniert. Zusätzlich erfolgte der Einbau eines tk-Gens 3' terminal des 3' homologen Arms.

Analog wurden zwei weitere „Targeting“-Vektoren mit Fusion einer EGFP-Kassette an die jeweilige Isoform der cGKI generiert (*pSM-cGKI α -EGFP* und *pSM-cGKI β -EGFP*). Mit Hilfe dieser „Targeting“-Vektoren sollen zu einem späteren Zeitpunkt Mauslinien erzeugt werden, bei denen die cGKI-Isoformen durch das EGFP-Protein markiert sind.

Die „Targeting“-Vektoren (Abb. 8) wurden wie folgt konstruiert:

1) Einführung einer *SphI* Schnittstelle in den Aminoterminus der beiden cGKI-Isoformen und Generierung der Plasmide *pl α -N-term (SphI)* sowie *pl β -N-term (SphI)*

Die jeweilige bovine cDNS-Sequenz beider cGKI-Isoformen lag bereits in den Vektoren pUCI α sowie pcDNA3/I β subkloniert vor (B.1.). Mittels PCR und den Primerpaaren RF146/VQ184 (I α Isoform) und RF147/RF148 (I β Isoform) wurde am jeweiligen Start ATG eine *SphI* Schnittstelle eingeführt (B.4). Dabei wurde ein Aminosäureaustausch durchgeführt. So wurde im Falle des Aminoterminus I α das Serin 2 in ein Arginin umgewandelt (Basentriplett AGC in CGC umgewandelt). Im Aminoterminus I β wurde das Glycin 2 gegen ein Arginin ersetzt (Basentriplett GGC in CGC umgewandelt). Zusätzlich wurde beim Aminoterminus der I β -Isoform eine *BglII* Schnittstelle über eine stille Mutation am für das Lysin 106 kodierenden Triplet eingeführt (Basentriplett AAG in AAA umgewandelt). Ebenso entstanden im Aminoterminus der cGKI α -Isoform zwei stille Mutationen am für das Prolin 48 und Valin 49 kodierenden Triplet (Mutation von CCC in CCG bzw. GTG in GTA).

Über die eingeführten Schnittstellen wurden die gereinigten PCR-Amplifikate in den Vektor pCreER(GR)L (B.1.) ligiert (B.3.7.), wodurch die Plasmide *pl α -N-term(SphI)* sowie *pl β -N-term(SphI)* entstanden.

2) Einbau der cGKI-Common-Region (sowie der cGKI-EGFP cDNS) in die *pl α -N-term(SphI)* bzw. *pl β -N-term(SphI)* Plasmide

Der Einbau der cGKI-Common-Region (zuvor aus pUCI α über die Schnittstellen *BglII* und *EcoRI* isoliert; 1,8 kb) in die Vektoren *pl α -N-term(SphI)* und *pl β -N-term(SphI)* erfolgte über die Schnittstellen *BglII* und *EcoRI* (B.3.4.). Die erhaltenen Plasmide, welche die vollständige cDNS-Sequenz der jeweiligen cGKI-Isoform beinhalteten, wurden als *pl α (SphI)* bzw. *pl β (SphI)* bezeichnet (5,2 bzw. 5,3 kb).

Aus dem Plasmid pCMV-cGKI α FL-EGFP (mit Fusion der EGFP-cDNS an die cGKI α cDNS, (B.1.)) wurde über die Schnittstellen *BglII* und *NotI* ein Fragment der cGKI-Common-Region und daran fusioniertem EGFP isoliert. Dieses Fragment wurde nach Umwandlung der *NotI* Schnittstelle in eine komplett basengepaarte Schnittstelle (über T4-polish, (B.3.5.)) in die Vektoren *pl α -N-term(SphI)* und *pl β -N-term(SphI)* ligiert (über die *BglII* und *EcoRI* Schnittstellen, nach T4-polish der *EcoRI* Schnittstelle). Die beiden erhaltenen Plasmide wurden als *pl α -EGFP(SphI)* bzw. *pl β -EGFP(SphI)* bezeichnet (5,9 bzw. 6 kb).

3) Einbau des 5'-Arms des SM22 α -Genortes

Aus dem Plasmid pUC18-SMcentral (B.1.) wurde der 5'-Arm des SM22 α -Genorts als *SphI*-Fragment (4,5 kb) isoliert. Dieses Fragment wurde nach Restriktionsverdau in die unter Punkt 2 generierten Plasmide, nach deren Restriktionsverdau mit *SphI* und Dephosphorylierung (B.3.6), ligiert. Erhaltene Plasmide mit richtiger Orientierung des Inserts wurden als *pSM5'-I α* (9,7 kb), *pSM5'-I β* (9,8 kb), *pSM5'-I α -EGFP* (10,4 kb) und *pSM5'-I β -EGFP* (10,5 kb) bezeichnet.

4) Vervollständigen der „Targeting“-Vektoren durch Hinzufügen des 3'-Arms des SM22 α -Genortes sowie der Selektionskassetten

In dem Plasmid pSM3' (B.1.) lag der 3'-Arm des SM22 α -Genortes sowie die zur Durchführung des ES-Zell-„Targetings“ benötigten Selektionsmarker subkloniert vor. Über die Schnittstellen *AscI* und *XhoI* des Plasmids pSM3' sollten die zuvor generierten *AscI/SalI* Fragmente der pSM5'-Plasmide als Insert eingebaut werden. Aufgrund einer nicht charakterisierten Verunreinigung in der Größe des zu ligierenden Inserts traten zunächst Probleme bei diesem Ligationsschritt auf. Da in den gewünschten Inserts keine *AscI* Schnittstelle vorhanden ist, konnte durch einen zusätzlichen Verdau mit *AscI* die Verunreinigung geschnitten und damit das Problem behoben werden. Nach diesem zusätzlichen Restriktionsschritt wurden Klone mit korrekter Integration der Inserts in das Plasmid pSM3' erhalten, wodurch die „Targeting“-Vektoren *pSM-cGKI α* (15 kb), *pSM-cGKI β* (15,1 kb), *pSM-cGKI α -EGFP* (15,7 kb) und *pSM-cGKI β -EGFP* (15,8 kb) generiert wurden.

Die Integrität der Plasmide wurde durch Restriktions-Analyse und Sequenzierung überprüft. Verwendete Restriktionsenzyme und Primer sind im Anhang Tabelle F1 aufgelistet. In Abb. 7 sind exemplarisch anhand der Plasmide *pSM-cGKI α* und *pSM-cGKI α -EGFP* durchgeführte Restriktions-Analysen dargestellt. Die erhaltenen Fragmentgrößen stimmten mit den erwarteten Größen überein.

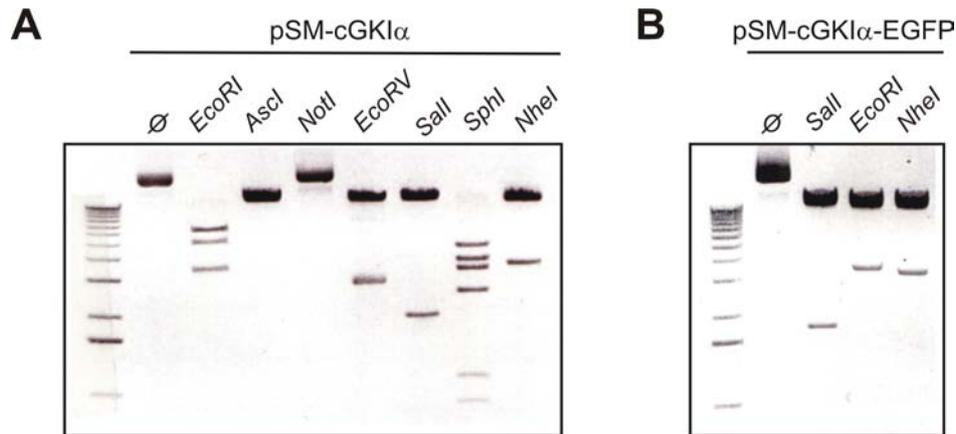


Abb. 7: Restriktions-Analyse. Anhand der Plasmide pSM-cGKI α (A) und pSM-cGKI α -EGFP (B) sind beispielhaft die durchgeführten Restriktions-Analysen gezeigt. Aufgetragen wurde jeweils ungeschnittenes Plasmid (ϕ) sowie ein Aliquot der jeweiligen Restriktions-Ansätze.

In Abb.8 ist die „Targeting“-Strategie zur Modifikation des SM22 α -Genortes dargestellt.

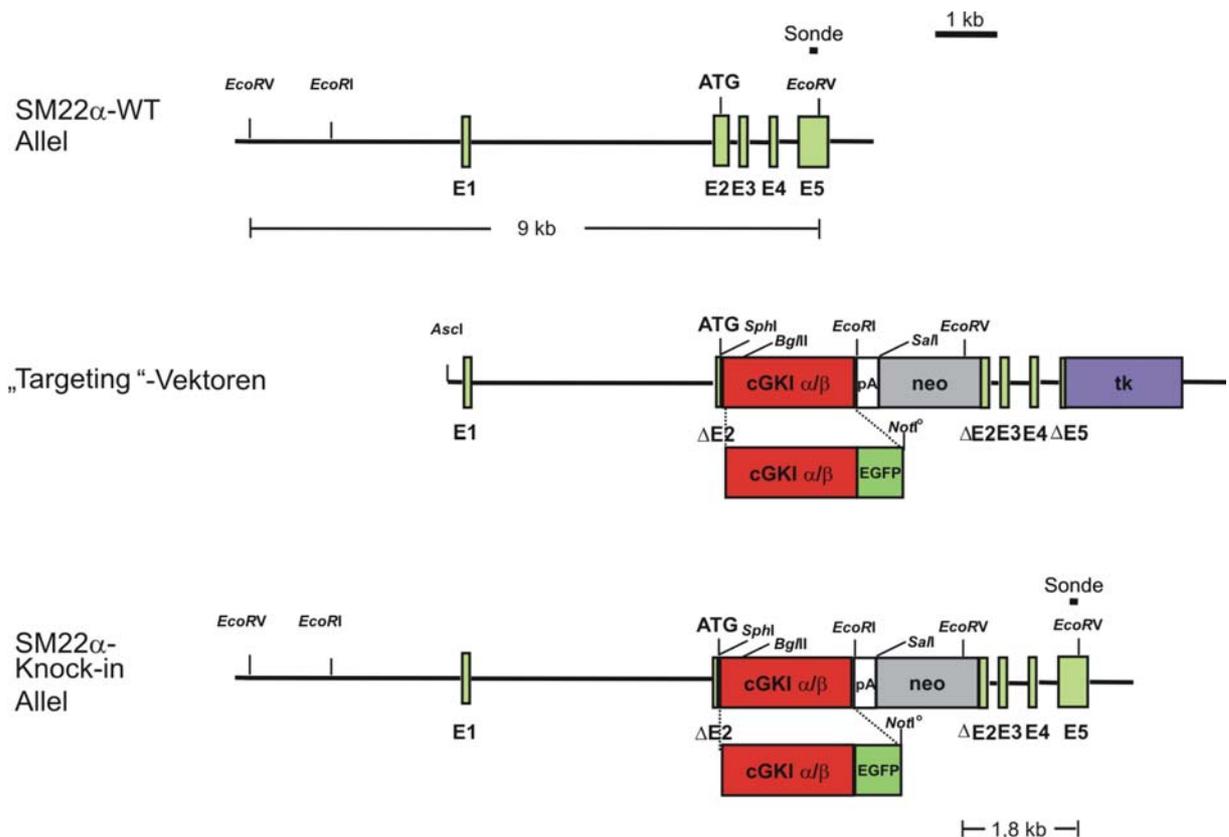


Abb. 8: Aufbau der „Targeting“-Vektoren. Dargestellt ist der SM22 α -WT Genort, die „Targeting“-Vektoren sowie der modifizierte Genort nach korrekter Integration (Knock-in Allel). Zusätzlich sind Schnittstellen wichtiger Restriktionsenzyme sowie die Southernblot-Strategie zum Nachweis der korrekten Integration dargestellt (siehe B.6.). Weitere Erklärung im Text.

C.1.2. Genetische Modifikation von ES-Zellen

Nach erfolgreicher Konstruktion der „Targeting“-Vektoren erfolgte das sog. „Gene Targeting“ in ES-Zellen der Maus (B.7.). Zur Generierung der Mausmutanten wurden R1 ES-Zellen des Mausstamms 129/Sv eingesetzt. Die Zellen befanden sich zu Beginn des „Targetings“ in der Passage 15 und wurden zunächst wie in B.7.4.2. beschrieben kultiviert. Zur Elektroporation (B.7.5.3.) wurden jeweils 50 µg der „Targeting“-Vektoren (C.1.1.) mit *Ascl* linearisiert und wie unter B.3.2 beschrieben vorbereitet. Nach Selektion mit G418 (B.7.5.4.) und Ganc (B.7.5.5.) wurden resistente Klone ca. eine Woche nach Elektroporation isoliert (B.7.5.6.). Bei jedem „Gene Targeting“ wurden zwischen 400 und 700 Kolonien isoliert, in 96-Loch Platten überführt und wie in B.7.5.7. beschrieben eingefroren sowie zur DNA Analyse aufbereitet.

Zur Generierung der SM- α Linie wurde das „Gene Targeting“ 2 mal, im Falle der SM- β Linie 3 mal wiederholt, um genügend genetisch modifizierte ES-Zellen zur nachfolgenden Injektion in Blastozysten zu erhalten (Tabelle 6).

C.1.2.1. Analyse der ES-Zellklone durch PCR

Um ES-Zellen zu finden, bei denen eine Integration der gewünschten Mutation durch homologe Rekombination im SM22 α -Genort stattgefunden hatte, wurden zunächst alle isolierten ES-Zell-Klone mittels einer PCR-Strategie analysiert, bei welcher der 3'-Arm überprüft wurde. Abb. 9 gibt die durchgeführte PCR-Strategie wieder. Lediglich bei erfolgreicher homologer Rekombination in den SM22 α -Genort ist eine 1,8 kb Bande amplifizierbar. Diese Strategie eignete sich zur Identifizierung aller in dieser Arbeit generierter SM22 α -Knock-in Allele, unabhängig von der eingeführten cGKI-Isoform.

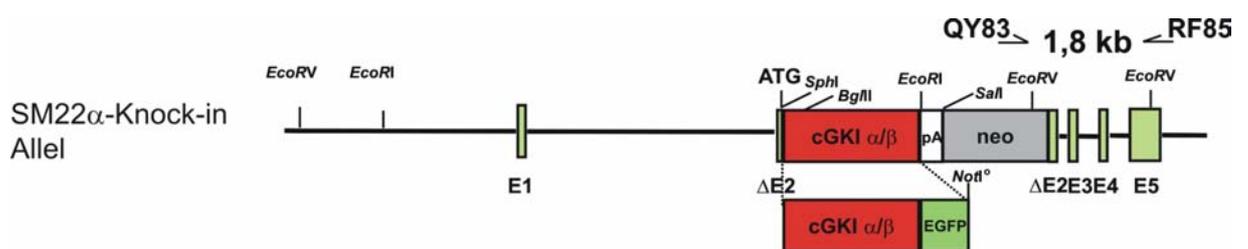


Abb. 9: PCR-Strategie zur Analyse von ES-Zell-Klonen am 3'-Arm. Mit den Primern QY83 und RF85 kann bei richtiger Integration in den SM22 α -Genort ein 1,8 kb großes Amplifikat erzeugt werden.

Am 3'Arm positiv gestestete Klone wurden zusätzlich am 5'-Arm mittels einer sog. „long-range“ PCR überprüft. Abb. 10 erklärt die dabei durchgeführte Strategie. Da der Primer VQ184 in der Common-Region der cGKI anlagert, konnte auch diese Strategie für alle SM22 α -Knock-in Allele verwendet werden.

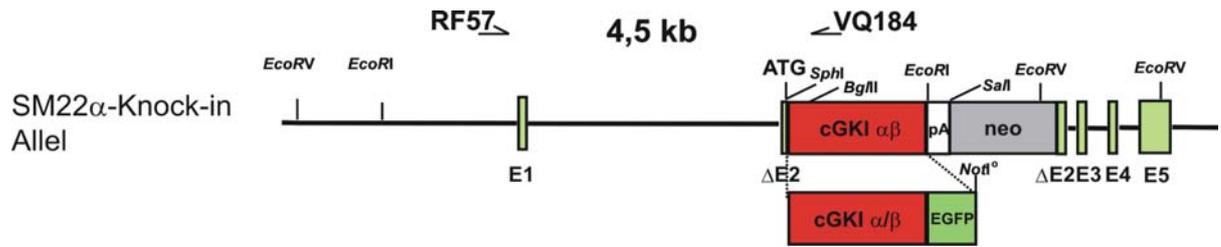


Abbildung 10: „Long Range“ PCR-Strategie zur Analyse von ES-Zell-Klonen am 5'-Arm. Mit den Primern RF57 und VQ184 kann bei richtiger Integration in den SM22 α -Genort ein 4,5 kb großes Amplifikat erzeugt werden.

Abb. 11 zeigt exemplarisch durchgeführte PCR-Analysen G418^R/Ganc^R-resistenter ES-Zell-Klone (G418^R/Ganc^R). Bei Überprüfung des 3'-Arms konnte in diesem Beispiel der SM-I α Klon 9-12G identifiziert werden (A). Als Positiv-Kontrolle (ctr) konnte DNS von ES-Zellen der SM-KI Mauslinie verwendet werden (Kuhbandner et al., 2000 und 2001), die mit der durchgeführten Strategie ebenfalls ein 1,8 kb großes PCR-Amplifikat erzeugt. 3'-positiv getestete Klone wurden zusätzlich am 5'-Arm überprüft (B). Hier am Beispiel der SM-I α Klone 9-12G, 10-2F und 10-2G gezeigt.

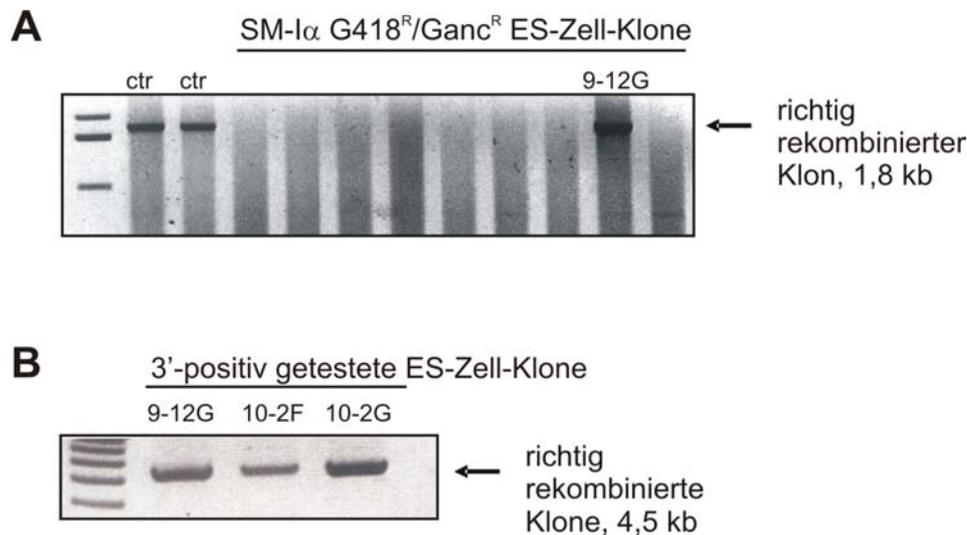


Abb. 11: Beispiel zweier PCR-Analysen der ES-Zell-Klone. (A) Überprüfung G418^R/Ganc^R ES-Zell-Klone am 3'-Arm. Der Klon 9-12G konnte als richtig rekombiniert erkannt werden. (B) Überprüfung 3'-positiver ES-Zell-Klone am 5'-Arm (gezeigt sind die SM-I α Klone 9-12G, 10-2F und 10-2G) Weitere Erklärung im Text.

Alle durch PCR-Analyse charakterisierten Klone mit erfolgreicher Integration des modifizierten Gens sind nachfolgend tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 6).

„Targeting“-Vektor	Klon	„Targeting“
pSM-cGKI α	10-2F	2
	10-12G	2
	9-12G	2
pSM-cGKI β	3-11D	2
	3-10E	2

Tabelle 6: Zusammenstellung aller ES-Zell-Klone mit erfolgreicher Integration der cGKI α bzw. cGKI β cDNS in den endogenen SM22 α -Genort.

C.1.2.2. Analyse der ES-Zell-Klone durch Southernblot-Hybridisierung mittels einer 3'-Sonde

Durch PCR-Analyse identifizierte Klone wurden zusätzlich per Southernblot-Hybridisierung mittels einer 3'-Sonde hinsichtlich korrekter homologer Rekombination überprüft. Dazu wurde die DNS wie unter B.6.1. beschrieben isoliert und nach Restriktionsverdau mit *EcoRV* durch Agarosegelelektrophorese und Southernblot-Hybridisierung analysiert (B.6.). Als Sonde wurde ein 130 bp großes *PstI* Fragment des SM22 α -Genorts verwendet.

Im WT detektiert diese Sonde ein 9 kb großes Fragment des SM22 α -Gens. Nach Integration des modifizierten Gens entsteht durch Vorhandensein einer zusätzlichen *EcoRV* Schnittstelle ein 1,9 kb großes Fragment. ES-Zell-Klone mit einer korrekten Integration der gewünschten Mutation sollten nach der Southernblot-Hybridisierung zwei Banden zeigen, eine 9 kb große Bande des WT-Allels sowie die 1,9 kb große Bande des veränderten Allels. Da die durchgeführte Southernblot-Hybridisierung mittels einer 3'-Sonde einen Bereich überprüft, in dem sich die SM-I α und SM-I β Klone entsprechen, kann diese Methode für beide Linien eingesetzt werden.

In Abb. 12 ist die Southernblot-Strategie dargestellt. Abb. 13 zeigt die erfolgreiche Southernblot-Analyse der beiden Klone 10-12G und 3-10E. Aus diesen Klonen wurden später die SM-I α und SM-I β Linien generiert.

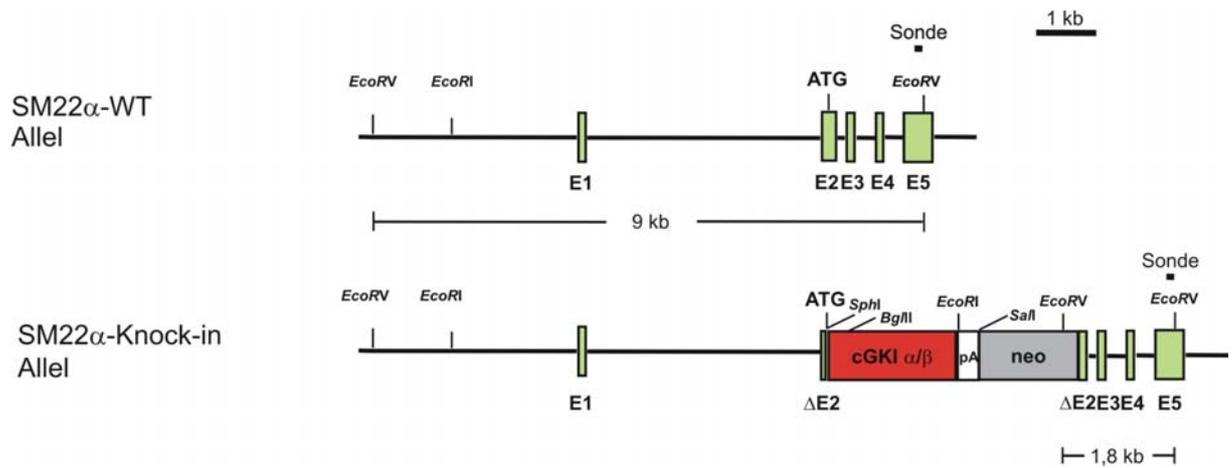


Abb. 12: Southernblot-Strategie. Nachweis der korrekten Integration in den SM22 α -Genort. Weitere Erklärung im Text.

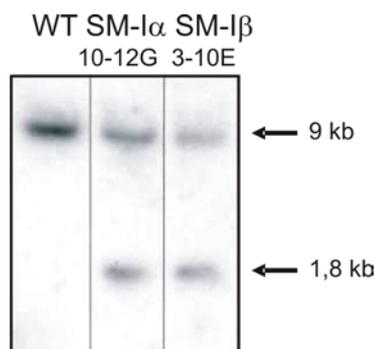


Abb. 13: Beispiel einer Southernblot-Analyse. Gezeigt ist die Analyse der Klone 10-12G und 3-10E sowie eines WT-Klons. Die 1,8 kb große Bande bestätigt die erfolgreiche Integration der genetischen Modifikation in den SM22 α -Genort.

C.1.3. Injektion der ES-Zellen in Blastozysten und Generierung chimärer Mäuse

Positiv modifizierte Klone aller ES-Zell-„Targetings“ wurden in Kultur genommen und für die Injektion in Blastozysten vorbereitet (B.7.7.). Zum Zeitpunkt der Injektion befanden sich die ES-Zell-Klone in der Passage 21-23. Injizierte Blastozysten wurden in Ammenmütter reimplantiert und von diesen ausgetragen.

Chimäre Mäuse besitzen einen Anteil an Zellen, der aus Blastozysten der schwarzen Spendertiere C57BL/6 hervorgegangen ist, sowie einen Anteil der verwendeten ES-Zellen aus agouti-farbenen 129/Sv Mäusen. Dieser prozentuale Anteil und der Grad der Chimärität kann am Fell der Chimären abgelesen werden.

Tabelle 7 zeigt eine genaue Auflistung injizierter Blastozysten, die Anzahl erhaltener Chimären und den Grad der jeweiligen Chimärität.

„Targeting“- Vektor	Klon	Anzahl inj. Blastozysten	Anzahl der Nachkommen	Anzahl der Chimären	Grad der Chimärität [%]
pSM-cGKI α	10-2F	20	9	4	5-90
	10-12G	15	10	5	5-90
	9-12G	13	5	4	80-90
pSM-cGKI β	3-11D	30	6	2	10-90
	3-10E	21	11	6	5-90

Tabelle 7: Zusammenstellung generierter Chimären. Tabellarische Auflistung genetisch modifizierter ES-Zell-Klone mit jeweiliger Anzahl injizierter Blastozysten, erhaltener Nachkommen und Anzahl generierter Chimären sowie Grad der Chimärität.

C.1.4. Testen der Chimären auf Keimbahntransmission

Zum Testen der „Keimbahngängigkeit“ (B.7.8.) wurden alle männlichen Chimären durchnummeriert (genaue Zuordnung der Nachkommen) und mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Da agouti dominant über schwarz vererbt wird, kann das modifizierte Gen nicht an Nachkommen mit schwarzem Fell weitergegeben worden sein. Agouti-farbene Nachkommen jedoch besitzen ein Allel des 129/Sv Genoms und zeigen somit die „Keimbahngängigkeit“ an. Agouti-farbene Mäuse müssen weiter analysiert werden, ob bezüglich der eingeführten genetischen Veränderung das WT (+) oder das mutierte (-) Allel von der Chimäre weitervererbt wurde (C.1.5.).

In Tabelle 8 sind alle ES-Zell-Klone, die daraus generierten Chimären sowie ihre „Keimbahngängigkeit“ aufgelistet.

„Targeting“- Vektor	Klon	Chimäre Nr.	Grad des Chimärismus [%]	„Keimbahn- gängigkeit“	
pSM-cGKI β	3-11D	1	90	nein	
		2	10	nein	
pSM-cGKI α	10-2F	3	20	ja	
		4	90	nein	
	5	5	nein		
	10-12G	6	20	ja	
		7	60	nein	
		8	90	ja	Linien-Etablierung
	9-12G	9	70	nein	
		10	90	nein	
		11	90	nein	
		12	90	nein	
13		80	nein		
pSM-cGKI β		3-10E	14	90	ja
	15		90	ja	Linien-Etablierung
	16	70	ja		
	17	70	ja		
	18	5	nein		

Tabelle 8: Auflistung aller Chimären und Zuordnung zum jeweiligen ES-Zell-Klon. ES-Zell-Klone mit bewiesener „Keimbahngängigkeit“ sind dick unterlegt. Chimäre 8 und 15 (rot hervorgehoben) wurden später zur Etablierung der Linien verwendet.

Nachdem durch PCR-Analyse die Existenz heterozygoter (+/-) SM-I α bzw. SM-I β Nachkommen gezeigt werden konnte, wurden für beide Genotypen je ein Chimärenmännchen mit bewiesener Keimbahngängigkeit ausgewählt und mit diesen die Linien begründet. Die SM-I α Linie wurde aus Chimäre Nummer 8 und die SM-I β Linie aus Chimäre Nummer 15 etabliert (Tabelle 8). Durch Verpaaren dieser Chimären mit 129/Sv Weibchen wurden Nachkommen mit reinem 129/Sv Hintergrund gezüchtet. Nachkommen aus Verpaarungen mit C57BL/6 Weibchen wurden zur Erzeugung einer kongenen Linie durch Rückkreuzung verwendet. Zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit war bereits fünfmal rückgekreuzt worden.

Nach Verpaarung heterozygoter SM-I α /I β Tiere wurden homozygote (+/+ und -/-) und heterozygote Nachkommen im Mendelschen Verhältnis geboren (Daten nicht gezeigt). Die Erzeugung homozygoter SM-I α /I β Tiere bestätigte erneut die Integration der cGKI α /I β -cDNS-Sequenzen in den SM22 α -Genort.

C.2. Analyse der SM-I α und SM-I β Mauslinien

C.2.1. RNS Analyse der genetisch modifizierten SM-I α /I β Mäuse

Die Expression von cGKI α oder cGKI β in glatten Muskelzellen unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors wurde zunächst auf mRNA Ebene durch RT-PCR-Analyse untersucht. Dazu wurden Tieren jeder Mauslinie Gewebe mit großem Anteil glatter Muskelzellen entnommen und daraus RNS wie unter B.7.10.2 beschrieben gewonnen. Zusätzlich wurde RNS aus Cerebellum als Negativkontrolle (keine glatten Muskelzellen) untersucht, sowie die Aorta von WT Mäusen analysiert. Für jede Mauslinie wurde eine geeignete RT-PCR Strategie etabliert, wobei eine Koamplifikation der SM22 α -WT RNS und der jeweiligen modifizierten RNS erfolgte.

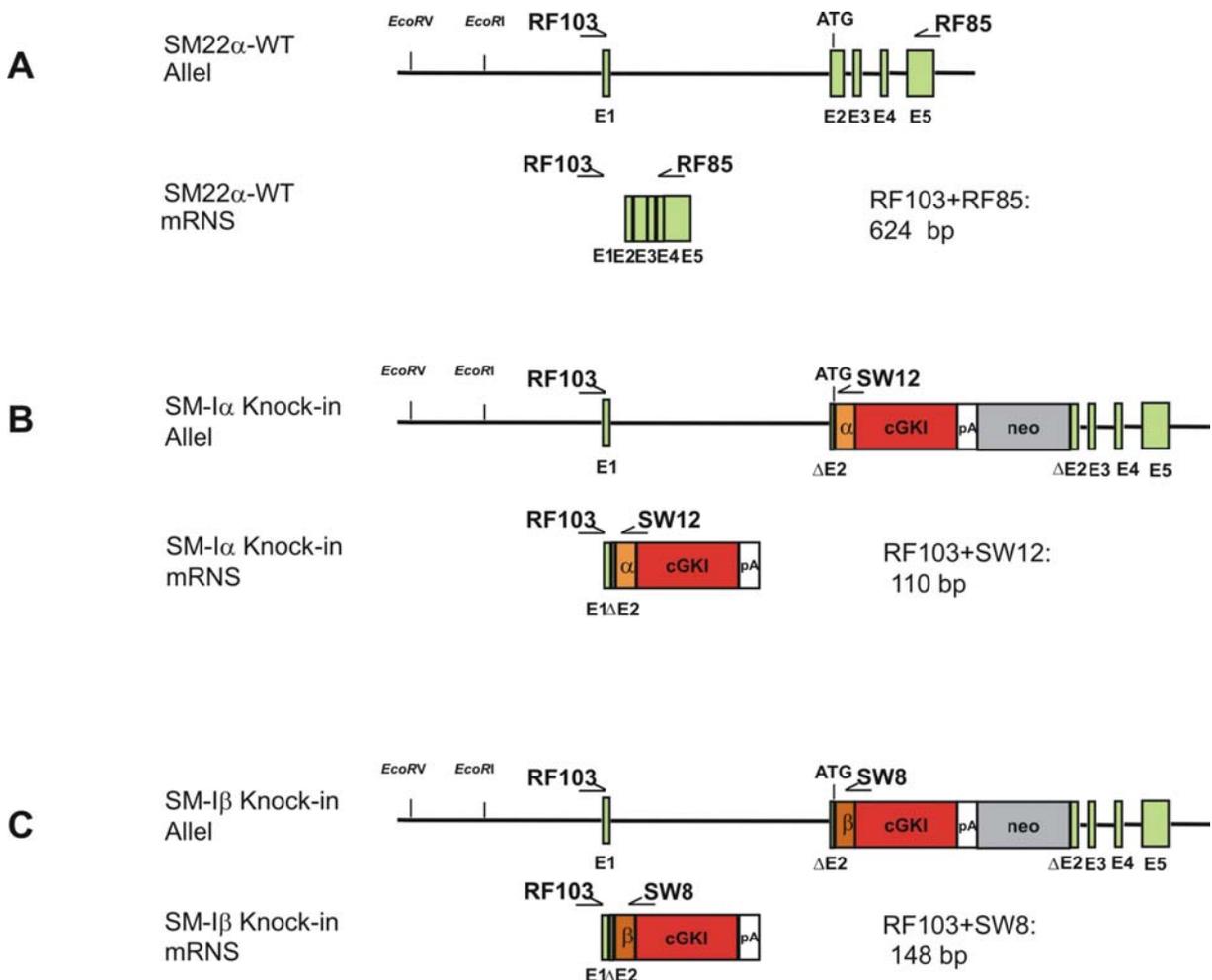


Abb. 16: RT-PCR-Strategie zur Koamplifikation der SM22 α -WT mRNA und der jeweiligen Knock-in mRNA. (A) SM22 α -WT Allel und SM22 α -WT mRNA, mit Primer Paar RF103 und RF85 entsteht ein 624 bp großes Amplifikat. (B) SM-I α Knock-in Allel sowie SM-I α Knock-in mRNA, mit Primern RF103 und SW12 entsteht ein 110 bp großes Amplifikat. (C) SM-I β Knock-in Allel und SM-I β mRNA, Primer RF103 und SW8 bilden ein 148 bp großes Amplifikat.

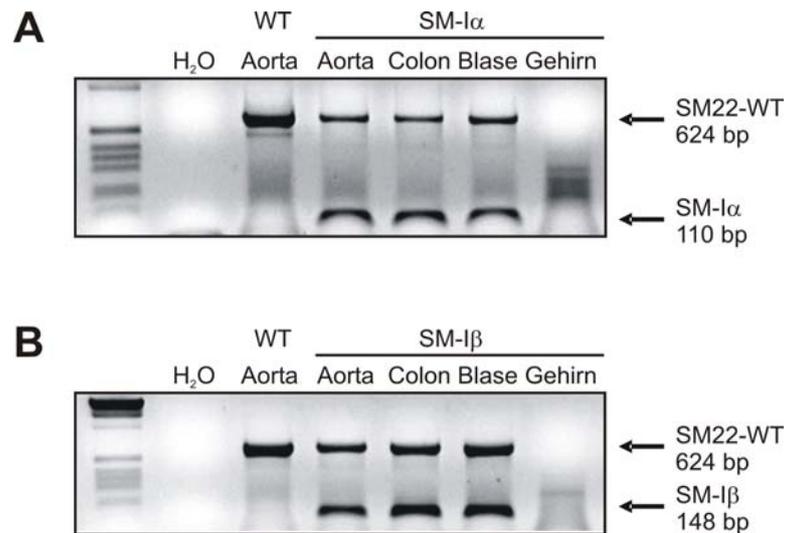


Abb. 17: RT-PCR-Analyse. Koamplifikation der SM22 α -WT RNS und SM-I α / β mRNS spezifisch in Geweben heterozygoter SM-I α / β Tiere mit hohem Anteil glatter Muskulatur. **(A)** SM-I α spezifische RT-PCR. **(B)** SM-I β spezifische RT-PCR. Weitere Erklärung im Text.

Die RT-PCR-Analyse heterozygoter SM-I α / β Tiere zeigt bei beiden Linien die Bildung modifizierter RNS in Geweben, in denen der SM22 α -Promotor aktiv ist (Aorta, Blase, Colon). Dort konnte neben einer Amplifikation der SM22 α -WT RNS auch eine Bande der modifizierten RNS detektiert werden. Im Cerebellum, indem der SM22 α -Promotor nicht aktiv ist, wurde weder die SM22 α -WT RNS noch die modifizierte RNS amplifiziert. In der Aorta von WT Mäusen konnte einzig eine SM22 α -WT Bande amplifiziert werden. Eine Sequenzanalyse der Amplifikate der „Knock-in“ RNS zeigte sowohl für die SM-I α als auch die SM-I β Linie, dass korrektes Spleißen von Exon 1 auf Δ Exon 2 stattfand.

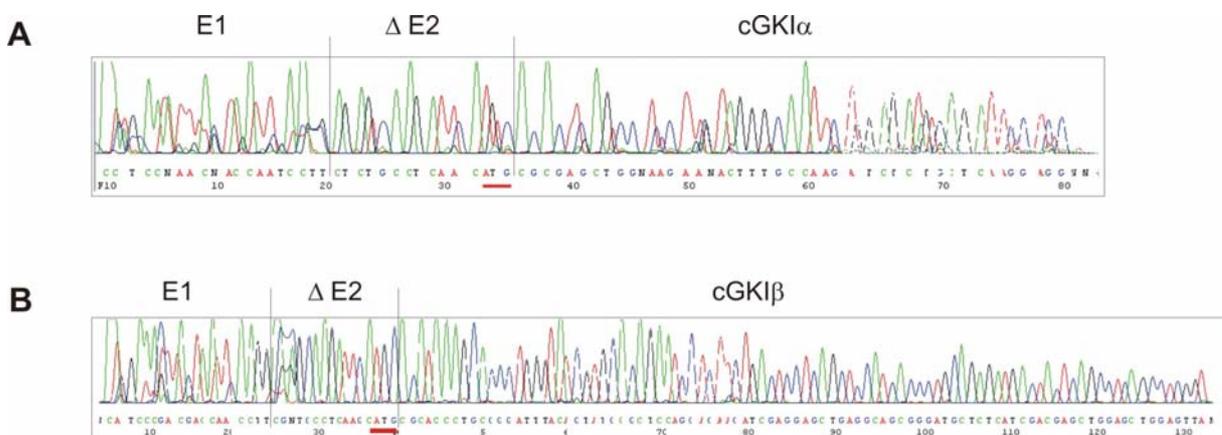


Abb. 18: Sequenzanalyse der SM-I α / β Knock-in mRNS mit Primer RF103. **(A)** Sequenzierung des SM-I α mRNS Amplifikats (Colon), siehe Abb. 17-A **(B)** Sequenzierung des SM-I β RNS Amplifikats (Colon), siehe Abb. 17-B.

C.2.2. Analyse der Proteinexpression in SM- α / β Mäusen mittels Westernblot

Die Expression von cGKI α / β Protein in glatten Muskelzellen unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht.

Von heterozygoten Mäusen beider Linien wurde Protein aus Geweben mit hohem Anteil glatter Muskelzellen isoliert (Aorta, Blase, Jejunum und Colon) und die cGKI-Expression mit einer WT Maus verglichen. Dafür wurde ein cGKI-common-Antikörper (cGKI_{com}) verwendet, der beide Isoformen der cGKI erkennt. Mittels Isoform-spezifischer cGKI-Antikörpern konnte zusätzlich der jeweilige Anteil beider Isoformen untersucht werden.

Aus Gehirn gewonnenes Protein diente als Negativkontrolle. Hier war aufgrund fehlender Aktivität des SM22 α -Promotors keine erhöhte Expression im Vergleich zum WT zu erwarten.

Die verwendeten Antikörper wurden zuvor auf ihre Funktionalität und Spezifität hin untersucht. Dazu wurde jeder Antikörper mit Protein aus dem Gehirn einer WT Maus (+/+) sowie Protein aus dem Gehirn einer cGKI^{-/-} Maus getestet. Mit WT Protein erzeugten alle Antikörper ein cGKI-Signal, während im Falle der cGKI^{-/-} Maus kein cGKI Protein detektiert wurde. Anhand gereinigter Proben cGKI α / β Proteins (freundlicherweise von Herrn PD Dr. Schlossmann zur Verfügung gestellt) konnte zusätzlich die Selektivität der Isoform-spezifischen Antikörper gezeigt werden (Abb.19 (A)).

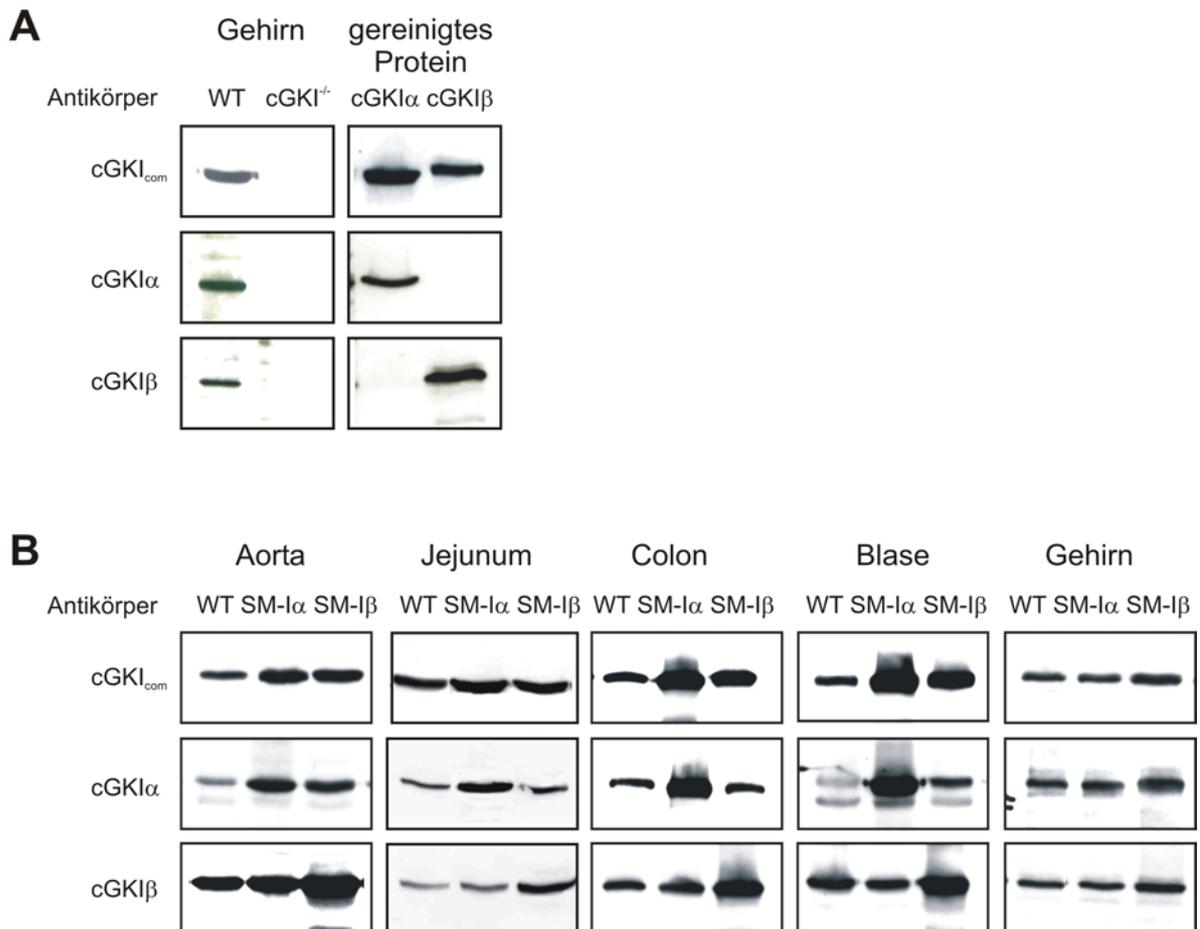


Abb. 19: Westernblot-Analyse der cGKI Expression in SM-I α / β Mäusen. (A) Test eingesetzter Antikörper, aufgetragen wurden 30 μ g Protein aus Gehirn und 4 ng gereinigtes Protein. Verwendet wurden die Isoform-spezifischen Antikörper der Firma Santa Cruz. (B) Aufgetragen wurden jeweils 30 μ g Protein aus Geweben von WT Mäusen, heterozygoten SM-I α und SM-I β Tieren. Weitere Erklärung im Text.

Die Westernblot-Analyse zeigte in den SM-I α /SM-I β Linien eine erhöhte cGKI-Expression in Geweben mit hohem Anteil glatter Muskelzellen (deutlich verstärkte Bande mit cGKI_{com}-Antikörper in Aorta, Colon, Blase und weniger verstärkte Bande in Jejunum). Die Verwendung Isoform-spezifischer Antikörper (Santa Cruz) bestätigte, dass in der SM-I α Linie in diesen Geweben eine erhöhte Expression der cGKI α -Isoform erfolgt, während die Expression der cGKI β -Isoform nicht beeinträchtigt wird und sich nicht von der im WT unterscheidet (verstärkte Bande mit cGKI α -spezifischem Antikörper in Aorta, Jejunum, Colon und Blase; keine verstärkte Bande mit cGKI β -spezifischem Antikörper). In der SM-I β Linie gilt dies analog, hier wird die cGKI β -Isoform in glatten Muskelzellen überexprimiert, während die Expression der cGKI α -Isoform unverändert bleibt.

Im Gehirn der SM-I α / β Tiere konnte keine erhöhte Bildung der cGKI detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der cGKI-Isoformen spezifisch in den

glatten Muskelzellen der jeweiligen Mauslinie erfolgt. Dies bestätigte die Kontrolle der Expression durch den Glattmuskel-spezifischen SM22 α -Promotor.

C.2.3. Weitere Untersuchungen an SM-I α / β Tieren

Genetisch veränderte Tiere der SM-I α und SM-I β Linie wurden auch hinsichtlich Aussehen, Größe und Gewicht, Geburtenrate und Fertilität untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigten sich keine Unterschiede zu WT Mäusen.

C.2.4. Kraftmessungen an SM-I α / β Mäusen

Zur Analyse der Auswirkungen einer Überexpression der cGKI-Isoformen *in vivo* wurden Kraftmessungen an Jejunum und Aorten von SM-I α / β Tieren wie unter B.8. beschrieben durchgeführt. Dabei wurde die relaxierende Wirkung des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP, die hauptsächlich durch die cGKI vermittelt wird, auf eine Hormon-induzierte Kontraktion bestimmt.

C.2.4.1. Kraftmessung am Längsmuskel des Jejunum

Nach Stimulation mit 10 μ M Carbachol, einem gegen Acetylcholinesterasen resistenten Muscarinrezeptor-Agonisten, und Einstellen eines stabilen Tonus, wurden durch kumulative Zugabe von 8-Br-cGMP Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWKs) ermittelt. Dabei wurden die Konzentrationen des zugegebenem 8-Br-cGMP derart erhöht, dass die bereits zuvor applizierte Konzentration vernachlässigt werden konnte. Die Messungen erfolgten unter Kenntnis des jeweiligen Genotyps der analysierten Tiere. In Abb. 20 sind beispielhaft für jede Mauslinie Originalregistrierungen gezeigt. Die gemessene Kraft wurde auf die Masse des untersuchten Jejunumpräparates bezogen und in mN/mg angegeben, wobei die Masse der Jejunumpräparate zwischen 7 und 13 mg lag. Zur Ermittlung der jeweiligen KWK wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt und die erhaltenen Daten statistisch ausgewertet. In Abb. 21 sind die ermittelten KWKs vergleichend aufgetragen.

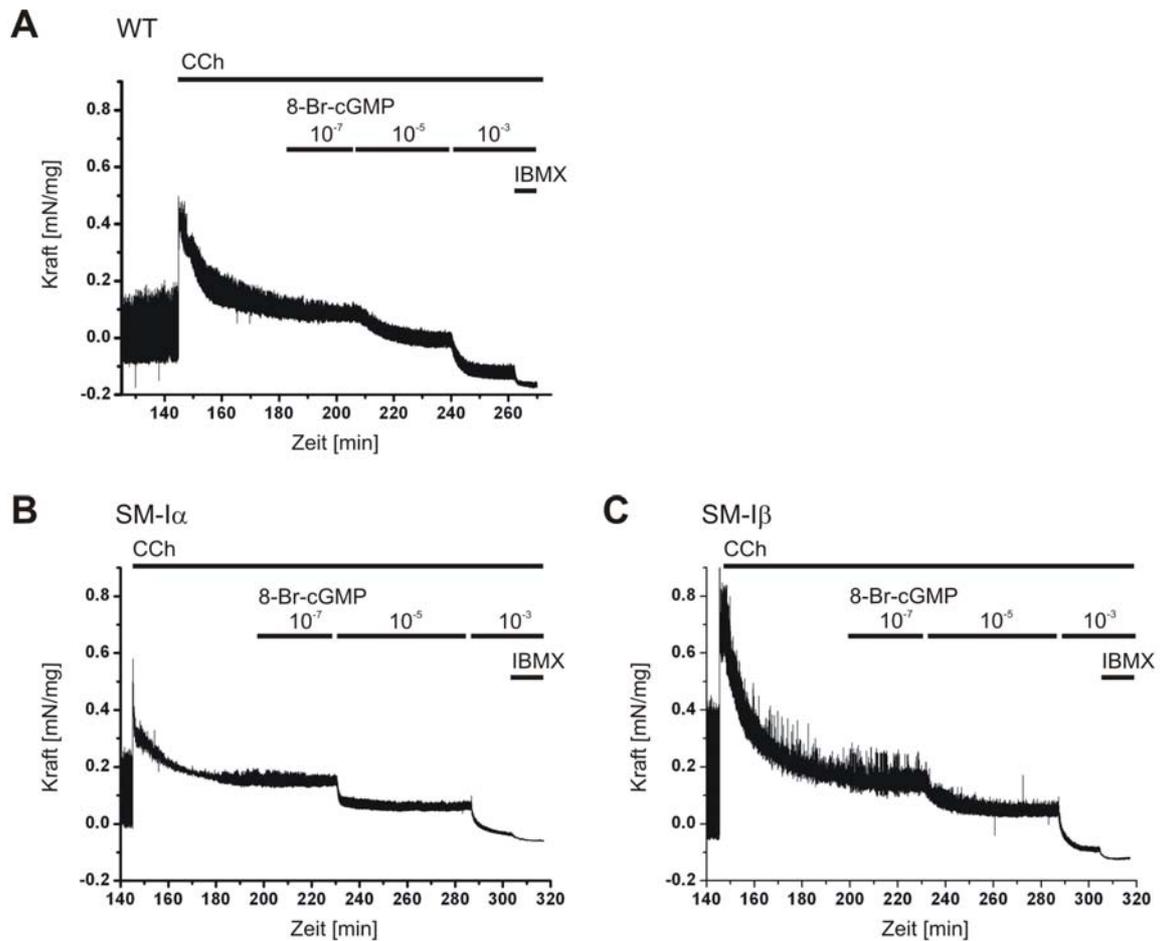


Abb. 20: Originalregistrierungen der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur von SM- α/β Mäusen. (kumulative Zugabe steigender Konzentrationen 8-Br-cGMP). Gemessen wurden Präparate von (A) WT sowie (B) heterozygoten SM- α und (C) heterozygoten SM- β Mäusen.

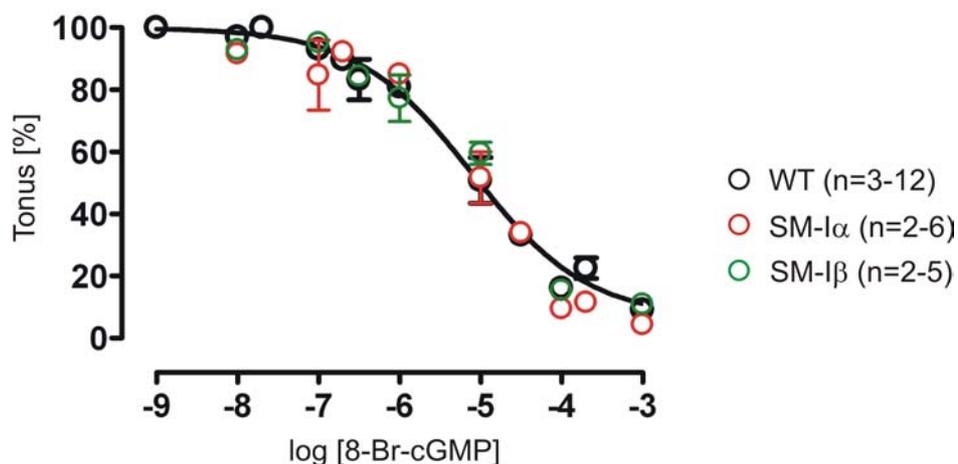


Abb. 21: KWKs der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur von SM- α/β Mäusen. Aufgetragen ist der verbleibende Tonus (in % der Gesamtkontraktion) als Funktion der 8-Br-cGMP Konzentration. Gemessen wurden WT Mäuse (schwarz, 10 Tiere untersucht), heterozygote SM- α Mäuse (rot, 5 Tiere untersucht) und heterozygote SM- β Tiere (grün, 4 Tiere untersucht). (n= die Anzahl durchgeführter Messungen eines Messpunktes). Die EC_{50} -Werte lagen zwischen $0,7 \times 10^{-5}$ M (WT), $1,2 \times 10^{-5}$ M (SM- α) und $1,3 \times 10^{-5}$ M (SM- β).

Ein Vergleich der erhaltenen KWKs zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Mauslinien. Die EC_{50} -Werte von 8-Br-cGMP lagen zwischen $0,7 \times 10^{-5}$ M und $1,3 \times 10^{-5}$ M. Dies deutet darauf hin, dass im Jejunum die Überexpression einer Isoform der cGKI, die durch Westernblot-Analyse gezeigt werden konnte, keine Auswirkung auf die 8-Br-cGMP vermittelte Relaxierung einer Hormon-stimulierten Kontraktion hat.

C.2.4.2. Kraftmessung an der Aorta

Erste Untersuchungen an Aorten der Überexpressionslinien und Aorten von WT Mäusen wurden zusätzlich durchgeführt. Dazu wurden Aorten wie unter B.8.1. beschrieben präpariert, mit $3 \mu\text{M}$ Phenylephrin (Phe) kontrahiert (unter zusätzlicher Hemmung der eNOS durch L-NAME) und nach Einstellen eines stabilen Tonus mit 1 mM 8-Br-cGMP relaxiert. Die Kraftmessung erfolgte unter Kenntnis des Genotyps der untersuchten Tiere.

In ersten Messungen relaxierten vorkontrahierte Aorten der SM- α/β Tiere durch 1 mM 8-Br-cGMP stärker als Aorten von WT Mäusen.

Dieser Befund muss durch weitere Messungen jedoch erst bestätigt werden. Ebenso werden künftig weitere Versuche zur Ermittlung der KWKs durchgeführt.

C.3. Generierung und Analyse der „Rescue-Linien“ unter Verwendung der SM-I α und SM-I β Linien

Zur Untersuchung der Bedeutung der cGKI-Deletion im glatten Muskel an der Entstehung des multiplen Phänotyps der cGKI^{-/-} Tiere (A.4.4.), sollte eine sog. „Rescue“-Strategie durchgeführt werden. Durch Einkreuzen der SM-I α oder SM-I β Linie in einen cGKI-defizienten Hintergrund sollten Mäuse generiert werden, bei denen die Expression einer Isoform der cGKI ausschließlich im glatten Muskel wiederhergestellt ist. Dieser Gewebespezifische „Rescue“ einer Isoform und eine vergleichende Analyse mit cGKI^{-/-} Mäusen ermöglicht sowohl die Untersuchung der Bedeutung der cGKI im glatten Muskel, als auch eine Isoform-spezifische Studie dieser Funktion.

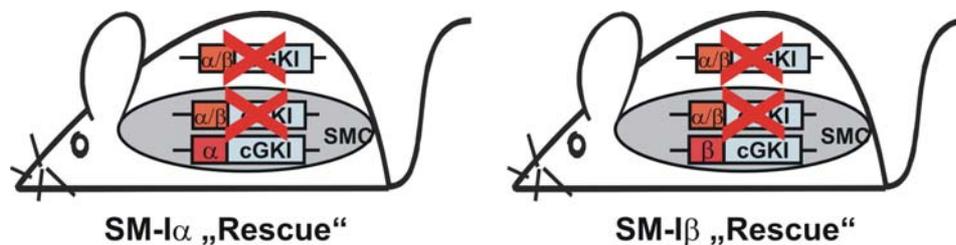


Abb. 22: Schematische Darstellung der cGKI Expression in SM-I α/β „Rescue“ Mäusen. Nur eine Isoform der cGKI wird ausschließlich in glatten Muskelzellen (SMC, grau unterlegte Ellipse) unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors exprimiert. Das endogene cGKI-Gen war mutiert worden und somit die cGKI-Expression in allen Zellen unterbunden (endogener Genort durchgestrichen).

Zur Erzeugung des cGKI-defizienten Backgrounds wurden Mäuse verwendet, denen auf einem Allel das Exon 10 der cGKI deletiert worden war. Diese cGKI/L- Mauslinie war zuvor in der Arbeitsgruppe unter Herrn Prof. Dr. Feil generiert worden (Wegener et al., 2002). Homozygote Träger dieser Deletion (-/-) können keine funktionsfähige cGKI mehr exprimieren (cGKI^{-/-}).

Zur Generierung der „Rescue“ Mauslinien müssen zwei Genorte betrachtet werden. Um die jeweilige cGKI-Isoform unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors zu exprimieren, mussten die „Rescue“ Tiere heterozygote Träger (+/-) des jeweiligen Knock-in Allels sein, wobei (+) dem SM22 α -WT Allel und (-) dem Knock-in Allel entspricht. Weiterhin musste das endogene cGKI-Gen homozygot deletiert sein (-/-), um die endogene cGKI-Expression auszuschalten. Ein detailliertes Zuchtschema ist in Abb. 23 dargestellt. Aufgrund des Phänotyps der cGKI^{-/-} Mäuse, mussten zunächst zwei heterozygote Eltern generationen gezüchtet und diese schließlich miteinander verpaart werden.

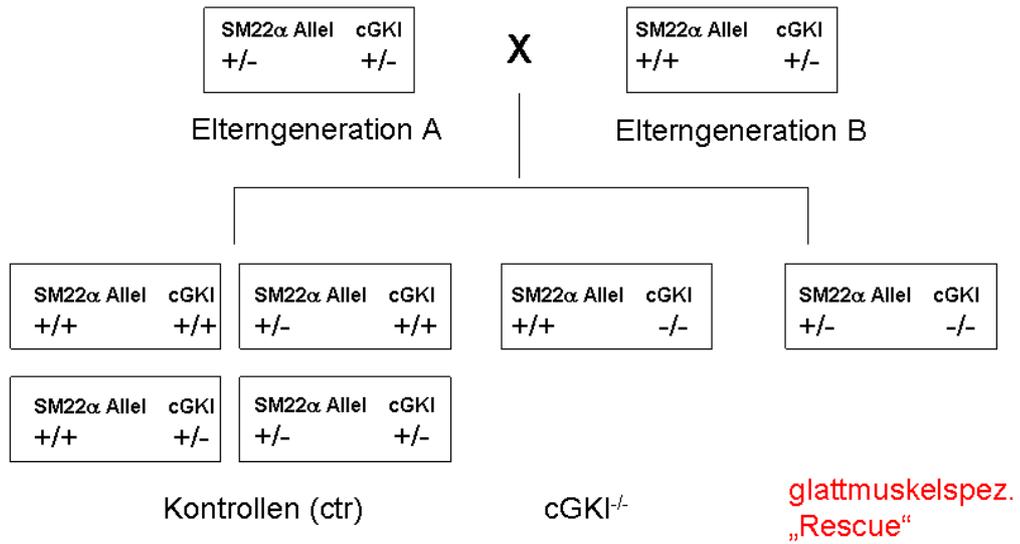


Abb. 23: Zuchtschema zur Generierung Glattmuskelspezifischer SM- α/β „Rescue“ Tiere.
 Weitere Erklärung im Text.

C.3.1. Analyse der Proteinexpression in „Rescue“ Mäusen mittels Westernblot

Die spezifische Expression von cGKI α -Protein in glatten Muskelzellen heterozygoter SM-I α „Rescues“ und cGKI β -Protein in glatten Muskelzellen heterozygoter SM-I β „Rescues“ wurde mittels Westernblot analysiert.

Von beiden Mauslinien wurde Protein aus Gewebe mit hohem Anteil glatter Muskelzellen (Aorta, Jejunum) isoliert (B.7.11.) und die cGKI-Expression mit einer WT Maus sowie einer cGKI $^{-/-}$ Maus verglichen. Es wurden der cGKI $_{\text{com}}$ -Antikörper sowie Isoform-spezifische cGKI-Antikörper verwendet (siehe C.2.2).

Protein aus Gehirn diente als Negativkontrolle. Hier sollte sowohl bei der cGKI $^{-/-}$ Maus, als auch bei den beiden „Rescue“ Linien (SM22 α -Promotor inaktiv) keine cGKI- Expression zu detektieren sein. MAPK (für „mitogen activated protein kinase“) diente als Ladungskontrolle.

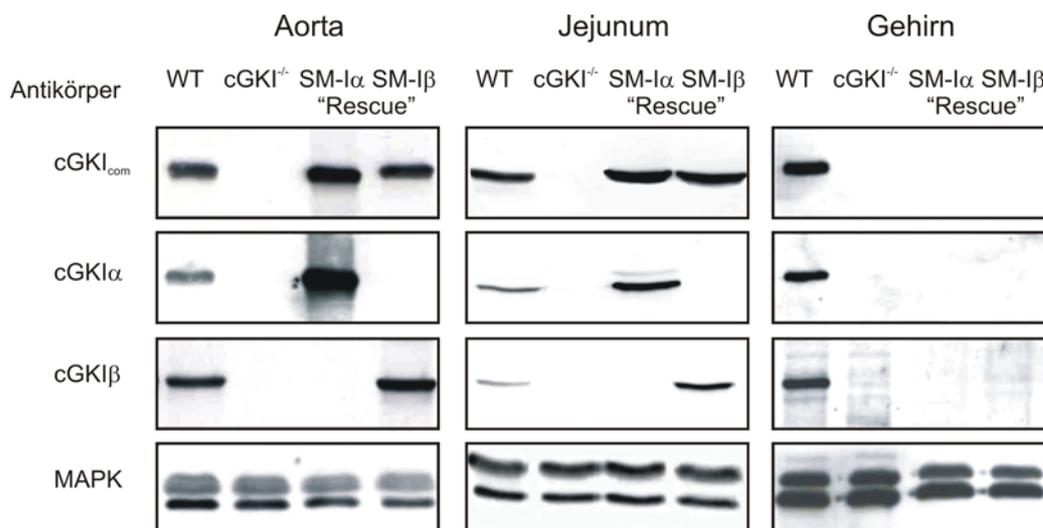


Abb. 24: Westernblot Analyse der cGKI-Expression in heterozygoten SM-I α / β „Rescue“ Mäusen sowie WT und cGKI $^{-/-}$. Aufgetragen wurde jeweils 30 μ g Protein. Weitere Erklärung im Text. Der cGKI α -spezifische Antikörper stammte hier von Herrn PD J. Schlossmann. Der cGKI β -spezifische Antikörper wurde von der Firma Santa Cruz bezogen.

In Aorta, Jejunum und Gehirn des WT konnte mit allen Antikörpern ein cGKI-Signal detektiert werden, während in der cGKI $^{-/-}$ Maus keine cGKI-Expression nachzuweisen war. Für die SM-I α „Rescue“ Linie konnte gezeigt werden, dass in Aorta und Jejunum ausschließlich die α -Isoform exprimiert wird, da sowohl mit dem cGKI $_{\text{com}}$ - als auch mit dem cGKI α -Antikörper, nicht aber mit dem cGKI β -Antikörper, eine Bande zu detektieren war. Gleiches gilt für Aorta und Jejunum der SM-I β „Rescue“ Linie. Hier war mit dem cGKI $_{\text{com}}$ - und mit dem cGKI β -, nicht aber mit dem cGKI α -Antikörper, eine Protein-Expression nachzuweisen.

Ein Vergleich der mit Hilfe der Isoform-spezifischen Antikörper erhaltenen cGKI-Banden in Geweben der „Rescue“ Tiere und WT Mäuse deutete darauf hin, dass die Kontrolle des SM22 α -Promotors in „Rescue“ Mäusen zu einer erhöhten cGKI Expression im glatten Muskel führt. Dies war insbesondere bei Verwendung des cGKI α -Antikörpers zu beobachten. Interessanterweise ergab sich bei der Verwendung des cGKI_{com}-Antikörpers, dass die cGKI Expression im glatten Muskel der „Rescue“ Tiere kaum erhöht ist und eher der von WT Mäusen entspricht. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der cGKI_{com}-Antikörper eventuell die cGKI α -Isoform schlechter detektieren kann.

Weder im Gehirn der cGKI^{-/-} Maus, noch in den „Rescue“ Linien konnte eine cGKI-Expression nachgewiesen werden, während in der WT Maus deutliche Signale zu detektieren waren. Dies weist darauf hin, dass die Expression der cGKI in den „Rescue“ Mäusen ausschließlich in glatten Muskelzellen erfolgt.

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass die erhaltenen „Rescue“ Tiere eine Isoform der cGKI in glatten Muskelzellen exprimieren.

C.3.2. Kaplan-Meier Überlebenskurve

Die Lebenserwartung Isoform-spezifischer „Rescue“ Mäuse und cGKI^{-/-} Mäuse wurde miteinander verglichen (B.9.). Die daraus ermittelte Überlebenskurve ist in Abb. 25 dargestellt.

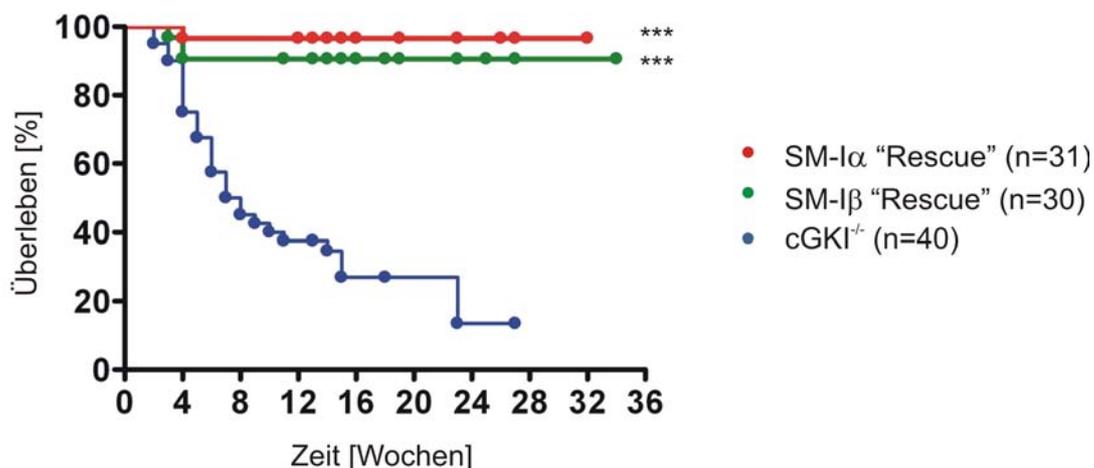


Abb. 25: Kaplan-Meier Überlebenskurve. Verglichen werden konventionelle cGKI^{-/-} Tiere (blau) mit SM-I α „Rescues“ (rot) und SM-I β „Rescues“ (grün). Die Überlebenskurven beider „Rescue“ Linien verlaufen signifikant unterschiedlich zu der von cGKI^{-/-} Tieren ($p < 0,0001$). (n= Anzahl der Tiere eines Genotyps).

Bereits zwei Wochen nach der Geburt verstarben die ersten cGKI^{-/-} Mäuse. Nach ca. 7 Wochen waren nur noch 50% der analysierten cGKI^{-/-} Mäuse am Leben. Auch danach war ein weiteres Versterben zu beobachten. Nach 23 Wochen lebten lediglich noch ca. 10%.

Signifikant unterschiedlich dazu verliefen die Überlebenskurven beider „Rescue“ Linien. Bis auf einzelne Todesfälle 3-4 Wochen nach Geburt verstarben in den darauf folgenden Wochen keine Tiere mehr. Die ersten gezüchteten „Rescue“ Mäuse lebten zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch und waren schon zwischen 20-34 Wochen alt (SM-I α „Rescue“ Linie: 9 Tiere; SM-I β „Rescue“ Linie: 6 Tiere).

Die Expression der cGKI in glatten Muskelzellen verhindert offensichtlich das Entwickeln des letalen Phänotyps konventioneller cGKI^{-/-} Tiere. Dabei spielt es keine Rolle, welches der beiden Isoenzyme, cGKI α oder cGKI β , zum „Rescue“ eingesetzt wird. Die Expression allein einer der beiden Isoformen im glatten Muskel ist ausreichend, die Lebenserwartung deutlich zu erhöhen. Weitere Beobachtungen müssen zeigen, ob diese gestiegene Lebenserwartung vollständig mit der von WT Mäusen identisch ist.

C.3.3. Gewichtsanalyse

Es wurde ein Gewichtsvergleich zwischen Kontrolltieren (CTR), $cGKI^{-/-}$ und den „Rescue“ Tieren erstellt (Abb.26.). Würfe im Alter von zwei Wochen und 10 Wochen wurden gewogen und die erhaltenen Massen der Genotypen miteinander verglichen.

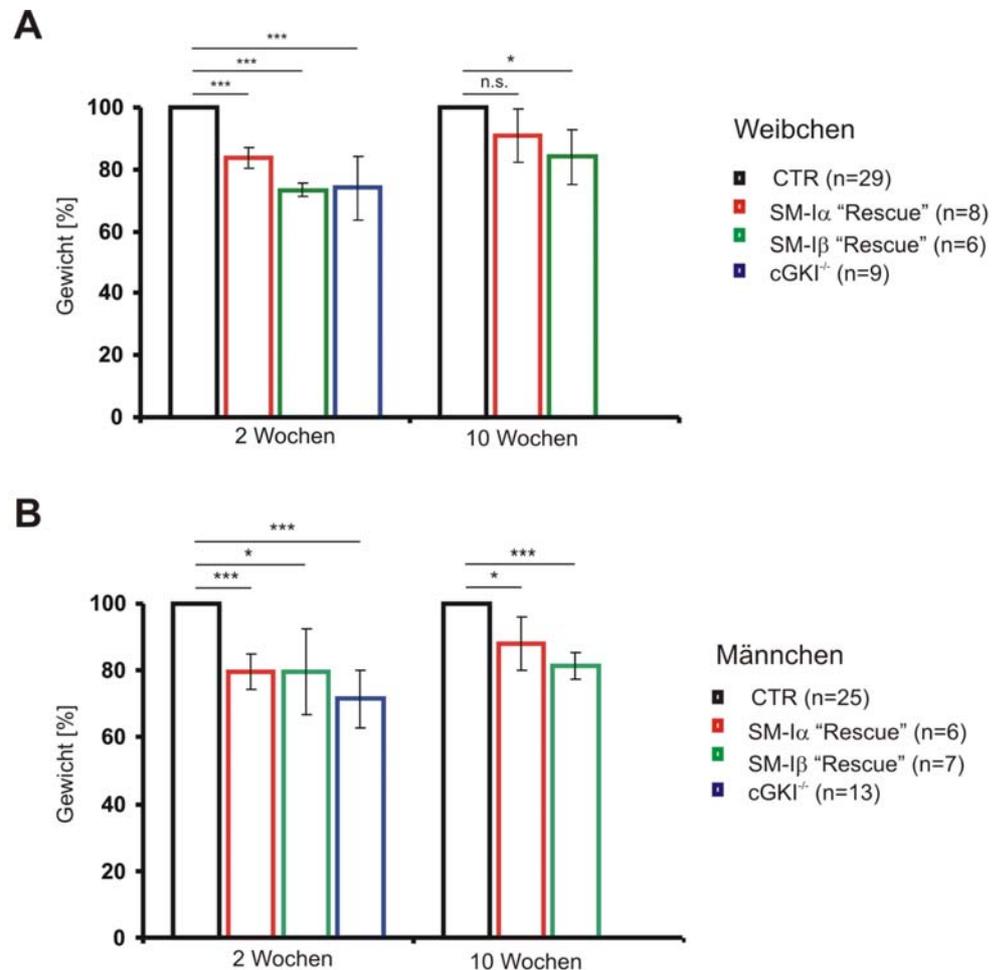


Abb. 26: Gewichtsanalyse der SM-I α/β „Rescue“ Linien. CTR Mäuse (schwarz), SM-I α „Rescue“ (rot), SM-I β „Rescue“ (grün) und $cGKI^{-/-}$ Tiere (blau) wurden mit 2 Wochen und 10 Wochen (nicht $cGKI^{-/-}$ Tiere) gewogen. Massen der CTR Tiere wurden jeweils gemittelt und als Bezugspunkt gleich 100% gesetzt (n= Anzahl gewogener Tiere). (A) Weibchen (B) Männchen.

Sowohl Männchen als auch Weibchen beider „Rescue“ Linien wiegen weniger als die jeweilige Kontrollgruppe. Im Alter von zwei Wochen liegt ein signifikanter bis hochsignifikanter Gewichtsunterschied vor ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$). Dieser Unterschied entspricht dem der $cGKI^{-/-}$ Tiere, die sich ebenfalls hochsignifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden. Nach 10 Wochen ist der Großteil der $cGKI^{-/-}$ Tiere bereits verstorben (keine Gewichtsanalyse möglich). „Rescue“ Tiere hingegen leben noch (C.3.2.) und können an Gewicht zunehmen. Bis auf die Gruppe männlicher SM-I β „Rescues“ konnten alle anderen

Versuchsgruppen den relativen Gewichtsunterschied zur Kontrollgruppe sogar verringern ($p < 0,05$).

C.3.4. Untersuchungen zur Fertilität der „Rescue“ Linien

Hedlund et al zeigten, dass bei $cGKI^{-/-}$ Mäusen, die das Erwachsenenalter erreichen, die Fortpflanzungsfähigkeit aufgrund von Erektionsstörungen männlicher Tiere stark eingeschränkt ist (Hedlund et al., 2000). Männchen der SM- α / SM- β -„Rescue“ Linien hingegen zeigten keine Einschränkungen ihrer Fortpflanzungsfähigkeit und erzeugten gesunde Nachkommen. Weibliche „Rescue“ Tiere wurden bislang noch nicht getestet.

C.3.5. Kraftmessungen an „Rescue“ Mäusen

Anhand von Kraftmessungen an Aorten und Jejunumpräparaten von „Rescue“ Tieren, WT Mäusen und $cGKI^{-/-}$ Tieren sollten funktionelle Auswirkungen, des „Rescues“ der $cGKI$ im glatten Muskel bestimmt werden. Pfeifer et al. zeigten, dass bei $cGKI^{-/-}$ Mäusen die NO/cGMP-abhängige Relaxation der intestinalen und vaskulären glatten Muskulatur gestört ist (Pfeifer et al., 1998).

C.3.5.1. Kraftmessung am Jejunum

Jejunumpräparate von WT Mäusen, $cGKI^{-/-}$ und „Rescue“ Tieren wurden wie unter B.8.1.1 und C.2.4.1 beschrieben untersucht. Abb. 27 zeigt beispielhaft für jeden Genotyp eine Originalregistrierung, die durch mehreren Messungen ermittelten KWKs sind in Abb. 28 dargestellt.

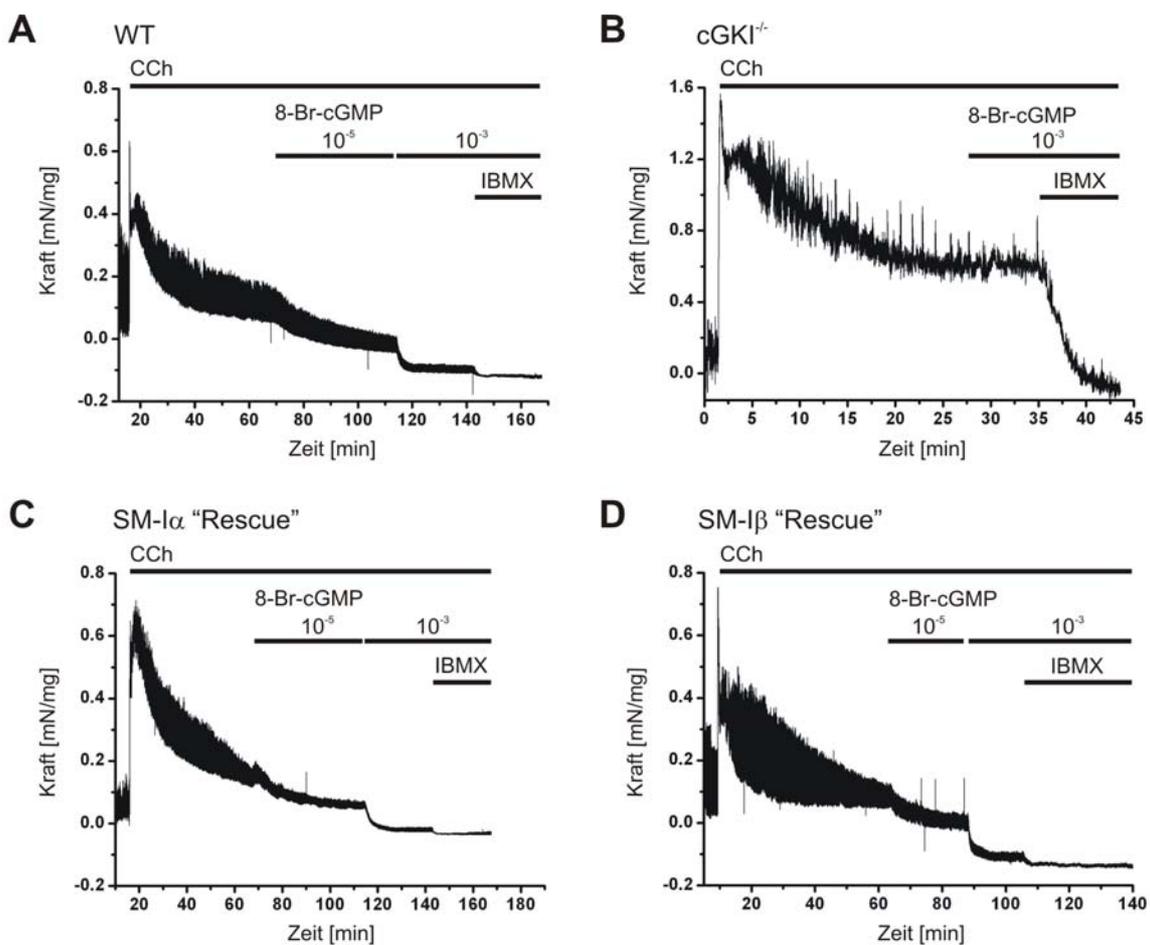


Abb. 27: Originalregistrierungen der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur der „Rescue“ Linien. Gezeigt werden Präparate von WT Mäusen (A), $cGKI^{-/-}$ (B), sowie SM- α „Rescue“ (C) und SM- β „Rescue“ Mäusen (D) unter kumulativer Zugabe von 8-Br-cGMP.

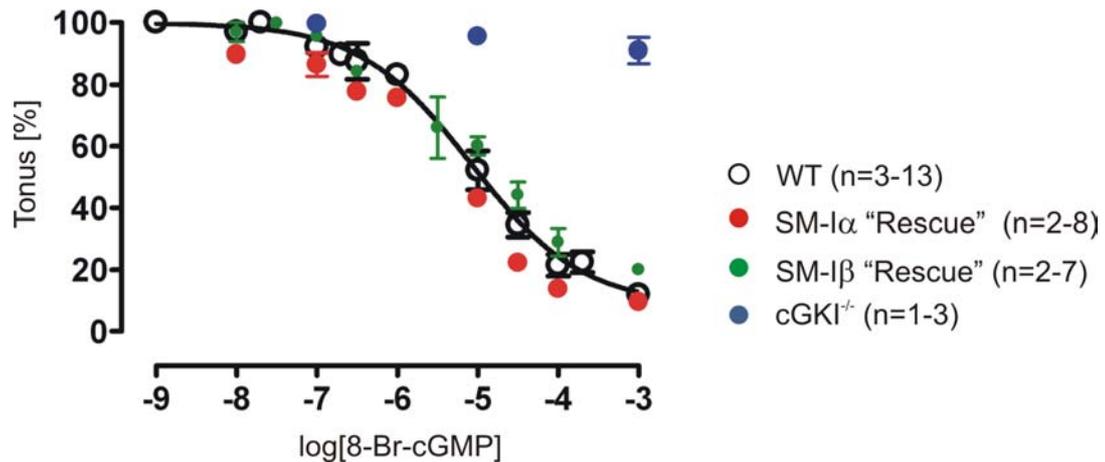


Abb. 28: KWKs der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung CCh-vorkontrahierter Jejunummuskulatur der „Rescue“ Linien. WT Mäuse (schwarz, 8 Tiere untersucht), SM-1 α „Rescues“ (rot, 5 Tiere untersucht), SM-1 β „Rescues“ (grün, 5 Tiere untersucht) und cGKI^{-/-} Mäuse (blau, 2 Tiere untersucht). (n= Anzahl durchgeführter Messungen eines Messpunktes). Die EC₅₀-Werte lagen zwischen $8,3 \times 10^{-6}$ M (WT), 5×10^{-6} M (SM-1 α „Rescue“) und 9×10^{-6} M (SM-1 β „Rescue“) (cGKI^{-/-} Kurve ausgenommen).

Die erhaltenen KWKs zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und „Rescue“-Linien. Die EC₅₀-Werte von 8-Br-cGMP liegen zwischen $5-9 \times 10^{-6}$ M. Im Gegensatz ist bei cGKI^{-/-} Tieren die 8-Br-cGMP vermittelte Relaxierung deutlich gestört. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression der 1 α - oder 1 β -Isoform in glatten Muskelzellen genügt, die cGMP-vermittelte Relaxierung wiederherzustellen.

C.3.5.2. Kraftmessung an der Aorta

Aorten von WT Mäusen, $cGKI^{-/-}$ und „Rescue“ Tieren wurden wie unter B.8.1.1. beschrieben untersucht. Abb. 29 zeigt beispielhaft für jeden Genotyp eine Originalregistrierung, die durch mehrere Messungen ermittelten KWKs sind in Abb. 30 dargestellt.

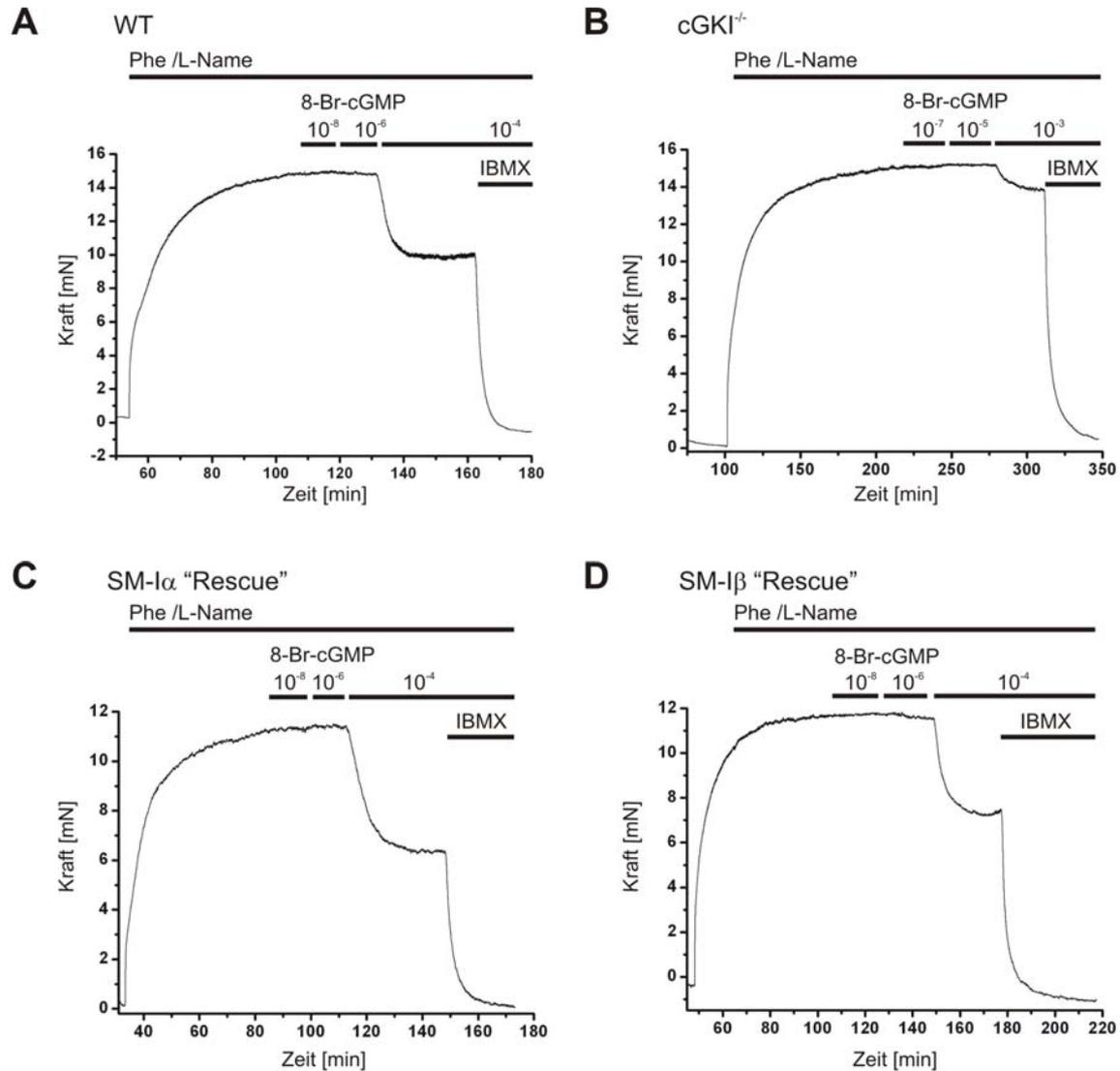


Abb. 29: Originalregistrierungen der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung Phe-vorkontrahierter Aorten der „Rescue“ Linien. Gezeigt sind Aortenpräparate von WT (A), $cGKI^{-/-}$ (B), sowie SM-I α „Rescue“ (C) und SM-I β „Rescue“ Mäusen (D) unter kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen 8-Br-cGMP.

In Aorten von WT Mäusen bewirkte die Gabe von $100 \mu\text{M}$ 8-Br-cGMP eine Relaxierung von ca. 40%. Sowohl bei Aorten von SM-I α und SM-I β „Rescues“ konnte eine ähnliche Relaxierung gemessen werden. Aorten von $cGKI^{-/-}$ Mäusen zeigten auch bei einer erhöhten Konzentration an 8-Br-cGMP (1 mM) lediglich eine Relaxierung von ca. 10%.

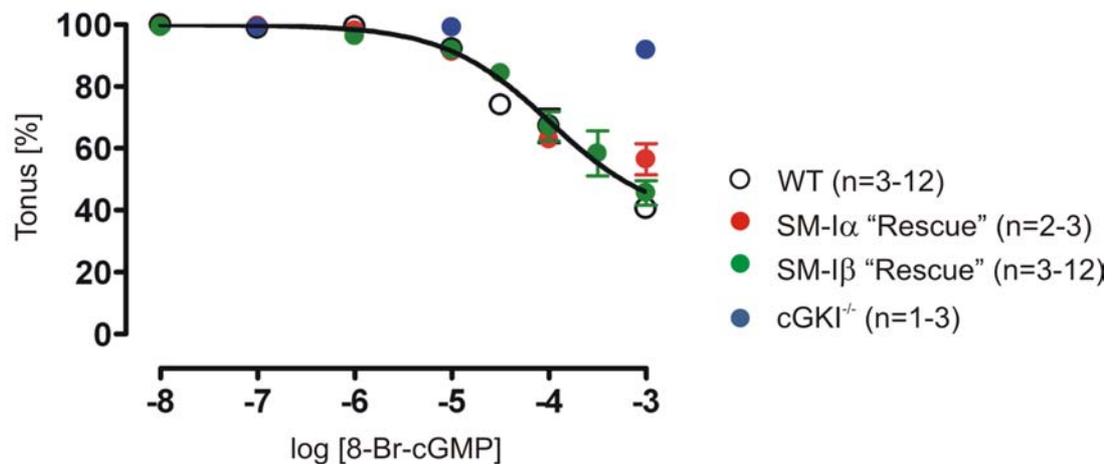


Abb. 30: KWKs der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung Phe-vorkontrahierter Aorten der „Rescue“ Linien. WT (schwarz, 8 Tiere untersucht), SM-I α „Rescues“ (rot, 5 Tiere untersucht), SM-I β „Rescues“ (grün, 5 Tiere untersucht) und cGKI $^{-/-}$ (blau, 1 Tier untersucht). (n= Anzahl durchgeführter Messungen eines Messpunktes). Die EC₅₀-Werte lagen bei 1,2x10⁻⁴ M (WT), 2x10⁻⁴ M (SM-I α „Rescue“) und 1,6x10⁻⁴ M (SM-I β „Rescue“). (cGKI $^{-/-}$ Kurve ausgenommen).

Die an Aorten von SM-I α und SM-I β „Rescues“ ermittelten KWKs stimmen mit der von WT Mäusen überein. cGKI $^{-/-}$ Tiere dagegen zeigen einen völlig unterschiedlichen Kurvenverlauf unter gestörter Relaxation des glatten Muskels. Auch in Aorten genügt also die Expression einer Isoform der cGKI zur vollständigen Wiederherstellung der Funktionalität des glatten Muskels.

Bei der höchsten eingesetzten 8-Br-cGMP Konzentration von 10⁻³ M befand sich das System noch nicht im gesättigten Zustand. Dies muss bei der Erstellung der KWKs bedacht werden. Weitere Messungen unter höherer 8-Br-cGMP Konzentration müssen zeigen, ob noch eine weitere Relaxierung der Aorten möglich ist.

Die an Aortenpräparaten ermittelten EC₅₀-Werte unterscheiden sich deutlich von denen an Jejunumpräparaten ermittelten. Zur halbmaximalen Relaxierung der Aorten ist eine um eine Zehnerpotenz erhöhte 8-Br-cGMP Konzentration im Vergleich zum Jejunum notwendig.

D. Diskussion

Die Generierung transgener Mäuse ermöglicht es die physiologische und pathophysiologische Rolle verschiedener Signalstoffe und Signalkaskaden *in vivo* zu analysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue *in vivo* Modelle zur Analyse der Funktion der beiden Isoformen der cGKI im glatten Muskel generiert und untersucht. Zunächst wurden zwei neue Mauslinien erzeugt, bei denen unter Kontrolle des endogenen Glattmuskel-spezifischen Promotors SM22 α je eine Isoform der cGKI selektiv in glatten Muskelzellen exprimiert wird (SM-I α bzw. SM-I β Linie).

Analyse der SM-I α / β Linien

Die erfolgreiche Generierung von Mauslinien, welche die cGKI α - oder cGKI β -Isoform selektiv im glatten Muskel überexprimieren, wurde anhand von Gen-, RNS- und Protein-Analysen nachgewiesen. PCR-Analysen und Southernblot-Hybridisierung bestätigten die korrekte Integration der cGKI α bzw. cGKI β kodierenden cDNS-Sequenz in den SM22 α -Genort (C.1.2.). RT-PCR-Untersuchungen zeigten für beide generierte Mauslinien, dass selektiv in glatten Muskelzellen die Bildung modifizierter mRNS unter korrektem Spleißen erfolgt (C.2.1.). Auf Proteinebene bewies die Westernblot-Analyse die erhöhte Expression jeweils einer Isoform der cGKI ausschließlich in glatten Muskelzellen (C.2.2.). In Geweben mit einem hohen Anteil glatter Muskulatur (Aorta, Blase, Jejunum und Colon) konnten deutlich höhere Mengen an cGKI Protein als in WT Mäusen nachgewiesen werden. Isoform-spezifische Antikörper ermöglichten zusätzlich den Nachweis, dass in der SM-I α Linie tatsächlich cGKI α und in der SM-I β Linie cGKI β überexprimiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression einer Isoform keine Veränderung der Expression der anderen Isoform bewirkt.

Nach erfolgreicher Generierung der SM-I α und SM-I β Mauslinien, wurden mögliche funktionelle Auswirkungen der Isoform-spezifischen Überexpression im glatten Muskel durch Kraftmessungen an Aorta- und Jejunumpräparaten analysiert. Dazu wurde die relaxierende Wirkung von 8-Br-cGMP auf die Hormon-induzierte Kontraktion bestimmt (C.2.4.).

Erste Untersuchungen an Aorten der SM-I α und SM-I β Linie zeigten, dass diese bei einer 8-Br-cGMP Konzentration von 1 mM stärker relaxierten als Aorten von WT Mäusen. Dieser Befund muss jedoch durch weitere Messungen bestätigt werden. Zusätzlich müssen die jeweiligen KWKs ermittelt werden.

Im Jejunum zeigte die Überexpression einer Isoform der cGKI im glatten Muskel keine Auswirkung auf die 8-Br-cGMP vermittelte Relaxierung nach Hormon-induzierter Kontraktion. Die ermittelten KWKs von 8-Br-cGMP heterozygoter Tiere der SM-I α und SM-I β Linien

stimmten mit der von WT Tieren überein (C.2.4., Abb. 21). In diesem Gewebe scheint die endogene cGKI- Expression kein limitierender Faktor der Relaxierung zu sein, weshalb eine zusätzliche cGKI- Expression keine Auswirkung auf die Relaxierung hat.

Analyse der „Rescue“ Linien

Durch Generierung neuer *in vivo* Modelle sollte geklärt werden, welche Defekte der cGKI^{-/-} Mäuse (A.4.4.) auf einer zellautonomen Funktion der cGKI im glatten Muskel beruhen. Zusätzlich sollte anhand dieser beiden *in vivo* Modelle die Bedeutung der beiden Isoformen der cGKI im glatten Muskel analysiert werden.

Durch Einkreuzen der SM-I α und SM-I β Linien in cGKI^{-/-} Mäuse wurde die Expression je einer Isoform der cGKI selektiv im glatten Muskel wiederhergestellt und die Auswirkung dieses „Rescues“ untersucht.

Westernblot-Analysen bestätigten nach Einkreuzen der SM-I α/β Linien (C.3.) die erfolgreiche Durchführung der „Rescue“ Strategie (C.3.1.). Es konnte für beide „Rescue“ Linien gezeigt werden, dass eine Expression des cGKI α - oder cGKI β -Proteins selektiv in Geweben mit hohem Anteil glatter Muskelzellen erfolgt (Abb. 24).

Das Erstellen einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier und Vergleichen der SM-I α/β „Rescue“ Tiere mit cGKI^{-/-} Mäusen ergab, dass Tiere beider „Rescue“ Linien eine signifikant höhere Lebenserwartung als cGKI^{-/-} Mäuse aufweisen (C.3.2). Die Expression der cGKI einzig in glatten Muskelzellen reicht in „Rescue“ Mäusen aus, das Ausbilden des letalen Phänotyps der cGKI^{-/-} Mäuse zu verhindern. Dies zeigt, dass die verringerte Lebenserwartung der cGKI^{-/-} Tiere wahrscheinlich auf der zellautonomen Funktion der cGKI im glatten Muskel beruht.

Da beide „Rescue“ Strategien zu einer Verlängerung der Lebenserwartung führen, reicht offensichtlich die Expression einer Isoform der cGKI in glatten Muskelzellen zum Überleben der Tiere aus. In den „Rescue“ Linien erfolgt die Expression der cGKI-Isoformen unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors, wodurch teilweise ein erhöhtes Expressionslevel der jeweiligen Isoform im Vergleich zum endogenen Niveau entsteht (C.3.1, Abb. 24). Bislang liegen jedoch keine Hinweise vor, dass die leicht erhöhte Expression der Isoformen im Vergleich zum WT zu veränderten funktionellen Effekten führt (C.3.5.).

Neben der reduzierten Lebenserwartung zeigen cGKI^{-/-} Tiere einen multiplen Phänotyp. Diese Mäuse bleiben u.a. in ihrer körperlichen Entwicklung zurück (Wolfsgruber, 2003 (a);

eigene Beobachtungen). $cGKI^{-/-}$ Mäuse sind i.d.R. kleiner und wiegen weniger als Kontrolltiere. Ebenso wurde eine Mangelernährung beobachtet (Wolfsgruber, 2003 (a)), die in Verbindung mit dem starken gastrointestinalen Phänotyp der Tiere gebracht wurde. Der Einfluss der Mangelernährung und die Bedeutung des Fehlens der $cGKI$ im glatten Muskel an der beobachteten Wachstumsstörung konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden.

SM-I α und SM-I β „Rescue“ Mäuse weisen ebenfalls eine verringerte Körpergröße und Masse auf (C.3.3.). Die bei $cGKI^{-/-}$ Tieren auftretenden massiven Störungen im Gastrointestinaltrakt konnten bei jungen „Rescue“ Mäusen jedoch nicht beobachtet werden (es wurden erst Tiere bis zu einem Alter von ca. 8 Wochen untersucht). An „Rescue“ Tieren konnte auch keine Mangelernährung festgestellt werden. Diese Befunde geben einen Hinweis, dass die Expression einer Isoform der $cGKI$ in glatten Muskelzellen genügt, das Ausbilden des massiven gastrointestinalen Phänotyps zu verhindern.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die auftretende verlangsamte Entwicklung nicht auf die beeinträchtigte Funktion des Magen-Darm-Traktes zurückzuführen ist, da „Rescue“ Mäuse auch ohne diesen Phänotyp ein eingeschränktes Wachstum zeigen. Die Mangelernährung von $cGKI^{-/-}$ Mäusen stellt wahrscheinlich einen zusätzlichen Defekt dar, der mit am Versterben dieser Tiere beteiligt ist.

Anhand erster Kraftmessungen konnte der Erfolg beider „Rescue“ Strategien bestätigt werden, indem die gestörte Relaxierung der glatten Muskulatur wiederherzustellen war (C.3.5.). An Jejunum- und Aortenpräparaten erstellte KWKs einer 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung nach Hormon-induzierter Kontraktion waren für junge „Rescue“ Tiere der SM-I α/β Linien (6-8 Wochen) sowie für WT Tiere nicht signifikant unterschiedlich. Ebenso waren die ermittelten EC_{50} Werte von 8-Br-cGMP der WT und „Rescue“ Tieren nicht signifikant unterschiedlich. $cGKI^{-/-}$ Mäuse zeigten dagegen eine deutlich eingeschränkte Relaxierung des glatten Muskels.

Die wiederhergestellte Relaxierung des glatten Muskels nach Hormon-induzierter Kontraktion in jungen „Rescue“ Tieren zeigte, dass die Expression einer Isoform der $cGKI$ in diesen Geweben und in jungen Tieren zur Relaxierung ausreicht.

Die an Aortenpräparaten ermittelten EC_{50} -Werte unterscheiden sich deutlich von denen an Jejunumpräparaten ermittelten. Zur halbmaximalen Relaxierung der Aorten ist eine um eine Zehnerpotenz erhöhte 8-Br-cGMP Konzentration im Vergleich zum Jejunum notwendig. Dies könnte eventuell in einer unterschiedlichen Gewebe-spezifischen Bedeutung der $cGKI$ -abhängigen Relaxierung begründet sein. Zusätzlich wurde bei den Aortenpräparaten die endotheliale NO-Synthese durch Zugabe von L-NAME unterdrückt, was ein Erhöhen des EC_{50} -Wertes erklären könnte. Die Aortenpräparate befanden sich bei der höchsten eingesetzten 8-Br-cGMP Konzentration von 10^{-3} M noch nicht im Bereich der gesättigten

Relaxierung. Weitere Messungen unter höherer 8-Br-cGMP Konzentration müssen zeigen, ob noch eine weitere Relaxierung der Aorten möglich ist.

Interessanterweise ergaben sich zwischen den beiden „Rescue“ Linien bezüglich der 8-Br-cGMP vermittelten Relaxierung keine Unterschiede, obwohl *in vitro* die α -Isoform um den Faktor 15 sensitiver gegenüber 8-Br-cGMP ist als die β -Isoform. Diese *in vivo/in vitro* Diskrepanz kann bislang nicht erklärt werden.

Für ältere Tiere können bislang noch keine Aussagen getroffen werden. Weitere Untersuchungen an älteren Tieren müssen zeigen, ob es eventuell zur Ausbildung eines Entwicklungs-abhängigen Phänotyps kommt. Ebenso müssen weitere Untersuchungen z.B. Kraftmessungen an Colonpräparaten oder Untersuchungen der Darmpassagezeit durchgeführt werden.

Die Frage, inwiefern die Deletion der cGKI in anderen Zellen eine entscheidende Rolle an der Ausbildung des gastrointestinalen Phänotyps der $cGKI^{-/-}$ spielt, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Beispielsweise könnte die Deletion in sog. NANC Neuronen (inhibitorische non-adrenerge und non-cholinerge) oder Cajalzellen, die für die peristaltische Bewegung des Darmes mitverantwortlich sind (Hirst und Edwards, 2004), bedeutsam sein (Wolfgruber, 2003 (a)). Da „Rescue“ Tiere aber in diesen Zellen kein cGKI Protein exprimieren sollten und junge Tiere dennoch keinen Phänotyp zeigen, konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden.

Die geringere Körpergröße und Masse insbesondere juveniler „Rescue“ Tiere deutet darauf hin, dass die cGKI auch in anderen Geweben eine wichtige Funktion bei der Entwicklung ausübt. Möglicherweise ist die cGKI in bestimmten Gehirnregionen oder Neuronen für ein normales Wachstum unabdingbar. Feil et al. konnten nachweisen, dass die cGKI in vielen Regionen des Zentralen Nervensystems (ZNS) verbreitet ist (Feil et al., 2005 (c)). Die cGKI wird u.a. auch in Regionen gebildet, welche Futteraufnahme und Regulation des Gewichts beeinflussen (Schwartz et al., 2000; Bellinger und Bernardis, 2002). Weitere Analysen zur Entwicklung der „Rescue“ Tiere (z.B. weitere Gewichtsbestimmungen und eine zusätzliche Betrachtung der Entwicklung über einen längeren Zeitraum sowie Untersuchungen zur Futteraufnahme der „Rescue“ Linien) könnten helfen, die Bedeutung der cGKI bei der Entwicklung zu verstehen.

$cGKI^{-/-}$ Tiere weisen eine gestörte Fortpflanzungsfähigkeit auf (Hedlund et al., 2000). Dagegen sind Männchen der SM- α / SM- β -„Rescue“ Linien zeugungsfähig. Die Expression einer Isoform der cGKI ausschließlich in glatten Muskelzellen genügt offenbar, die gestörte Relaxierung des Corpus Cavernosum wieder zu ermöglichen (C.3.4.).

Ausblick

Die neuen „Rescue“ Linien ermöglichen es sowohl die Funktion der cGKI im glatten Muskel als auch in anderen Geweben zu analysieren. Da in den beiden „Rescue“ Linien die cGKI Expression ausschließlich im glatten Muskel erfolgt, stellen diese Tiere bezüglich anderer Gewebe ein cGKI-Knockout-System dar. Somit können Auswirkungen der cGKI-Deletion in anderen Geweben studiert werden. Dazu mussten bislang konditionale Knockout Modelle mit Hilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystems generiert werden (Wolfsgruber et al., 2003 (b); Feil et al., 2003), bei denen jedoch eine vollständige Deletion des Zielgens nicht immer gewährleistet ist. Untersuchungen der neuen „Rescue“ Linien ermöglichen es dieses Problem zu umgehen.

Die Möglichkeit Langzeitexperimente an „Rescue“ Tieren durchführen zu können ist ein weiterer Vorteil dieser neuen *in vivo* Modelle. An cGKI^{-/-} Tieren war dies aufgrund der frühen Letalität nicht möglich. So könnten auch die „Rescue“ Linien z.B. in einem Atherosklerosemodell untersucht werden. Wolfsgruber et al. zeigten, dass die cGKI in vaskulären SMCs die Atherogenese beschleunigt und möglicherweise die pro-atherosklerotische Wirkung von NO vermittelt (Wolfsgruber et al., 2003 (b); Feil et al., 2005 (b)). Die „Rescue“ Linien könnten z.B. zeigen, ob nur eine Isoform der cGKI an diesem Prozess beteiligt ist.

Isoform-spezifische Signalwege

Die cGKI reguliert über verschiedene Wege den Tonus der glatten Muskulatur (A.4.2.). Für einige dieser Mechanismen konnte gezeigt werden, dass sie *in vitro* durch eine der beiden Isoformen der cGKI aktiviert werden. Mit Hilfe der „Rescue“ Linien können diese Mechanismen *in vivo* genauer untersucht werden und weitere Signalwege bezüglich einer Isoform-spezifischen Aktivierung analysiert werden.

Als Substrate der cGKI β wurden bereits IRAG und Phospholamban identifiziert (Schlossmann et al., 2000; Ammendola et al., 2001; Raeymaekers et al., 1988; Lalli et al., 1999; Koller et al., 2003).

Die Generierung von IRAG ^{Δ 12/ Δ 12}-Deletionsmutanten führte zu Mäusen mit gestörter cGMP-vermittelter Relaxierung der glatten Muskulatur und einer reduzierten Lebenserwartung (Geiselhöringer et al., 2004(b)). In diesen Mäusen ist der cGKI β /IRAG/IP₃-Signalweg gestört, der die [Ca²⁺]_i durch Hemmung der Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern des ER reguliert. Interessant ist der Vergleich dieser Mausmutante mit der SM-I α „Rescue“ Linie, die kein cGKI β -Protein exprimiert, wodurch in dieser Mauslinie der cGKI/IRAG-Signalweg ebenfalls gestört sein müsste. An jungen SM-I α „Rescues“ konnte aber bisher kein

gastrointestinaler Phänotyp festgestellt werden (s.o.). Zur Aufklärung dieser unterschiedlichen Phänotypen sind weitere Untersuchungen beider Linien notwendig. Die im Vergleich zum endogenen Niveau erhöhte cGKI α -Expression in der SM-I α „Rescue“ Linie kann als mögliche Erklärung ausgeschlossen werden, da auch in den IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ Mäusen eine erhöhte cGKI α -Synthese erfolgt. Eventuell besitzt IRAG noch unbekannte Funktionen und ist an cGKI-unabhängigen Mechanismen beteiligt, wodurch der Phänotyp der IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ Mutanten mitentstehen könnte.

Ein weiteres Zielprotein der cGKI, dessen Bedeutung anhand der „Rescue“ Mauslinien untersucht werden könnte, ist Phospholamban. Dies ist ein kleines, 5 kDa Protein, das in der Membran des ER lokalisiert ist. Nach Phosphorylierung von Phospholamban durch die cGKI wird dessen inhibitorische Wirkung auf die Ca $^{2+}$ -ATPase aufgehoben. Die Aufnahme von Ca $^{2+}$ in die intrazellulären Speicher des ER über die Ca $^{2+}$ -ATPase wird dadurch erhöht, wodurch die [Ca $^{2+}$] $_i$ sinkt (Tada, 2003; Saucerman and McCulloch, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die I β -Isoform der cGKI zusammen mit IRAG und Phospholamban einen Signalkomplex bildet (Koller, 2003), weshalb die Phosphorylierung von Phospholamban speziell durch die cGKI β diskutiert wird. Während im Mausmodell eine Deletion von Phospholamban keinen Einfluss auf die cGMP-abhängige Relaxierung Hormon-kontrahierter glatter Muskulatur hat (Lalli et al., 1999), könnte dieser Mechanismus, der bei ungestörter [Ca $^{2+}$] $_i$ Regulation eine untergeordnete Rolle einnimmt, nach Inaktivierung cGKI α -abhängiger Mechanismen jedoch an Bedeutung gewinnen. Dies können Versuche mit der SM-I β „Rescue“ Mauslinie zeigen.

Auch spezifische Signalwege der cGKI α -Isoform können anhand der „Rescue“ Linien genauer untersucht werden. Feil et al. zeigten, dass die I α -Isoform an der Regulation der [Ca $^{2+}$] $_i$ über noch unbekannte Mechanismen beteiligt ist. Sie zeigten, dass in primären vaskulären glatten Muskelzellen von cGKI $^{-/-}$ Mäusen keine Hemmung Noradrenalin-induzierter Ca $^{2+}$ -Transienten über den NO/cGMP-Signalweg erfolgte. Diese gestörte Ca $^{2+}$ -Regulation konnte durch Transfektion der I α -Isoform der cGKI wiederhergestellt werden, während die Transfektion der cGKI β -Isoform in diesem Modell keinen Einfluss auf die Ca $^{2+}$ -Regulation hatte (Feil et al., 2002). Der genaue Mechanismus kann durch Messung von Ca $^{2+}$ -Transienten in den „Rescue“ Linien weiter analysiert werden.

Die cGKI α bindet und phosphoryliert RGS-2 (RGS für „Regulator of G-protein signaling“), was zu einer 100-1000fach erhöhten GTPase Aktivität des G-Proteins führt (Tang et al., 2003) und eine Verringerung der Halbwertszeit des an das G-Protein gebundenen GTP bewirkt (Hepler, 1999). RGS2 $^{-/-}$ Mäuse leiden an Bluthochdruck, was die Bedeutung dieses

Proteins bei der Regulation des Tonus vaskulärer SMCs beweist (Tang et al., 2003). Um in diesem Zusammenhang die Bedeutung der cGKI α bei der Regulation des Gefäßtonus zu untersuchen, kann die SM-I α „Rescue“ Linie herangezogen werden. Um dies zu untersuchen haben Mendelsohn et al. eine transgene Mauslinie generiert, in welcher die cGKI α -RGS2 Interaktion durch Mutation eines Leucin-Zipper-Motivs (LZM) der cGKI α unterbunden werden soll (Mendelsohn, 2005). Die Analyse dieser LZM-Mutanten ist jedoch mit Nachteilen verbunden, da das cGKI α -Protein weiterhin ubiquitär exprimiert wird und lediglich eine zerstörte Interaktionsstelle besitzt, was zu unerwünschten Effekten führen kann. So zeigt diese Mauslinie eine permanent erhöhte, nicht durch cGMP regulierte Kinaseaktivität. Ebenso erfolgt in dieser Mauslinie weiterhin die Expression der cGKI β in allen Körperzellen, was eine Isoform-spezifische Aussage erschwert. Daher stellen die „Rescue“ Linien ein besseres *in vivo* Modellsystem zur Untersuchung dieser Fragestellung dar.

Der RhoA/Rho-Kinase Signalweg ist ein weiterer wichtiger Mechanismus, der mit Hilfe der „Rescue“ Linien *in vivo* analysiert werden kann. Die cGKI α phosphoryliert RhoA und bewirkt dadurch eine Relaxierung des glatten Muskels (Sauzeau et al., 2000; Pfitzer et al., 2001). Unphosphoryliert aktiviert das kleine GTP-bindende Protein RhoA die Rho-Kinase, welche daraufhin die regulatorische Untereinheit der Myosin-Leichten-Ketten-Phosphatase (MLCP) phosphoryliert, wodurch die Aktivität der MLCP reduziert wird. Dies führt zu einer erhöhten Phosphorylierung der Myosin-Leichten-Kette (MLC) (Somlyo und Somlyo, 2000; Webb, 2003) und Kontraktion des glatten Muskels. Die Phosphorylierung von RhoA wirkt dieser inhibitorischen Wirkung auf die MLCP entgegen. Als Folge wird die MLC durch MLCP dephosphoryliert und der glatte Muskel relaxiert.

Surks et al. zeigten, dass die cGKI α auch die regulatorische Untereinheit der MLCP phosphoryliert. (Surks et al., 1999). Dies unterbindet eine weitere Phosphorylierung der MLCP durch die MLCK (Wooldridge et al., 2004), wodurch die Phosphataseaktivität der MLCP erhalten bleibt. Auch dies könnte *in vivo* genauer untersucht werden.

Neben der *in vivo* Analyse bereits bekannter Isoform-spezifischer Signalwege, ermöglichen die in dieser Arbeit generierten „Rescue“ Linien weitere cGKI-regulierte Mechanismen hinsichtlich einer Isoform-spezifischen Aktivierung aufzuklären.

Die cGKI α phosphoryliert und inaktiviert TRP-Kanäle (TRP für „transient receptor protein“) (Kwan et al., 2004), die als sog. SOCs (SOC für „store-operated channels“) in der Zytoplasmamembran von Säugetierzellen fungieren. Tirupathi et al. konnten jedoch auch eine direkte Kopplung zwischen dem N-Terminus des IP $_3$ R und dem C-Terminus der TRP-Kanäle nachweisen (Tirupathi et al., 2003). Möglicherweise könnte auch IRAG nach Aktivierung durch die cGKI β und Kopplung an den IP $_3$ -Rezeptor Einfluss auf den Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum durch TRP-Kanäle nehmen. Untersuchungen

der „Rescue“ Linien können aufklären, ob spezifisch eine Isoform der cGKI die Aktivierung der TRP-Kanäle moduliert.

Neuere Studien zeigten, dass die cGKI eine Dephosphorylierung des Glattmuskelspezifischen MLCP-Inhibitor Proteins CPI-17 (CPI-17 für „PKC potentiated inhibitor protein-17 kDa“) bewirkt, wodurch seine inhibitorische Wirkung auf die MLCP rückgängig gemacht werden kann (Bonnevier und Arner, 2004). Anhand der „Rescue“ Linien kann die relative Bedeutung der beiden Isoformen der cGKI an diesem Mechanismus untersucht werden.

Die cGKI ist auch an der Aktivierung Kalzium-abhängiger Kaliumkanäle (BK_{Ca}) beteiligt (Zhou et al., 2001, Schubert und Nelson, 2001). Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Membran, wodurch L-Typ Kalziumkanäle geschlossen werden und weniger Ca^{2+} -Ionen in die Zelle gelangen können (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999; Sausbier et al., 2000; Schubert und Nelson, 2001). Bisher ist noch unbekannt, ob die Aktivierung der BK_{Ca} -Kanäle lediglich durch eine Isoform der cGKI oder durch beide Isoformen erfolgt. Auch hier können durch Analyse der „Rescue“ Linien neue Einblicke gewonnen werden.

E. Zusammenfassung

In glatten Muskelzellen spielt der cGMP/cGKI Signalweg nach Aktivierung durch NO oder natriuretische Peptide eine wichtige Rolle. So konnte bereits gezeigt werden, dass die cGKI an der Relaxierung glatter Muskeln oder auch der Entstehung von Atherosklerose beteiligt ist. Die molekularen Mechanismen der cGKI-Wirkung, insbesondere die spezifischen Funktionen ihrer beiden Isoformen, cGKI α und cGKI β , sind jedoch bislang weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung transgener Mauslinien, welche eine *in vivo* Analyse der Funktionen beider Isoformen der cGKI im glatten Muskel ermöglichen.

Zunächst wurden zwei Mauslinien erzeugt, bei denen jeweils eine Isoform der cGKI ausschließlich in glatten Muskelzellen unter der Kontrolle des Glattmuskel-spezifischen Promotors SM22 α überexprimiert wird (SM-I α und SM-I β Linie). Dies wurde durch Integration der für die cGKI α oder cGKI β kodierenden cDNS-Sequenz in den SM22 α -Genort durch homologe Rekombination in ES-Zellen ermöglicht. Nun können *in vivo* die Auswirkungen einer erhöhten cGKI-Expression im glatten Muskel untersucht werden.

Der Knockout der cGKI in allen Körperzellen (cGKI $^{-/-}$) führt zu Mäusen mit einem multiplen Phänotyp und deutlich reduzierter Lebenserwartung. Die genauen Ursachen des frühen Versterbens waren aufgrund des multiplen Phänotyps bislang ungeklärt. Durch Einkreuzen der SM-I α und SM-I β Mauslinien in einen cGKI-defizienten Hintergrund (cGKI $^{-/-}$) wurden Mäuse generiert, bei denen ausschließlich in glatten Muskelzellen die Expression jeweils einer Isoform der cGKI wiederhergestellt ist (SM-I α/β „Rescue“ Linien). Mit Hilfe dieser „Rescue“ Mäuse sollte geklärt werden, welche Defekte der cGKI $^{-/-}$ Mäuse (A.4.4.) auf einer zellautonomen Funktion der cGKI im glatten Muskel beruhen sowie die Bedeutung der beiden Isoformen der cGKI im glatten Muskel analysiert werden.

Nach Zucht der „Rescue“ Tiere bestätigten Westernblot Analysen die Expression der cGKI α oder cGKI β Isoform in Geweben mit hohem Anteil glatter Muskelzellen. Weitere Analysen der „Rescue“ Tiere ergaben, dass:

- beide „Rescue“ Linien eine im Vergleich zu cGKI $^{-/-}$ Tieren erhöhte Lebenserwartung zeigen und somit die Expression einer Isoform der cGKI in glatten Muskelzellen ausreicht, das Ausbilden des multiplen Phänotyps und der reduzierten Lebenserwartung zu verhindern.
- junge „Rescue“ Mäuse keinen gastrointestinalen Phänotyp ausbilden, welcher für cGKI $^{-/-}$ Mäuse charakteristisch ist (ältere Tiere müssen noch untersucht werden).

- die 8-Br-cGMP vermittelte Relaxierung vorkontrahierter Aorten- und Jejunumpräparate von „Rescue“ Mäusen der von WT Mäusen entspricht, während in cGKI^{-/-} Tieren diese Relaxierung gestört ist.
- männliche „Rescue“ Tiere normal zeugungsfähig sind, während cGKI^{-/-} Mäuse aufgrund von Erektionsstörungen kaum fortpflanzungsfähig sind.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Deletion der cGKI im glatten Muskel maßgeblich an der Ausbildung des massiven Phänotyps der cGKI^{-/-} Mäuse beteiligt ist und die Expression einer Isoform der cGKI selektiv im glatten Muskel ausreicht, das Ausbilden dieses Phänotyps, insbesondere die frühe Letalität, zu unterbinden oder zumindest stark abzuschwächen.

Anhand der in dieser Arbeit generierten Mauslinien stehen erstmals *in vivo* Modelle zur Verfügung, die eine gezielte Analyse der Funktionen beider Isoformen der cGKI im glatten Muskel ermöglichen.

F. Anhang

F.1. Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz in 5'-3'Richtung	Gen/Bindungsstelle ^a
QY83	ATTCGCAGCGCATCGCCTTC	neo v
RF53	CCTGGCTGTGATTTCACTCCA	cGKI Intron 10 v
RF57	CTAGAATGCCTCCCCCTTTC	SM22 vor Exon 1 v
RF60	ACATAGCCCATACACCTATGGG	SM22 Intron 2 r
R67	CTCAGAGTGGAAGGCCTGCTT	SM22 Intron 1 v
RF85	TCGCCCATAGCCTGTCAT	SM22 Exon 5 r
RF90	CACACCATTCTTCAGCCACA	SM22 Exon 2 r
RF103	GACACCGAAGCTACTCTCCTT	SM22 Exon1 v
RF118	AAATTATAACTTGTCAAATTCTTG	cGKI Intron 11r
RF125	GTCAAGTGACCACTATG	cGKI Intron 10 r
RF146	TCCCCGCGGAGCATGCGCGAGCTGGAGGAAG	cGKI Exon 1 v
RF147	TCCCCGCGGAGCATGCGCACCTGCGGG	cGKI Exon 1v
RF148	AGGCCGCGGAGATCTTTGGACTGTGGAC	cGKI Exon1/Exon2 r
SW1	CTGACAGCCGCTTCTCCAGCT	cGKI α Exon 1 r
SW8	AACTCCAGCTCCAGCTCG	cGKI β Exon 1 r
SW12	CCTCCTTGAGCATGAGAATCTTG	cGKI α Exon1 r
VQ184	TAGACACTGTCGAGGTTCAA	cGKI Exon2 r

^a v, vorwärts; r, rückwärts

F.2. Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Puffer
<i>AscI</i>	GG/CGCGCC	NEB 3
<i>BamHI</i>	5'-G/GATCC-3'	NEB <i>BamHI</i>
<i>BglII</i>	5'-A/GATCT-3'	NEB 3
<i>EcoRI</i>	5'-G/AATTC-3'	NEB 3
<i>EcoRV</i>	5'-GAT/ATC-3'	NEB 2
<i>NotI</i>	5'-GC/GGCCGC-3'	NEB 3
<i>NheI</i>	5'-G/CTAGC-3'	NEB 2
<i>Sall</i>	5'-GTCGAC-3'	NEB U
<i>SphI</i>	5'-GCATG/C-3'	NEB 2
<i>XhoI</i>	5'-C/TCGAG-3'	NEB 2

Schnittstellen sind durch / gekennzeichnet. Die optimale Inkubationstemperatur liegt für alle angegebene bei Enzyme 37°C.

F.3. Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Protein	Herkunft	Quelle	Verdünnung
cGKI α	Kaninchen	Schlossmann	1:200
cGKI α	Kaninchen	Schlossmann	1:1000
cGKI α	Ziege	Santa Cruz	1:500
cGKI β	Kaninchen	Schlossmann	1:1000
cGKI β	Ziege	Santa Cruz	1:500

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Quelle	Verdünnung
Anti-rabbit, IgG-HRP-linked	Cellsignaling	1:2000
Anti-goat, IgG-HRP-linked	Santa Cruz	1:2000

G. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ANP	„atrial natriuretic peptide“	eNOS	endotheliale NO Synthase
Abb	Abbildung	ER	Endoplasmatisches Retikulum
ATP	Adenosintriphosphat	ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
AS	Aminosäure	EtOH	Ethanol
bp	Basenpaar	EC₅₀	Konzentration des halbmax. Effekts
BK_{Ca}	Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle	F	Farad
BNP	„brain natriuretic peptide“	FCS	Fötales Kälberserum
BSA	Rinderserumalbumin	G	Gravitationskonstante oder Gramm
Ca²⁺	Kalziumionen	G418	Geneticin ^R
[Ca²⁺]_i	Zytosolische Kalziumkonzentration	Ganc	Ganciclovir
Ca_v1.2	Porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals	GTP	Guanosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat	H	Stunde
CCh	Carbachol	HRP	Meerretich Peroxidase
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I	i.d.R.	in der Regel
cGKIα	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I α	iNOS	induzierbare NO Synthase
cGKIβ	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I β	IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
cGKIγ	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I γ	IP₃R1	Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor Typ 1
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substratprotein
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat	Kb	Kilobase
CNG	„cyclic nucleotide gated channel“	kDa	Kilodalton
CNP	„C-type natriuretic peptide“	KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
cpm	„counts per minute“	L	Liter
CTR	Kontrolle	LB	Luria-Bertani
Cre	Cre Rekombinase	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
DAG	Diazylglycerol	L-NAME	N _ω -Nitro-L-Arginin-methylester
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	LZM	Leucin-Zipper Motiv
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	M	Mol
DEPC	Diethylcarbonat	m	Milli (10 ⁻³)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	MAPK	„mitogen activated protein kinase“
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat	β-Me	2-Mercaptoethanol
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Serum	min	Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	MLC	„myosin light chain“
DTT	1,4-Dithiothreitol	MLCK	„myosin light chain kinase“
DNS	Desoxyribonukleinsäure	MMLV	„moloney murine leukaemia virus“
ECL	„Enhanced chemilumineszenz“	MP	Magermilchpulver
E.coli	<i>Escherichia coli</i>	mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
EDTA	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	MYPT1	„myosin targeting subunit“
EF	Embryonale Fibroblasten	MYPT1K	MYPT1-Kinase

n	Nano (10^{-9})
NANC	„non-adrenerge and non-cholinerge“
neo	Neomycin
nt	Nukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
OD	Optische Dichte
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	phosphatgepufferte Saline
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
Phe	Phenylephrin
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase C β
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGS	“regulator of G-protein signaling”
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung
sGC	lösliche Guanylylzyklase
SMC	“smooth muscle cell”, glatte Muskelzelle
SMPP-	“smooth muscle myosin phosphatase”
SOC	“store operated channel”
SSC	Natriumcitrat
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris gepufferte Salzlösung
tk	Thymidinkinase
TRP	“transient receptor protein”
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
v	Volumen
w	Gewicht
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

H. Literaturverzeichnis

H.1. Zitierte Veröffentlichungen

- Aalkjaer, C. und Mulvany, M.J. (1983) Human and rat resistance vessels: a comparison of their morphological and pharmacological characteristics. *Gen Pharmacol*, **14**, 85-87.
- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. und Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 32950-32956.
- Ammendola, A., Geiselhoring, A., Hofmann, F. und Schlossmann, J. (2001) Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem*, **276**, 24153-24159.
- Atkinson, R.A., Saudek, V., Huggins, J.P. und Pelton, J.T. (1991) ¹H NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: a leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry*, **30**, 9387-9395.
- Bachmann, B.J. (1990) Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 8. *Microbiol Rev*, **54**, 130-197.
- Bellinger, L.L. und Bernardis, L.L. (2002) The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*, **76**, 431-442.
- Berridge, M.J., Lipp, P. und Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.
- Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. und Zong, X. (1998) Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **358**, 140-144.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bonnevier, J. und Arner, A. (2004) Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2⁺) sensitization in smooth muscle. *J Biol Chem*, **279**, 28998-29003.
- Capecchi, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-1292.

- Chao, D.S., Silvagno, F., Xia, H., Cornwell, T.L., Lincoln, T.M. und Bredt, D.S. (1997) Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience*, **76**, 665-672.
- Draijer, R., Vaandrager, A.B., Nolte, C., de Jonge, H.R., Walter, U. und van Hinsbergh, V.W. (1995) Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res*, **77**, 897-905.
- el-Husseini, A.E., Bladen, C. und Vincent, S.R. (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem*, **64**, 2814-2817.
- Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C.R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S. und Hofmann, F. (2002) Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res*, **90**, 1080-1086.
- Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U. und Hofmann, F. (2003) Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, **93**, 907-916.
- Feil, R., Feil, S. und Hofmann, F. (2005) (a) A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases. *Trends Mol Med*, **11**, 71-75.
- Feil, R., Hofmann, F. und Kleppisch, T. (2005) (b) Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci*, **16**, 23-41.
- Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. und Feil, R. (2005) (c) Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience*, **135**, 863-868.
- Friebe, A. und Koesling, D. (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res*, **93**, 96-105.
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B. und Keef, K.D. (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, **274**, 10927-10935.
- Furchgott, R.F. und Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376.

- Gambaryan, S., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurtz, A. und 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**, 662-670.
- Garbers, D.L. und Lowe, D.G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem*, **269**, 30741-30744.
- Geiselhoring, A., Gaisa, M., Hofmann, F. und Schlossmann, J. (2004) (a) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*, **575**, 19-22.
- Geiselhoring, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Worner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. und Schlossmann, J. (2004) (b) IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *Embo J*, **23**, 4222-4231.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hedlund, P., Aszodi, A., Pfeifer, A., Alm, P., Hofmann, F., Ahmad, M., Fassler, R. und Andersson, K.E. (2000) Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2349-2354.
- Hepler, J.R. (1999) Emerging roles for RGS proteins in cell signaling. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 376-382.
- Hirst, G.D. und Edwards, F.R. (2004) Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci*, **96**, 1-10.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. und Ruth, P. (1992) Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, **1135**, 51-60.
- Hofmann, F., Lacinova, L. und Klugbauer, N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **139**, 33-87.
- Hofmann, F., Ammendola, A. und Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113**, 1671-1676.
- Hofmann, F., Biel, M., Feil, R. und Kleppisch, T. (2004) Mouse models of NO/natriuretic peptide/cGMPkinase signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **159** (Offermanns, S. & Hein, L.) 95-30, Springer Verlag.
- Hofmann, F. (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **280**, 1-4.

- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E. (1994) Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. und Walter, U. (1994) Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*, **225**, 21-27.
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M. und Wood, K.S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, **61**, 866-879.
- Jacklet, J.W. (1997) Nitric oxide signaling in invertebrates. *Invert Neurosci*, **3**, 1-14.
- Jaenisch, R. (1988) Transgenic animals. *Science*, **240**, 1468-1474.
- Joyce, N.C., DeCamilli, P., Lohmann, S.M. und Walter, U. (1986) cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, **11**, 191-198.
- Kasperska-Zajac, A. und Brus, R. (2000) [The role of nitric oxide (NO) in central nervous system (CNS)]. *Neurol Neurochir Pol*, **34**, 743-754.
- Keilbach, A., Ruth, P. und Hofmann, F. (1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208**, 467-473.
- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R. und Hofmann, F. (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci*, **19**, 48-55.
- Koller, A., Schlossmann, J., Ashman, K., Uttenweiler-Joseph, S., Ruth, P. und Hofmann, F. (2003) Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 155-160.
- Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F. und Feil, R. (2000) Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis*, **28**, 15-22.
- Kuhbandner, S. (2001) Induzierbare Cre-vermittelte Rekombination im glatten Muskel der Maus. Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.
- Kuhn, M. (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*, **93**, 700-709.

- Kumar, R., Joyner, R.W., Komalavilas, P. und Lincoln, T.M. (1999) Analysis of expression of cGMP-dependent protein kinase in rabbit heart cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **291**, 967-975.
- Kwan, H.Y., Huang, Y. und Yao, X. (2004) Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2625-2630.
- Lalli, M.J., Shimizu, S., Sutliff, R.L., Kranias, E.G. und Paul, R.J. (1999) [Ca²⁺]_i homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol*, **277**, H963-970.
- Li, L., Miano, J.M., Cserjesi, P. und Olson, E.N. (1996) SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res*, **78**, 188-195.
- Lloyd-Jones, D.M. und Bloch, K.D. (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*, **47**, 365-375.
- Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. und De Jonge, H.R. (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*, **22**, 307-312.
- Lohmann, S.M., Walter, U., Miller, P.E., Greengard, P. und De Camilli, P. (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 653-657.
- Loscalzo, J. und Welch, G. (1995) Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, **38**, 87-104.
- Markert, T., Vaandrager, A.B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H.R., Jarchau, T. und 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**, 822-830.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. und Hofmann, F. (1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*, **189**, 1255-1264.
- Mendelsohn, M.E. (2005) Creation and characterization of mice with selective mutation of the cyclic gMP-dependent protein kinase I interaction domain. Vortrag. *BMC Pharmacology*, **5**:S23.

- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F. und Klugbauer, N. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J*, **22**, 6027-6034.
- Munzel, T., Feil, R., Mulsch, A., Lohmann, S.M., Hofmann, F. und Walter, U. (2003) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, **108**, 2172-2183.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. und Roder, J.C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8424-8428.
- Neill, J.D., Duck, L.W., Sellers, J.C., Musgrove, L.C., Scheschonka, A., Druey, K.M. und Kehrl, J.H. (1997) Potential role for a regulator of G protein signaling (RGS3) in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulated desensitization. *Endocrinology*, **138**, 843-846.
- Owens, G.K., Kumar, M.S. und Wamhoff, B.R. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, **84**, 767-801.
- Panettieri, R.A., Jr. (2002) Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. *J Allergy Clin Immunol*, **110**, S269-274.
- Persson, K., Pandita, R.K., Aszodi, A., Ahmad, M., Pfeifer, A., Fassler, R. und Andersson, K.E. (2000) Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **279**, R1112-1120.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. und Fassler, R. (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, **274**, 2082-2086.
- 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. und Hofmann, F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J*, **17**, 3045-3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. und Hofmann, F. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 105-149.

- Pfitzer, G. (2001) Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*, **91**, 497-503.
- Pryzwansky, K.B., Kidao, S., Wyatt, T.A., Reed, W. und Lincoln, T.M. (1995) Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol*, **57**, 670-678.
- Qian, Y., Chao, D.S., Santillano, D.R., Cornwell, T.L., Nairn, A.C., Greengard, P., Lincoln, T.M. und Bredt, D.S. (1996) cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci*, **16**, 3130-3138.
- Raeymaekers, L., Hofmann, F. und Casteels, R. (1988) Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J*, **252**, 269-273.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U.A., Muller, W., Roes, J. und Schwenk, F. (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, **98**, 600-603.
- Rapoport, R.M., Draznin, M.B. und Murad, F. (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, **306**, 174-176.
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **340**, 115-126.
- Ruth, P. (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther*, **82**, 355-372.
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C. und Hofmann, F. (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem*, **202**, 1339-1344.
- Ruth, P., Pfeifer, A., Kamm, S., Klatt, P., Dostmann, W.R. und Hofmann, F. (1997) Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase Ialpha. *J Biol Chem*, **272**, 10522-10528.
- Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. und Hofmann, F. (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2623-2627.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

- Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. und Takuwa, Y. (2003) Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res*, **93**, 548-556.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandberg, M., Natarajan, V., Ronander, I., Kalderon, D., Walter, U., Lohmann, S.M. und Jahnsen, T. (1989) Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat. *FEBS Lett*, **255**, 321-329.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Saucerman, J.J. und McCulloch, A.D. (2004) Mechanistic systems models of cell signaling networks: a case study of myocyte adrenergic regulation. *Prog Biophys Mol Biol*, **85**, 261-278.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. und Hofmann, F. (2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, **87**, 825-830.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. und Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **275**, 21722-21729.
- Schauf, C., Moffett, D. und Moffett S. (1993) Human physiology, foundations and frontiers. Times Mirror/Mosby College Publishing.
- Schenkel, J. (1995) Transgene Tiere. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. und Ruth, P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signaling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, **404**, 197-201.
- Schubert, R. und Nelson, M.T. (2001) Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 505-512.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J. und Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**, 661-671.

- Shearman, A.M., Cupples, L.A., Demissie, S., Peter, I., Schmid, C.H., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Housman, D.E. und Levy, D. (2003) Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *Jama*, **290**, 2263-2270.
- Solway, J., Seltzer, J., Samaha, F.F., Kim, S., Alger, L.E., Niu, Q., Morrissey, E.E., Ip, H.S. und Parmacek, M.S. (1995) Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem*, **270**, 13460-13469.
- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, **522 Pt 2**, 177-185.
- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, **83**, 1325-1358.
- Sonnenburg, W.K. und Beavo, J.A. (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, **26**, 87-114.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Strachan, T. und Read, A.P. (1996) Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. und Mendelsohn, M.E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science*, **286**, 1583-1587.
- Tada, M. (2003) Calcium cycling proteins of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ J*, **67**, 729-737.
- 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. und Mendelsohn, M.E. (2003) Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, **9**, 1506-1512.
- Tiruppathi, C., Minshall, R.D., Paria, B.C., Vogel, S.M. und Malik, A.B. (2002) Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, **39**, 173-185.
- Torres, R.M. und Kühn, R. (1997) Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo.

- Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Tilly, B.C., Houtsmuller, A.B., Ehlert, E.M., Bot, A.G., Edixhoven, M., Boomaars, W.E., Lohmann, S.M. und de Jonge, H.R. (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1466-1471.
- 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. und 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**, 4195-4200.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. und Kurtz, A. (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest*, **102**, 1576-1582.
- Waldmann, R., Bauer, S., Gobel, C., Hofmann, F., Jakobs, K.H. und Walter, U. (1986) Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur J Biochem*, **158**, 203-210.
- Wassarmann, P.M. und DePamphilis, M.L. (1993) Methods in enzymology. Guide to techniques in mouse development. Volume 225. Academic Press. San Diego.
- Webb, R.C. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, **27**, 201-206.
- Wegener, J.W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. und Feil, R. (2002) cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res*, **90**, 18-20.
- Wegener, J.W., Schulla, V., Lee, T.S., Koller, A., Feil, S., Feil, R., Kleppisch, T., Klugbauer, N., Moosmang, S., Welling, A. und Hofmann, F. (2004) An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *Faseb J*, **18**, 1159-1161.
- Werner, C.G., Godfrey, V., Arnold, R.R., Featherstone, G.L., Bender, D., Schlossmann, J., Schiemann, M., Hofmann, F. und Pryzwansky, K.B. (2005) Neutrophil dysfunction in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase I-deficient mice. *J Immunol*, **175**, 1919-1929.
- Wernet, W., Flockerzi, V. und Hofmann, F. (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, **251**, 191-196.
- Wessel, D. und Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-143.

- Wolfsgruber, W. (2003) (a) Analyse Gewebe-spezifischer Deletionen der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I in Mäusen. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilian Universität München.
- Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Kuppinger, O., Hofmann, F. und Feil, R. (2003) (b) A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13519-13524.
- Wooldridge, A.A., MacDonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hartshorne, D.J. und Haystead, T.A. (2004) Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, **279**, 34496-34504.
- Xia, C., Bao, Z., Yue, C., Sanborn, B.M. und Liu, M. (2001) Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **276**, 19770-19777.
- Yan, Y., Chi, P.P. und Bourne, H.R. (1997) RGS4 inhibits Gq-mediated activation of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide synthesis. *J Biol Chem*, **272**, 11924-11927.
- Zhou, X.B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G.X., Ruth, P. und Korth, M. (2001) A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem*, **276**, 43239-43245.

H.2. Eigene Veröffentlichungen

- Lukowski, R., Weber, S., Weinmeister, P., Feil, S. und Feil, R. (2005) Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalweges. *Biospektrum*, **11**, 287-290.
- Weber, S., Feil, S., Brummer, S., Knorn, A., Hofmann, F. und Feil, R. (2005) Knockin mice expressing cGMP-dependent protein kinase I-alpha or I-beta selectively in smooth muscle. Abstract Gordon Research Conference "Vascular Biology", Ventura, 6-11, Poster Präsentation.
- Feil, R., Weinmeister, P., Lukowski, R., Weber, S., Feil, S. und Hofmann, F. (2005) NO/cGMP signaling in smooth muscle cells and atherosclerosis. Abstract Gordon Research Conference „Vascular Biology“, Ventura, 6-11, Vortrag.
- Weber, S., Feil, S., Brummer, S., Knorn, A., Hofmann, F. und Feil, R. (2005) Transgenic mice expressing isoforms of the cGMP-dependent protein kinase type I selectively in smooth muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch of Pharmacol*, **371**, 216.

-
- Feil, R., Weinmeister, P., Lukowski, R., Weber, S., Brummer, S., Feil, S. und Hofmann, F. (2005) Role of cGMP/cGKI signaling in vascular smooth muscle growth. *Naunyn-Schmiedebergs Arch of Pharmacol*, **371**, 207.
- Weber, S., Feil, S., Brummer, S., Knorn, A., Hofmann, F. und Feil, R. (2005) Knock-in mice expressing cGKI-alpha or cGKI-beta selectively in smooth muscle. *BMC Pharmacology*, **5**, P59.
- Feil, R., Weinmeister, P., Lukowski, R., Weber, S., Brummer, S., Feil, S. und Hofmann, F. (2005) Genetic dissection of signaling via cGMP-dependent protein kinases. *BMC Pharmacology*, **5**, S37.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. F. Hofmann für die Aufnahme an seinem Institut, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher für die Betreuung dieser Arbeit und die Berichterstattung vor der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. R. Feil für die Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung und sein enormes Engagement.

Frau Dr. S. Feil u.a. für das Einarbeiten in das „1x1 der Mauszucht“.

Herrn PD J. Wegener für das Erlernen der Kraftmessungen.

Frau S. Brummer für die Genotypisierung unzähliger Mäuse, die Durchführung vieler Westernblot-Analysen und die vielen Dinge, durch die das Labor funktioniert hat.

Frau A. Knorn und D. Wegend für die Genotypisierung vieler Mäuse.

Frau G. Günther-Blab für die Betreuung der Tiere im Mausstall.

Allen Kollegen (vom Keller bis zum dritten Stock) für die gute Stimmung am Biederstein.

Besonders meinen Jungs: Robert und Pascal, ohne die es bedeutend weniger zu lachen gegeben hätte! Danke u.a. für die fachlichen Diskussionen und den Computer-Intensiv-Kurs, insbesondere die CorelDraw-Beratungstunden. Auch Katja, Meli und Kleppi. Schön, wenn aus Kollegen Freunde werden.

Veronika, die es schon über einem halben Jahr in einer WG mit mir „aushält“.

All meinen Freunden, die mir trotz verschobener Urlaube und dem ständigen Kommentar am Wochenende - „Ich kann nicht, ich muss zu den ES-Zellen“- nicht die Freundschaft gekündigt haben. Besonders danke ich Ilka, Petra, Derk, Stefan, Martin, Christian und Irmi sowie Peter für ihre Unterstützung und echte Freundschaft.

Meiner Familie für Ihre Geduld, den Rückhalt und die tröstenden Worte, wenn es mal nicht so toll lief.

Allen, die einen korrigierenden Blick in diese Arbeit geworfen haben.