
Die Rolle von Atrialen und B-Typ Natriuretischen Peptiden bei der
Regulation der Insulinsekretion und Vitalität pankreatischer β -Zellen



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON
SABINE CHRISTINE TAUSCHER
GEBOREN IN ROSENHEIM

HEUSENSTAMM, 2020

Eingereicht bei der Fakultät für Biologie am: 04.03.2020

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Flavio Roces

Erstgutachterin: Prof. Dr. Michaela Kuhn

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: 09.07.2020

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2014 bis Dezember 2017 am Physiologischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation:

„Die Rolle von Atrialen und B-Typ Natriuretischen Peptiden bei der Regulation der Insulinsekretion und Vitalität pankreatischer β -Zellen“

eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten, bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Heusenstamm, Februar 2020



Sabine Tauscher

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY.....	3
1 EINLEITUNG	4
1.1 Atriales und B-Typ Natriuretisches Peptid als endokrine Blutdruckregulatoren	4
1.2 Gemeinsamer GC-A-Rezeptor und cGMP-modulierte dritte Signalträger	7
1.3 Bedeutung des NP/GC-A-Systems für Metabolismus und Energieverbrauch.....	10
1.4 Systemischer Mangel an Natriuretischen Peptiden bei Übergewicht, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2	11
1.5 Bisher bekannte Effekte von Natriuretischen Peptiden auf pankreatische β -Zellen	14
1.6 Fragestellung	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Generierung und Haltung eines neuen genetischen Mausmodells mit β -zellspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors.....	17
2.1.1 Maus-Zucht.....	17
2.1.2 Versuchstierhaltung	17
2.1.3 Verwendete Diäten	18
2.1.4 Euthanasie und Organentnahme	18
2.2 Charakterisierung physiologischer und metabolischer Parameter der Versuchstiere	18
2.2.1 Blutdruckmessungen.....	18
2.2.2 Bestimmung des Körpergewichtes und der Futteraufnahme.....	19
2.2.3 Orale Glukosetoleranz-Test	19
2.2.4 Insulintoleranz-Test.....	20
2.2.5 Glukose-stimulierte Insulinsekretion	20
2.2.6 Untersuchung von Plasmaparametern	20
2.2.6.1 Blutentnahme zur Plasmagewinnung.....	20
2.2.6.2 Bestimmungen der Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid und BNP mittels spezifischer ELISAs.....	21

2.3 Studien mit exogen zugeführten, synthetischen Natriuretischen Peptiden	21
2.3.1 Akute, intraperitoneale Injektion von ANP	21
2.3.2 Chronische Infusion von BNP mittels subkutan implantierten osmotischen Mini-Pumpen..	22
2.4 Studien an isolierten und kultivierten Langerhans-Inseln.....	22
2.4.1 Präparation von Langerhans-Inseln.....	22
2.4.2 Kultivierung von Langerhans-Inseln	23
2.4.3 Bestimmungen des intrazellulären cGMP-Gehalts in frisch isolierten oder inkubierten Langerhans-Inseln	23
2.4.4 Inkubation der kultivierten Langerhans-Inseln für Genexpressionsanalysen.....	24
2.5 Molekularbiologische Methoden	25
2.5.1 Genotypisierung der Versuchstiere anhand von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien und Gewebe	25
2.5.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Gewebe	25
2.5.1.2 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration am SimpliNano.....	25
2.5.1.3 PCR und DNA-Gelelektrophorese	26
2.5.2 Untersuchung der Genexpression durch quantitative real-time PCR	30
2.5.2.1 Isolation von RNA aus Langerhans-Inseln oder Gewebe mit Trizol®	30
2.5.2.2 cDNA-Synthese aus RNA für qRT-PCR	30
2.5.2.3 Quantitative real-time RT-PCR	32
2.5.3 Genexpressionsanalyse mit dem RT ² Profiler® PCR Array Mouse Diabetes	38
2.5.3.1 Isolation von RNA aus Langerhans-Inseln mit dem RNeasy® Micro Kit	38
2.5.3.2 cDNA-Synthese aus RNA für RT ² Profiler® PCR Array.....	38
2.5.3.3 RT ² Profiler® PCR Array.....	40
2.6 Western Blot.....	41
2.6.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe	41
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	42
2.6.3 Western Blot-Analyse.....	42
2.6.3.1 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.6.3.2 Semi-Dry-Transfer auf Nitrocellulose-Membran.....	43
2.6.3.3 Immunchemischer Nachweis mit peroxidasevermittelter Chemilumineszenz.....	43

2.7 Histologie und Immunhistochemie	44
2.7.1 Gewebeaufbereitung.....	44
2.7.2 Immunhistochemie	45
2.7.4 Mikroskopische und morphometrische Auswertung von Färbungen.....	46
2.8 Datenanalyse und Statistik.....	47
3 ERGEBNISSE	48
3.1 Effiziente Deletion des GC-A-Rezeptors in pankreatischen β -Zellen	48
3.1.1 Etablierung der GC-A ^{flox/flox} ;RIPCre ^{tg} -Mauslinie.....	48
3.1.2 Verminderte Expression des GC-A-Rezeptors in Inseln von β GC-A KO-Mäusen.....	50
3.1.3 Der stimulierende Effekt von ANP auf den zellulären cGMP-Gehalt isolierter Inseln ist an β GC-A KO-Mäusen abgeschwächt.....	51
3.1.4 Die akuten Effekte von ANP auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung sind an isolierten Langerhans-Inseln von β GC-A KO-Tieren aufgehoben.....	52
3.2 Ablation des NP/GC-A-Signalweges in murinen β -Zellen hat keinen Einfluss auf physiologische und metabolische Parameter unter basalen Bedingungen in vivo	53
3.2.1 Normaler arterieller Blutdruck und unverändertes Körpergewicht bei β GC-A KO-Tieren ...	53
3.2.2 Die basale Insulin/Glukose-Homöostase ist in β GC-A KO-Tieren nicht beeinträchtigt.....	54
3.3 Entgegengesetzte metabolische Effekte von akuter versus chronischer Applikation von synthetischen Natriuretischen Peptiden in vivo	56
3.3.1 Die akute Injektion einer hohen ANP-Dosis vermindert die Glukose-stimulierte Insulinsekretion sowie die Glukosetoleranz in männlichen Mäusen beider Genotype.....	56
3.3.2 Die chronische Infusion einer niedrigen BNP-Dosis verbessert die Glukose-stimulierte Insulinsekretion sowie die Glukosetoleranz in Kontroll-, nicht aber in β GC-A KO-Tieren	57
3.3.2.1 Die stimulierenden Effekte von chronisch-infundiertem, synthetischem BNP werden durch die Aktivierung des GC-A-Rezeptors der β -Zellen vermittelt.....	57
3.3.2.2 Die chronische Infusion von BNP erhöht die Translokation von GLUT-4 im Skelettmuskel von Kontroll-Tieren.....	59
3.4 Natriuretische Peptide modulieren über den GC-A-Rezeptor die β -Zell-Funktion und Vitalität unter pathologischen Bedingungen einer Hochfettdiät	60
3.4.1 Genotypunabhängige, Hochfettdiät-induzierte Zunahme des Körpergewichts und arteriellen Blutdrucks bei gleichbleibender Futteraufnahme.....	61

3.4.2 Erhöhte BNP mRNA-Expression in linken Herzventrikeln und erniedrigte BNP- Plasmaspiegel nach Hochfettdiät.....	63
3.4.3 β GC-A KO-Mäuse zeigen stärkere Glukoseintoleranz nach 8-wöchiger Hochfettdiät	64
3.4.4 Die Insulinsensitivität ist in Kontroll- und β GC-A KO-Tieren unter Hochfettdiät unverändert	66
3.4.5 Erhöhte C-Peptid-Spiegel und unveränderte Glukose-stimulierte Insulinsekretion in beiden Genotypen unter Hochfettdiät.....	67
3.4.6 Die Translokation von GLUT-4 im Skelettmuskel von β GC-A KO-Tieren unter Hochfettdiät ist vermindert.....	67
3.4.7 Stimulierende Effekte des NP/GC-A-Systems auf die Proliferation pankreatischer β -Zellen	69
3.4.7.1 ANP induziert über den GC-A-Rezeptor die Cyclin D2 mRNA-Expression in kultivierten Inseln von Kontroll-Tieren	69
3.4.7.2 ANP verbessert die adaptive Proliferation der β -Zellen in Kontroll-Mäusen unter Hochfettdiät	70
3.4.7.3 Die Cyclin D2 mRNA-Expression ist in isolierten Inseln von β GC-A KO-Tieren nach Hochfettdiät vermindert	71
3.4.8 Effekte von NP/GC-A auf die Expression Diabetes-bezogener Gene nach 8-wöchiger Hochfettdiät	71
3.4.8.1 Untersuchung der Genexpression mittels Diabetes RT ² Profiler PCR Array in isolierten Langerhans-Inseln.....	71
3.4.8.2 Validierung der Genexpression von Gsk3b, Pdx1 und Ucp2	75
3.5 Geschlechtsabhängiger Unterschied im Einfluss der GC-A-Deletion auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion	76
3.5.1 Verbesserte Glukosetoleranz und Glukose-stimulierte Insulinsekretion in weiblichen β GC-A KO-Tieren.....	76
3.5.2 Geringere β -Zellfläche und weniger β -Zellen in den Inseln von weiblichen β GC-A KO-Tieren	78
3.5.3 Östrogene stimulieren den intrazellulären cGMP-Gehalt in kultivierten Inseln von wildtypischen Mäusen.....	78
3.5.4 ANP und E2 induzieren die Ucp2 mRNA-Expression in kultivierten Inseln von Kontroll-Tieren	79
3.5.5 Verminderte Ucp2 mRNA-Expression in Inseln von weiblichen β GC-A KO-Tieren	81

4 DISKUSSION	82
4.1 Beeinflusst der endogene NP/GC-A-Signalweg in pankreatischen β -Zellen die Glukose-induzierte Insulin-Freisetzung unter physiologischen Bedingungen?	82
4.2 Verbessert ein Anstieg der NP-Plasmaspiegel die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von pankreatischen β -Zellen?	84
4.3 Welche Bedeutung hat das endogene NP/GC-A-System für die Funktion und Vitalität pankreatischer β -Zellen unter pathologischen Bedingungen eines experimentell induzierten Diabetes Mellitus Typ 2?	85
4.3.1 Einfluss der HFD auf physiologische Parameter, NP-Plasmaspiegel und -Genexpression	86
4.3.2 Rolle des endogenen NP/GC-A-Systems für die Glukose/Insulin-Homöostase bei Übergewicht-induzierter Insulinresistenz	86
4.3.3 Effekte des NP/GC-A-Signalweges auf die adaptive β -Zellproliferation unter HFD	88
4.3.4 Auswirkung des NP/GC-A-Systems auf die Expression Diabetes-bezogener Gene in pankreatischen Inseln	89
4.4 Welche Mechanismen sind beteiligt an den geschlechtsabhängigen Unterschieden im Einfluss der β -zellspezifischen GC-A-Deletion auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion?	90
4.4.1 Gegensätzliche Effekte der β -zellspezifischen GC-A-Deletion auf die Insulin/Glukose-Homöostase bei männlichen und weiblichen Tieren	91
4.4.2 Einfluss von Östrogenen auf das endogene NP/GC-A-System von pankreatischen β -Zellen	91
4.4.3 Interaktion von Östrogenen und dem NP/GC-A/cGMP-System bei der Stimulation der Ucp2-Expression	92
4.5 Klinische Relevanz	94
5 LITERATURVERZEICHNIS	97
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	115
7 ANHANG	118
7.1 Puffer und Lösungen	118
7.2 Substanzen	120
7.3 Standardtierfutter und Experimentaldiäten	121
8 PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE	122
9 DANKSAGUNG	123

ZUSAMMENFASSUNG

Die kardialen Hormone Atriales (ANP) und B-Typ (BNP) Natriuretisches Peptid üben bekannte renale und kardiovaskuläre Effekte aus, welche durch ihren gemeinsamen, cGMP-bildenden Guanylatzyklase-Rezeptor A (GC-A) vermittelt werden. Diese Effekte sind entscheidend an der physiologischen Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks sowie des intravaskulären Blutvolumens beteiligt. Darüber hinaus zeigen aktuelle Studien, dass NPs die Mobilisierung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe und deren Oxidation durch die Skelettmuskulatur steigern sowie die Thermogenese in braunem und weißem Fettgewebe aktivieren können. Dadurch können NPs den Energieverbrauch erhöhen und die Insulinsensitivität verbessern. Desweiteren ist Übergewicht mit einer gestörten NP/GC-A/cGMP-Signalübertragung verbunden, die möglicherweise zur Entwicklung von Diabetes Typ 2 und dessen kardio-metabolischen Folgeerkrankungen beiträgt. In vitro stimuliert synthetisches ANP über GC-A die Glukose-stimulierte Insulinsekretion aus kultivierten pankreatischen Inseln und die β -Zellproliferation. Die Bedeutung für die systemische Insulin/Glukosehomöostase in vivo ist jedoch unklar. Um zu untersuchen, ob die endogenen Herz hormone die sekretorische Funktion und/oder die Proliferation von β -Zellen unter (patho)physiologischen Bedingungen in vivo modulieren, haben wir ein neues genetisches Mausmodell mit selektiver Deletion des GC-A-Rezeptors in β -Zellen (β GC-A KO) generiert. In kultivierten Inseln von β GC-A KO-Mäusen waren die insulinotropen und proliferativen Effekte von ANP aufgehoben. Übereinstimmend damit führte die Infusion von BNP bei Kontroll-Tieren in vivo zu leicht erhöhten basalen Plasma-Insulinspiegeln und verbesserter Glukose-induzierter Insulinsekretion. Dieser Effekt von exogenem BNP konnte bei β GC-A KO-Mäusen nicht beobachtet werden, was die effiziente Deletion des GC-A-Rezeptors in β -Zellen bestätigt.

Interessanterweise hatte die Ablation des GC-A-Rezeptors auf β -Zellen unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf physiologische und metabolische Parameter in vivo. Sowohl männliche als auch weibliche β GC-A KO-Tiere zeigten keine Unterschiede in der basalen Insulin- und Glukosehomöostase, da sie ähnliche Nüchtern-Blutzucker- und Insulinspiegel (nach Fasten über Nacht) aufwiesen wie die Kontroll-Mäuse. Allerdings zeigten die mit HFD gefütterten β GC-A KO-Tiere frühzeitiger Glukose-Intoleranz sowie eine verminderte adaptive β -Zellproliferation. Abgesehen davon war das konsistenteste Ergebnis der in vivo-Studien der geschlechtsabhängige Unterschied in der Auswirkung der β -Zellspezifischen GC-A-Deletion auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion. Weibliche, aber nicht männliche β GC-A KO-Mäuse zeigten erhöhte Nüchtern-Insulinspiegel und eine signifikant erhöhte Glukose-stimulierte Insulinsekretion, was zu einer deutlich verbesserten Glukosetoleranz führte. Der postulierte und untersuchte Mechanismus beinhaltet eine Interaktion von Östrogenen und NPs, welche die Expression des mitochondrialen Uncoupling Protein 2 beeinflussen.

Diese Arbeit erweitert das derzeitige Wissen über die metabolischen Effekte des NP/GC-A-Systems. Insbesondere zeigen die Ergebnisse, dass Natriuretische Peptide zu einer gesteigerten β -Zellfunktion und Vitalität in frühen Stadien eines erhöhten Insulinbedarfs, d.h. bei Diabetes Typ 2, beitragen. Da die Studien eine wesentliche Rolle dieser kardialen Hormone im endokrinen Pankreas aufdecken, ist es umso wichtiger die pleiotropen Eigenschaften von NPs und ihre möglichen therapeutischen Anwendungen bei kardio-metabolischen Erkrankungen weiter zu untersuchen.

SUMMARY

The cardiac hormones atrial (ANP) and B-type (BNP) natriuretic peptide exert well-known renal and cardiovascular actions which are mediated by their shared cGMP-forming guanylyl cyclase A receptor (GC-A). These actions are critically involved in the physiological maintenance of arterial blood pressure and intravascular volume homeostasis. In addition, recent studies indicate that NPs can increase fatty acid mobilization from adipose tissue and their oxidation by skeletal muscles and activate a thermogenic program in brown and white fat. Thereby NPs increase energy expenditure and improve insulin sensitivity. Moreover, obesity is associated with impaired NP/GC-A/cGMP signaling, which possibly contributes to the development of type 2 diabetes and its cardiometabolic complications. In vitro, synthetic ANP, via GC-A, stimulates glucose-dependent insulin release from cultured pancreatic islets and β -cell proliferation. However, the relevance for systemic insulin/glucose homeostasis in vivo is not known. To dissect whether the endogenous cardiac hormones modulate the secretory function and/or proliferation of β -cells under (patho)physiological conditions in vivo, here we generated a novel genetic mouse model with selective disruption of the GC-A receptor in β -cells (β GC-A KO).

In vitro, the insulinotropic and proliferative actions of ANP were abolished in islets isolated from β GC-A KO mice. Concordantly, in vivo, infusion of BNP mildly enhanced baseline plasma insulin levels and glucose-induced insulin secretion in control mice. This effect of exogenous BNP was abolished in β GC-A KO mice, corroborating the efficient inactivation of the GC-A receptor in β -cells. Interestingly, the ablation of the GC-A receptor under basal conditions had no effect on physiological and metabolic parameters in vivo. Both male and female β GC-A KO animals showed no differences in basal insulin and glucose homeostasis, as they have similar fasting blood glucose and insulin levels (after overnight fasting) as the control mice. However, HFD-fed β GC-A KO animals had accelerated glucose intolerance and diminished adaptive β -cell proliferation. Apart from that, the most consistent result of the in vivo studies was the gender dependent difference in the impact of β -cell GC-A deletion on glucose-stimulated insulin secretion. Female, but not male, β GC-A KO mice showed enhanced fasted insulin levels and a markedly enhanced glucose-stimulated insulin secretion resulting in a distinctly improved glucose tolerance. The postulated and investigated mechanism involves an interaction of estrogens and NPs affecting expression levels of mitochondrial uncoupling protein 2.

This thesis extends the current knowledge of the metabolic actions of the NP/GC-A system. Specifically the results indicate that natriuretic peptides contribute to enhanced β -cell function and vitality during early stages of increased insulin demand, i.e. in type 2 diabetes. Since the studies show an essential role of these cardiac hormones in the endocrine pancreas, it becomes even more important to further investigate the pleiotropic actions of NPs and their potential therapeutic applications in cardio-metabolic diseases.

1 EINLEITUNG

1.1 Atriales und B-Typ Natriuretisches Peptid als endokrine Blutdruckregulatoren

Die endokrinen Eigenschaften des Herzens wurden 1981 erstmals von Adolfo J. de Bold beschrieben. Dessen Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die intravenöse Infusion eines Extraktes des atrialen Myokards bei Ratten einen starken natriuretischen und diuretischen Effekt hervorruft (DE BOLD *et al.* 1981). Bereits ein Vierteljahrhundert zuvor hatte Kisch an elektronenmikroskopischen Aufnahmen drüsenähnliche Granula in atrialen Myozyten entdeckt (KISCH 1956), bevor deren Relevanz für eine endokrine Achse zwischen dem Herzen und den Nieren von de Bold herausgestellt wurde. 1984 wurde die Struktur des zugrundeliegenden Peptids bestimmt und dieses als „Atriales Natriuretisches Peptid“ (ANP) bezeichnet (KANGAWA *et al.* 1984). Wenig später wurde aus dem Gehirn von Schweinen ein Peptid mit ebenfalls natriuretischen, diuretischen sowie blutdrucksenkenden Eigenschaften isoliert, dessen Aminosäuresequenz derer von ANP sehr ähnlich war und deshalb „B-Typ Natriuretisches Peptid“ (BNP) genannt wurde (SUDOH *et al.* 1988). Ebenfalls im Gehirn von Schweinen wurde das „C-Typ Natriuretische Peptid“ (CNP) entdeckt (SUDOH *et al.* 1990). Dessen Expression ist im Menschen, neben dem zentralen Nervensystem, am höchsten in Endothelzellen und Chondrozyten (LUMSDEN *et al.* 2010). CNP, auf welches im Folgenden nicht näher eingegangen wird, ähnelt ANP und BNP in seinem Aufbau, ist jedoch mehr an Knochenaufbau und -wachstum beteiligt als an der Natriurese (NAKAO *et al.* 2015). Alle Familienmitglieder der Natriuretischen Peptide (NP) besitzen eine über eine Disulfidbrücke geschlossene Ringstruktur aus 17 Aminosäuren (siehe Abb. 1), welche für ihre biologische Wirkung essentiell ist (MISONO *et al.* 1984).

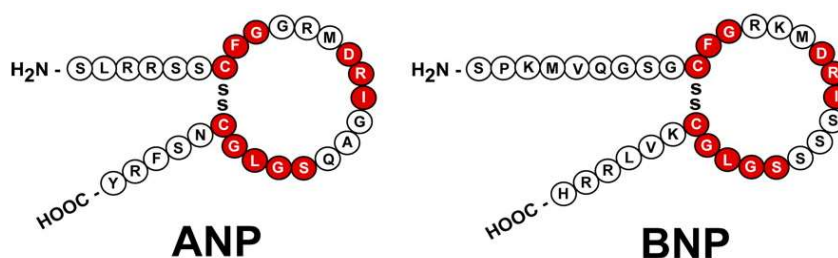


Abbildung 1: Struktur der humanen Natriuretischen Peptide ANP und BNP, wobei homologe Aminosäurereste rot markiert sind (modifiziert nach GOETZE 2012).

Unter physiologischen Bedingungen werden ANP und BNP hauptsächlich in Granula atrialer Kardiomyozyten gespeichert und freigesetzt, wobei die Konzentration an ANP etwa 40-fach höher ist. (GARDNER *et al.* 2007). Bei chronisch hämodynamischer Überlast, Entzündung oder Hypoxie kommt es zudem zu einer schnellen, anhaltenden Expression von ANP und/oder BNP in den Ventrikeln (THIBAUT *et al.* 1999). Zunächst werden beide Hormone als inaktive Pro-Peptide synthetisiert, welche anschließend durch die kardiomyozytenspezifische, membranständige Serinprotease Corin in ein

inaktives N-terminales Peptid sowie ein biologisch aktives C-Terminales Peptid gespalten werden (ZHOU AND WU 2014). Unter basalen Bedingungen werden ständig geringe Mengen an ANP und BNP aus den Atria freigesetzt (DE BOLD *et al.* 2001). Die Plasmaspiegel von gesunden Personen, welche sich in Ruhe befinden, liegen bei 3 - 20 pM an ANP und 1,4 - 12 pM an BNP (RADEMAKER AND RICHARDS 2005). Bei Herzinsuffizienz beispielsweise können die Konzentrationen bis auf das 30-fache erhöht sein (CODY *et al.* 1986; MUKOYAMA *et al.* 1990). Die Halbwertszeit von zirkulierendem ANP liegt bei etwa 2 Minuten (NAKAO *et al.* 1986), die von BNP bei etwa 20 Minuten (MUKOYAMA *et al.* 1991). Der bedeutendste Impuls für eine erhöhte Freisetzung ist die Zunahme der atrialen Wandspannung (EDWARDS *et al.* 1988). Aber auch Faktoren wie Glucocorticoide (SHIELDS *et al.* 1988), Catecholamine, Angiotensin II, Endothelin, Vasopressin (RUSKOAHO 1992) und Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) (KIM *et al.* 2013) spielen eine Rolle. Die BNP-Synthese und -Freisetzung wird außerdem auch durch proinflammatorische Zytokine (WEINFELD *et al.* 1999) und Hypoxie (WEIDEMANN *et al.* 2008) induziert, weshalb es zu einer selektiven Zunahme an BNP kommen kann, wenn entzündliche Prozesse an der Entstehung einer Krankheit beteiligt sind (OGAWA AND DE BOLD 2012). Zudem wurden bei der kardialen Sekretion der NPs Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt, wobei Östrogene die Freisetzung verstärken und Androgene diese hemmen (CLERICO *et al.* 2009; CLERICO *et al.* 2011). Dies könnte die generell höheren Plasmaspiegel bei Frauen erklären (HAMADA *et al.* 2017). Außerhalb des Herzens werden ANP und/oder BNP in geringen Mengen auch in Aorta, Lunge, Gehirn, Niere und Nebenniere, Darm, Thymusdrüse, Aderhaut und Ziliarkörper gebildet (RUSKOAHO 1992). Neueste Studien belegen, dass ANP ebenfalls in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas synthetisiert wird (NAJENSON *et al.* 2019). Die Freisetzung aus diesen Geweben beeinflusst allerdings kaum die Plasmaspiegel, weshalb hier von auto- bzw. parakrinen Effekten der beiden Peptide ausgegangen wird (VOLLMAR 1990). Abgebaut werden ANP und BNP enzymatisch über die Neutrale Endopeptidase (Nepriylisin, NEP). Diese wird überwiegend im Endothel der Lunge, den Nieren sowie den Neutrophilen Granulozyten gebildet (STEPHENSON AND KENNY 1987; MATSUMURA *et al.* 1996; PANKOW *et al.* 2007) und baut verstärkt ANP vor BNP ab (KENNY *et al.* 1993). Desweiteren werden beide Natriuretischen Peptide durch zelluläre Internalisierung über den NPR-C-Rezeptor, auch Clearance Rezeptor genannt, aus dem Blutkreislauf entfernt (MAACK *et al.* 1987).

Über ihren gemeinsamen Guanylatzyklase-Rezeptor A (GC-A), auch bekannt als Natriuretischer Peptid-Rezeptor A (NPR-A), vermitteln ANP und BNP unter anderem Effekte im zentralen Nervensystem, dem Gefäßsystem sowie in den Nieren und Nebennieren (Abb. 2). Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und des Blutvolumens. Über zentralnervöse Effekte senken die beiden Peptide die Sympathikusaktivität, vermindern das Trinkverhalten und hemmen den Salz-Appetit (ANTUNES-RODRIGUES *et al.* 1985; ITOH *et al.* 1986; SCHULTZ *et al.* 1988). In den glatten Gefäßmuskelzellen stimulieren die beiden Peptide über den GC-A-Rezeptor gefäßerweiternde Effekte und können dadurch akut den Blutdruck senken (HOLTWICK *et al.* 2002). Ebenfalls blutdrucksenkend ist die Steigerung der endothelialen Permeabilität, wodurch es zu einem vermehrten Flüssigkeitstransport aus den Gefäßen

ins Interstitium kommt (SCHREIER *et al.* 2008; CURRY *et al.* 2010). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass ANP die Regeneration und die Barrierefunktion des Endothels bei Schädigung durch inflammatorische Prozessen fördern kann (KUHN 2012). In den Nieren ist das NP/GC-A-System der größte Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), da es die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen und die Aldosteronproduktion in den Glomerulosazellen der Nebenniere hemmt (KUDO AND BAIRD 1984; KURTZ *et al.* 1986). Außerdem erhöht ANP über GC-A den renalen Blutfluss, die glomeruläre Filtrationsrate und die Ausscheidung von Natrium (GAMBARYAN *et al.* 1996; KISHIMOTO *et al.* 1996; MAACK 1996). Neben den natriuretischen und diuretischen Effekten in der Niere zeigen ANP und BNP zudem protektive Eigenschaften bei Verletzungen, Entzündungen und Fibrose (THEILIG AND WU 2015). Aber auch im Herzen konnten lokale Effekte der beiden Peptidhormone festgestellt werden. Bei andauernder, hämodynamischer Überlastung kommt es im Herzen zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten, zur Entwicklung kollagensezernierender Myofibroblasten, zur Anhäufung extrazellulärer Matrixproteine, zu interstitieller sowie perivaskulärer Fibrose und zum Zelltod (HEIN *et al.* 2003). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Expression von ANP und BNP in dieser Situation ansteigt und diese der Entstehung von Herzhypertrophie und -fibrose entgegenwirken (KERKELA *et al.* 2015). Da die Plasmaspiegel der beiden Hormone mit dem Grad der linksventrikulären Dysfunktion korrelieren, werden ANP und vor allem BNP in der Klinik als Marker für akutes und chronisches Herzversagen eingesetzt (BENEDICT *et al.* 1994; FU *et al.* 2018).

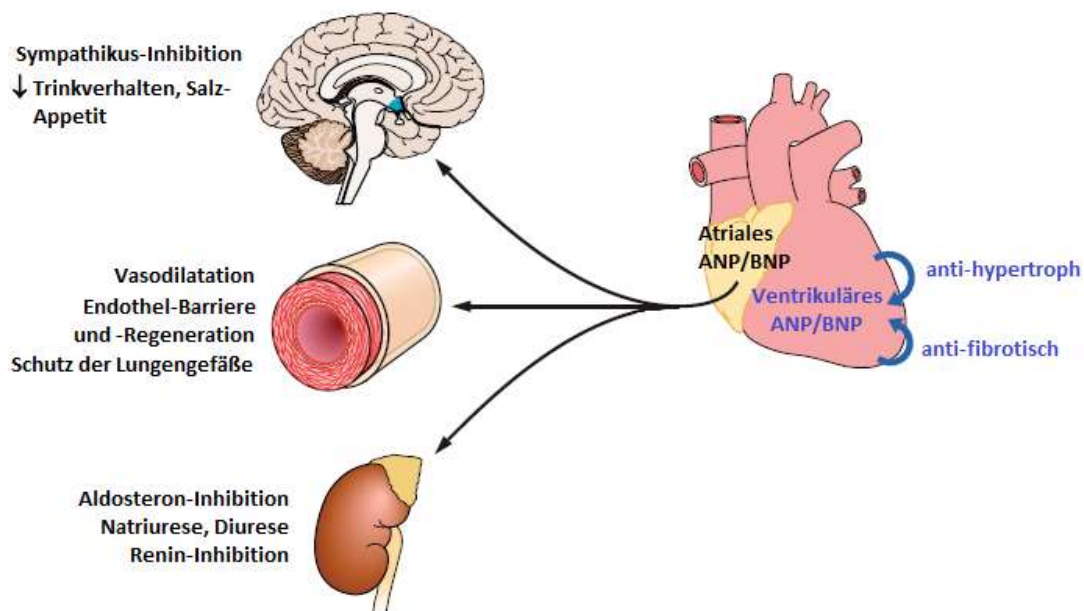


Abbildung 2: Übersicht über die pleiotropen, kardiovaskulären Effekte von ANP und BNP bei der Regulation von Blutdruck und -volumen sowie Herzhypertrophie und -fibrose (modifiziert nach KUHN 2016).

1.2 Gemeinsamer GC-A-Rezeptor und cGMP-modulierte dritte Signalträger

Bislang sind drei Rezeptoren bekannt, an welche ANP, BNP und CNP binden können: GC-A, GC-B und NPR-C (Abb. 3). GC-A und GC-B sind zwei von insgesamt sieben in Säugetieren identifizierten, membranständigen Guanylatzyklase-Rezeptoren: GC-A bis GC-G (KUHNS 2016). Allen gemeinsam ist ihr Aufbau als Homodimere mit einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer kurzen, hydrophoben Transmembranregion sowie einem intrazellulären Bereich mit einer Proteinkinase-homologen Domäne, einer Region zur Dimerisierung und einer zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-bildenden Zyklastase-Domäne am COOH-terminalen Ende (KUHNS 2003) (Abb. 3). Der GC-A Rezeptor vermittelt die physiologischen Effekte von ANP und BNP und ist hauptsächlich exprimiert im kardiovaskulären System (glatte Gefäßmuskulatur und Endothelzellen), der Milz, der Niere und Nebenniere, sowie verschiedenen metabolischen Organen wie Fettgewebe, Skelettmuskulatur, Leber, Gehirn, Darm und Pankreas (POTTER *et al.* 2006). Die Transkription des GC-A-Gens (NPR1) wird hauptsächlich reguliert durch den Transkriptionsfaktor SP-1 (GARDNER *et al.* 2007). Die Promotoraktivität kann, zumindest *in vitro*, durch verschiedene Hormone wie Vitamin D, Angiotensin II, Endothelin und Stickstoffmonoxid (NO) sowie durch intrazelluläre Signalwege über die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) oder die Serum/Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1) stimuliert werden (CHEN *et al.* 2004; GARDNER *et al.* 2007). ANP selbst hingegen hemmt den Promotor und damit die Genexpression von GC-A über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors GREBP (cGMP-response element-binding protein) (MARTEL *et al.* 2010). Kurz soll hier auch auf die weiteren Guanylatzyklase-Rezeptoren eingegangen werden: GC-B und sein Ligand CNP werden größtenteils zusammen in Blutgefäßen, Gehirn, Knochen, Lunge, Herz, Niere, Uterus, Ovarien und Hoden exprimiert (SCHULZ *et al.* 1989). GC-C vermittelt parakrine Effekte von Guanylin und Uroguanylin im Darmepithel (HAMRA *et al.* 1993). GC-E und GC-F kommen in den Photorezeptoren der Retina vor, werden durch intrazelluläre Calcium-regulierte Proteine aktiviert und sind beteiligt am Sehvorgang (KOCH *et al.* 2002). GC-D und GC-G sind im olfaktorischen System von Nagetieren exprimiert und werden aktiviert durch niedrige CO₂-Konzentrationen, Geruchsstoffe und Kälte (ZUFALL AND MUNGER 2010). Die extrazelluläre Domäne des Clearance-Rezeptors NPR-C ist denen der beiden anderen Rezeptoren für ANP und BNP zu etwa 30 - 35 % identisch (Abb. 3) (FULLER *et al.* 1988; VAN DEN AKKER 2001). Die intrazelluläre Domäne besitzt keine Kinase- und Guanylatzyklase-Aktivität, dafür jedoch eine G-Protein-aktivierende Aminosäuresequenz (MURTHY AND MAKHLOUF 1999). Studien mit NPR-C-Knockout-Mäusen haben bestätigt, dass dieser Rezeptor die NPs internalisiert und damit deren physiologische Wirkung lokal reguliert (MATSUKAWA *et al.* 1999). Neuere Studien deuten auch auf eine Signalfunktion des NPR-C hin, da die Bindung von NPs G-Protein-gekoppelte Prozesse wie die Inhibierung von Adenylatzyklasen oder die Aktivierung von Phospholipase C auslösen kann (MURTHY *et al.* 2000). Hauptsächlich exprimiert ist der NPR-C in der

Niere, der Lunge, dem Gefäßsystem sowie dem Fettgewebe; in geringerem Ausmaß aber auch in allen anderen Organen (MAACK *et al.* 1987; MAACK 1992; SARZANI *et al.* 1996).

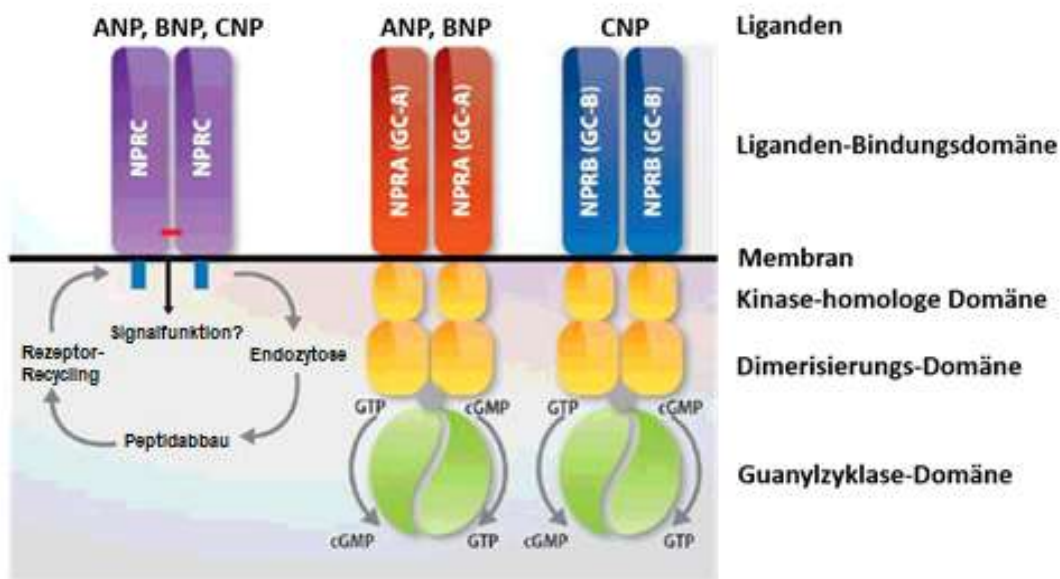


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Natriuretischen Peptid-bindenden Rezeptoren GC-A, GC-B und NPR-C sowie intrazelluläre Signal- und Abbauprozesse (modifiziert nach VOLPE *et al.* 2016).

Die extrazellulären Bindungsdomänen der NP-Rezeptoren besitzen unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen Peptide. Der NPR-C Rezeptor bindet alle drei NPs in der bevorzugten Affinität von ANP > CNP ≥ BNP (BENNETT *et al.* 1991). An den GC-A-Rezeptor binden die Peptide mit einer Präferenz von ANP ≥ BNP ≫ CNP (SUGA *et al.* 1992). GC-B hingegen hat eine hohe Bindungsaffinität für CNP und nur eine geringe für ANP und BNP (KOLLER *et al.* 1991). Kristallographische Studien lassen vermuten, dass bei der Bindung der entsprechenden Liganden an die beiden Rezeptoren GC-A und GC-B eine Konformationsänderung stattfindet, wodurch die Inhibierung der Guanylatzyklase durch die Kinase-homologe Domäne aufgehoben wird und es zur Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP aus Guanosintriphosphat (GTP) kommt (Abb. 3 und 4) (POTTER 2011). Der Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration aktiviert wiederum verschiedene Signalwege. Zu den cGMP-bindenden Proteinen zählen cGMP-gesteuerte Ionenkanäle (CNG), cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDE) sowie cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK oder PKG) (Abb. 4).

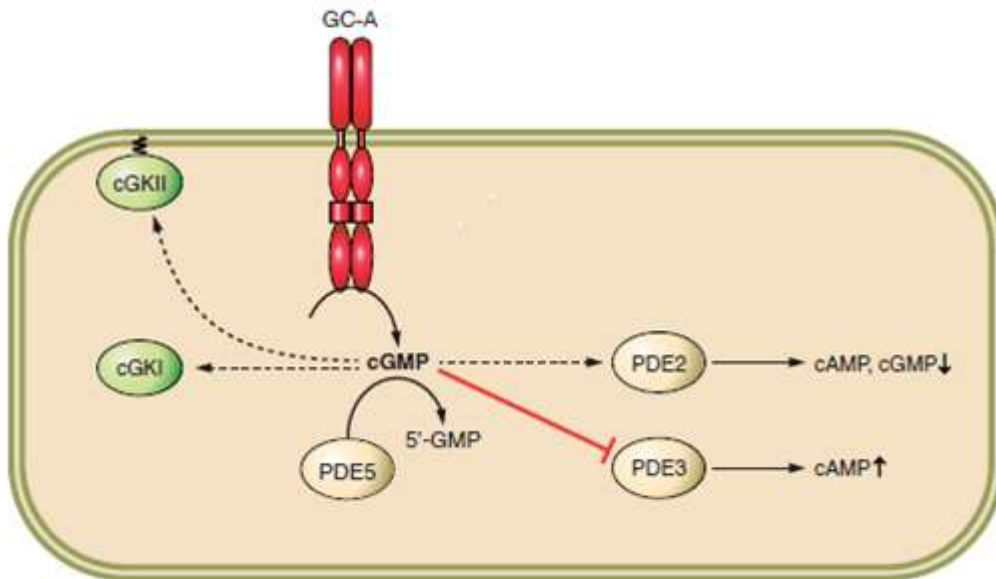


Abbildung 4: cGMP-modulierte, intrazelluläre Signalträger von GC-A: cGMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDE2/3/5) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKI/II) (modifiziert nach KUHN 2016).

Die Aktivierung von cGMP-gesteuerten Ionenkanälen beruht auf der Bindung von cGMP an das Kanalprotein, wodurch es zu einem Einstrom von Calcium- und Natrium-Ionen kommt (BIEL 2009). CNG-Kanäle werden jedoch hauptsächlich in der Retina exprimiert (in Stäbchen und Zapfen) und spielen dadurch eine wichtige Rolle bei der Phototransduktion (KUHN 2016) (GC-D und G sind Pseudogene im humanen System). Weitere Effektoren von cGMP sind die cGMP-modulierten Phosphodiesterasen, welche die Hydrolyse der zyklischen Nukleotide cAMP und/oder cGMP katalysieren und dadurch die Dauer, die Amplitude sowie die räumliche Verteilung der cGMP/cAMP-Signale innerhalb der Zelle steuern. Insgesamt werden 11 verschiedene PDE-Familien je nach ihrer Substratspezifität und Regulierung unterschieden (MAURICE *et al.* 2014). Einerseits stimuliert cGMP die Aktivität der PDE2 und damit den Abbau von cAMP, andererseits hemmt cGMP die Aktivität der PDE3 und vermindert dadurch den cAMP-Abbau (BEAVO 1995). Diese cGMP/cAMP-Regulierungen finden beispielsweise in Oozyten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Darmepithelzellen statt (KUHN 2016). Über den GC-A-Rezeptor auf adrenalen Glomerulosazellen vermittelt ANP durch die PDE2 inhibitorische Effekte auf die Aldosteronproduktion (BENDER AND BEAVO 2006). In Kardiomyozyten hemmt ANP die Aktivität der cAMP-abbauenden PDE3, stabilisiert dadurch den cAMP-Gehalt und verbessert die Kontraktilität der Zellen (KUHN 2015). Die cGMP-abhängige PDE5 hingegen vermittelt in fast allen Zelltypen den cGMP-Abbau (CONTI AND BEAVO 2007). Weitere Signalüberträger von cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen, wovon in Säugetieren zwei Formen vorkommen: cGKI und cGKII. Die cGKI-Isoformen sind hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und werden in Kardiomyozyten, Adipozyten, glatten Muskelzellen, Thrombozyten sowie in peripheren Neuronen und im zentralen Nervensystem exprimiert (HOFMANN AND WEGENER 2013). Über GC-A/cGMP aktiviert ANP die cGKI in der Niere und erhöht den

renalen Blutfluss sowie die glomeruläre Filtrationsrate (THEILIG AND WU 2015). Ebenfalls über die cGKI vermittelt das NP/GC-A/cGMP-System zahlreiche metabolische Effekte wie die Lipolyse in weißem Fettgewebe (SENGENES *et al.* 2003) oder die erhöhte oxidative Kapazität im Skelettmuskel (MIYASHITA *et al.* 2009) (s. Abschnitt 1.3). Die überwiegend membranassoziierte cGKI vermittelt spezifischere Effekte im Darmepithel, Gehirn, Knochen und den Nieren. In Letzteren hemmt das ANP/GC-A-System über die cGKI die Reninsekretion (KURTZ *et al.* 1986; GAMBARYAN *et al.* 1998) sowie die Aldosteronfreisetzung (SPIESSBERGER *et al.* 2009).

1.3 Bedeutung des NP/GC-A-Systems für Metabolismus und Energieverbrauch

Aus zahlreichen Studien der letzten Jahre ist hervorgegangen, dass ANP und BNP, neben ihrer bedeutenden Rolle bei der Blutdruck- und Volumenregulation, am Energieverbrauch und Metabolismus regulierend beteiligt sind. Durch die kardialen NPs stellt das Herz eine endokrine Verbindung zum Fettgewebe, Skelettmuskel und der Leber her (Abb. 5). Über den GC-A-Rezeptor im Fettgewebe üben die beiden Peptide einen starken lipolytischen Effekt aus, indem sie durch Aktivierung der cGKI die Hormon-sensitive Lipase (HSL) und Perilipin phosphorylieren und damit die Lipolyse initiieren (GALITZKY *et al.* 2001; SENGENES *et al.* 2003; MORO *et al.* 2004). In Adipozyten von Nagetieren ist dieser Effekt abgeschwächt aufgrund der hohen Expression des NPR-C-Rezeptors (SENGENES *et al.* 2002; BORDICCHIA *et al.* 2012). Weiterhin stimulieren ANP und BNP die Sekretion von Adiponektin aus Fettzellen - einem Hormon, welches die Insulinsensitivität von Leber und Skelettmuskel beeinflusst und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt (BIRKENFELD *et al.* 2012). Die Freisetzung des Adipokins Leptin und der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) im weißen Fettgewebe werden durch ANP gehemmt (MORO *et al.* 2007). Auch in der Leber reduziert ANP über cGMP die Freisetzung von entzündungsförderndem TNF α (KIEMER *et al.* 2002). Diese anti-inflammatorischen Effekte von ANP könnten die Insulinsensitivität der Leber aufrechterhalten (VERBOVEN *et al.* 2017). Zudem zeigte Lutz *et al.* 2009, dass die genetische Ablation der cGKI unter anderem ursächlich ist für die Entstehung von Entzündungen der Leber, Hyperglykämie und Glukoseintoleranz. Ebenfalls über die cGKI erhöhen ANP und BNP den Energieverbrauch in braunem Fettgewebe und induzieren das sogenannte „Browning“ von Adipozyten in weißem Fettgewebe. Vermittelt wird dieser Effekt über die p38 MAPK, welche die Transkription des Uncoupling Protein 1 (Ucp1) anregt (BORDICCHIA *et al.* 2012; KIMURA *et al.* 2017). Bordicchia *et al.* zeigten 2012, dass Kälteexposition die Plasmakonzentration von BNP erhöht und gleichzeitig die Expression des NPR-C in weißem Fettgewebe vermindert, was die Thermogenese begünstigt. Im Skelettmuskel induziert das NP/GC-A/cGKI-System die oxidative Kapazität und die Lipidoxidation über die Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktiviertem Rezeptor γ Koaktivator 1 α (PGC-1 α) und Peroxisom-Proliferator-aktiviertem Rezeptor δ (PPAR δ), beides wichtige Signalmoleküle in der mitochondrialen Biogenese

(MIYASHITA *et al.* 2009; ENGELI *et al.* 2012). Neuere Studien zeigen auch einen Zusammenhang zwischen einer hohen Konzentration an BNP und reduzierter Magenentleerung sowie verringerter Nährstoffabsorption (ADDISU *et al.* 2011). Die Infusion von BNP bei gesunden Probanden vermindert außerdem die Konzentration des Hormons Ghrelin, steigert damit das Sättigungsgefühl und senkt das Hungergefühl (VILA *et al.* 2012).

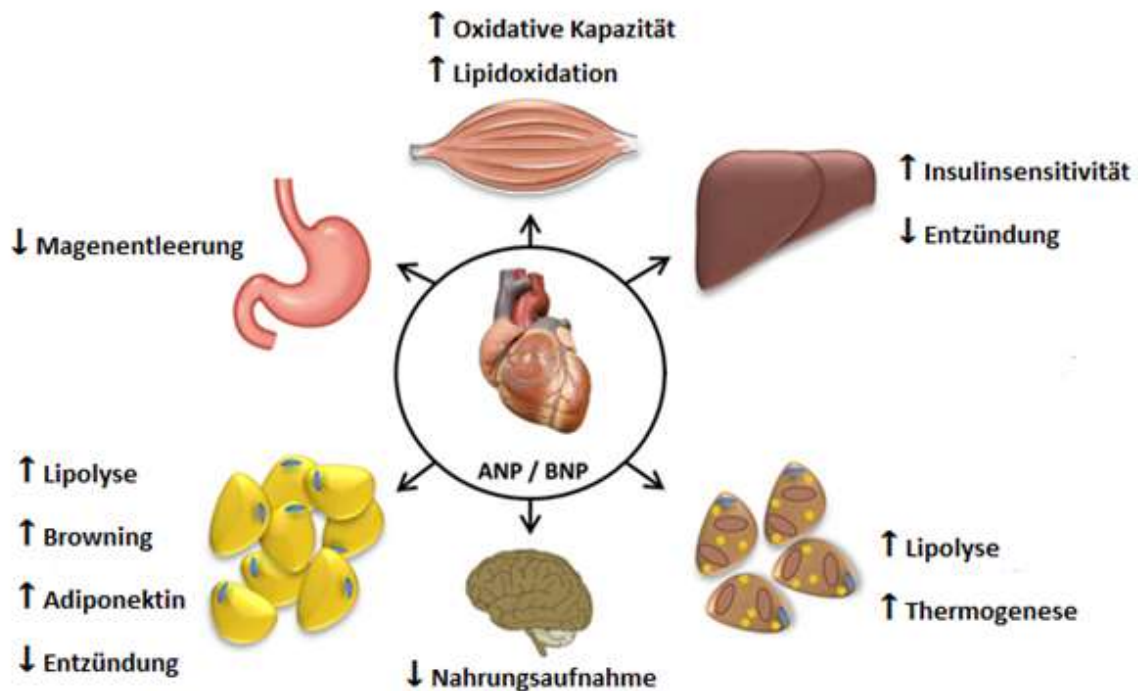


Abbildung 5: Bekannte metabolische Effekte von ANP und BNP im zentralen Nervensystem, Fettgewebe, Magen-Darm-Trakt, Skelettmuskel und Leber modifiziert nach (VERBOVEN *et al.* 2017).

1.4 Systemischer Mangel an Natriuretischen Peptiden bei Übergewicht, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2

Aufgrund ihrer Bedeutung für den Metabolismus kann eine Abschwächung der Effekte der Natriuretischen Peptide sowohl zu Herz-Kreislauf- als auch zu Stoffwechselerkrankungen führen. Tatsächlich treten Bluthochdruck, Insulinresistenz oder auch Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) häufig zusammen auf (JORDAN *et al.* 2018). Herzversagen ist ebenso oft assoziiert mit einer gestörten oxidativen Funktion der Skelettmuskulatur (DREXLER 1992) und Insulinresistenz (KEMPPAINEN *et al.* 2003). Mehrere epidemiologische Studien belegen eine inverse Korrelation zwischen den systemischen Plasmaspiegeln an ANP und BNP und dem Body Mass Index (BMI), der Maßzahl für die Beurteilung des Körpergewichts in Relation zur Körpergröße (WANG *et al.* 2004; DAS *et al.* 2005; OLSEN *et al.* 2005; SUGISAWA *et al.* 2010; KHAN *et al.* 2011; BUGLIONI *et al.* 2015). Diesen Zusammenhang zwischen einer gestörten Regulation des NP/GC-A-Systems und Übergewicht bezeichnet man als sogenanntes „Natriuretisches Handicap“ (COU

AND MORO 2016; VERBOVEN *et al.* 2017). Die niedrigen Plasmaspiegel an ANP und BNP bei übergewichtigen Patienten werden einer erhöhten Aktivität der Peptidase Neprilysin sowie einer vermehrten Expression des NPR-C-Rezeptors im Fettgewebe und der Skelettmuskulatur zugeschrieben, was zu einem gesteigerten Abbau der Peptide führt (MCCORD *et al.* 2004; WANG *et al.* 2004; STANDEVEN *et al.* 2011; COUE *et al.* 2015; RAMOS *et al.* 2015). Auch eine reduzierte Gen- und Proteinexpression von GC-A im subkutanen Fettgewebe von übergewichtigen Patienten mit und ohne T2D (KOVACOVA *et al.* 2016; RYDEN *et al.* 2016; VERBOVEN *et al.* 2016) sowie im Skelettmuskel (COUE *et al.* 2015) wurde bereits beschrieben. Zudem führen chronisch erhöhte ANP- und BNP-Plasmakonzentrationen zu einer homologen Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors (KUHN 2003; KUHN 2009). Verminderte Spiegel der NPs könnten, als Folge einer beeinträchtigten RAAS-Hemmung (KUDO AND BAIRD 1984; KURTZ *et al.* 1986), auch einhergehen mit erhöhten Aldosteron-Konzentrationen, welche letzten Endes zu einer Übergewicht-assoziierten Hypertonie führen (DESSI-FULGHERI *et al.* 1997; BUGLIONI *et al.* 2015). Obwohl die genauen Mechanismen hierbei nicht geklärt sind, könnte das NP/GC-A-System zumindest teilweise Übergewicht und das metabolische Syndrom mit Bluthochdruck in Verbindung bringen (JORDAN AND BIRKENFELD 2016). Auch ein Zusammenhang zwischen dem Mangel an NPs, Übergewicht und der Entstehung von T2D scheint plausibel (GRUDEN *et al.* 2014). Zum einen stellt die „Malmö Diet and Cancer“ Studie dar, dass niedrige ANP-Plasmakonzentrationen das Neuauftreten von T2D begünstigen können (MAGNUSSON *et al.* 2012). Zum anderen zeigte die „Atherosclerosis Risk in Communities“ Studie, dass niedrige NT-Pro-BNP-Plasmakonzentrationen die Entstehung von T2D begünstigen (LAZO *et al.* 2013). Prospektive Daten aus der „Women’s Health Study“ wiederum verbinden NT-Pro-BNP-Plasmakonzentrationen nahe der oberen Grenze des normalen Bereiches mit einem geringeren Risiko für T2D (EVERETT *et al.* 2013). Weiterhin wurde eine Variante des ANP-Gens (rs5068) mit höheren ANP-Plasmaspiegeln und reduziertem Blutdruck, BMI, Taillenumfang sowie geringerem Risiko für das Metabolische Syndrom und T2D in Verbindung gebracht (CANNONE *et al.* 2011; JUJIC *et al.* 2014). Ähnlich ist ein genetischer Polymorphismus in der Promotorregion des BNP-Gens assoziiert mit höheren BNP-Plasmakonzentrationen und einer geringeren Gefahr an T2D zu erkranken (MEIRHAEGHE *et al.* 2007). Gerade im Zusammenhang mit der Prävention von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen werden häufig Gewichtsverlust und körperliche Betätigung empfohlen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Sport die ANP-Konzentrationen bei Gesunden (BARLETTA *et al.* 1998) sowie Patienten mit Herzversagen (KJAER *et al.* 2004) oder Übergewicht (HAUFE *et al.* 2015) erhöht. Auch die GC-A-Expression im Skelettmuskel wird durch aerobes Training von übergewichtigen Probanden hochreguliert (ENGELI *et al.* 2012). Außerdem ist bekannt, dass bereits ein mäßiger Gewichtsverlust die NPR-C mRNA-Expression im Fettgewebe reduziert (HAUFE *et al.* 2015; BRACHS *et al.* 2016). Dessi-Fulgheri *et al.* zeigten 1999 zudem, dass eine Gewichtsabnahme durch Kalorienreduzierung den natriuretischen Effekt von ANP bei übergewichtigen Patienten mit Bluthochdruck verbessert. Bariatrische Eingriffe zur Gewichtsreduktion wie Magenverkleinerung oder Magenband-Operationen rufen sogar einen noch größeren Anstieg an

NT-Pro-BNP-Plasmakonzentrationen hervor als Änderungen des Lebensstils allein (ABRAHAMSSON *et al.* 2013). Auch pharmakologische Ansätze zur Manipulation des NP/GC-A-Systems werden bereits verfolgt. Das rekombinante Peptid Caperitide (ANP) wird eingesetzt für die intravenöse Behandlung von akut dekompensierter Herzinsuffizienz (MORITA *et al.* 2012; VAN DEURSEN *et al.* 2014) und therapieresistenter arterieller Hypertonie (CATALIOTTI *et al.* 2012). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit ist der Einsatz jedoch beschränkt und es wurden neuere synthetische NPs mit verbesserter Wirksamkeit, Spezifität und Resistenz gegen enzymatischen Abbau entwickelt (MEEMS AND BURNETT 2016). Ein weiterer Ansatz ist es, die Clearance der Peptide abzuschwächen. Der Nephrylin Inhibitor LCZ696 (Entresto®) erhöht die endogenen Plasmaspiegel der Natriuretischen Peptide und verringert Morbidität und Mortalität bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen (MCMURRAY *et al.* 2014). Eine klinische Studie zeigte, dass LCZ696 bei übergewichtigen Patienten mit Bluthochdruck die Insulinsensitivität verbessert (JORDAN *et al.* 2017). Die Inhibition von PDE5, welche den Abbau von cGMP in Fett-, Leber- und Skelettmuskelzellen verhindert, verbessert in diabetischen Mäusen die Insulinsensitivität, die glykämische Kontrolle und den Fettstoffwechsel (FU *et al.* 2015). Außerdem zeigte die Behandlung mit dem PDE5 Inhibitor Sildenafil bei Patienten mit T2D einen positiven Effekt auf den Glukosemetabolismus (MANDOSI *et al.* 2015). Abbildung 6 stellt zusammenfassend die Verbindung von systemischem Mangel an NPs mit Übergewicht-assoziierter Hypertonie sowie T2D dar und zeigt allgemeine und pharmakologische Maßnahmen zur Verbesserung von Bluthochdruck und der Glukose-/Insulinhomöostase durch Einwirkung auf das NP/GC-A/cGMP-System.

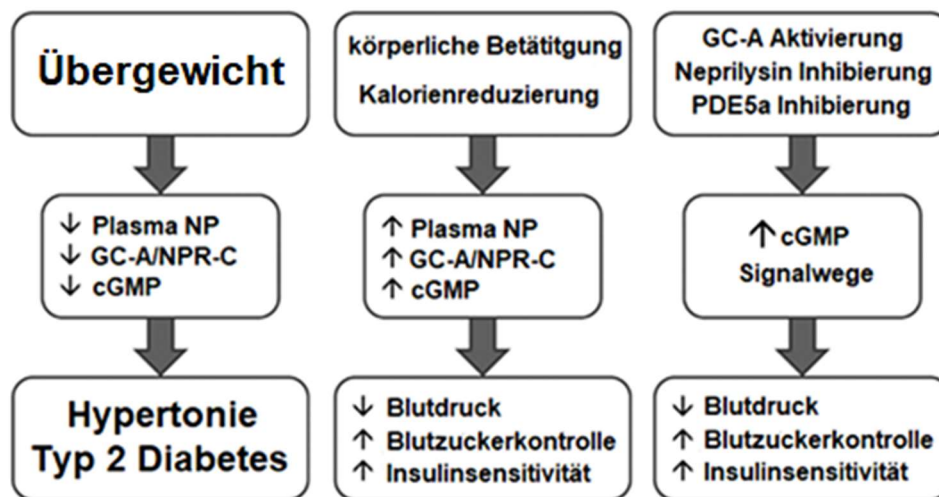


Abbildung 6: Verknüpfung von systemischem Natriuretischen Peptid-Mangel mit Übergewicht-assoziierter Hypertonie und Typ 2 Diabetes sowie allgemeine und pharmakologische Maßnahmen zur Verbesserung von Bluthochdruck und der Glukose-/Insulinhomöostase durch Einwirkung auf das NP/GC-A/cGMP-System (modifiziert nach JORDAN *et al.* 2018).

1.5 Bisher bekannte Effekte von Natriuretischen Peptiden auf pankreatische β -Zellen

Die physiologischen Effekte von ANP und BNP als endokrine Blutdruck- und Volumen-Regulatoren sind lange bekannt und sehr gut belegt. In den letzten zwei Jahrzehnten haben zahlreiche Studien zudem eine protektive Rolle dieser Herz hormone bei metabolischen Erkrankungen aufgezeigt. Wie in den Abschnitten 1.3 und 1.4 dargestellt, scheinen ANP und BNP den Grundumsatz und die Insulinsensitivität durch Effekte auf das Fettgewebe, die Skelettmuskulatur, die Leber, den Magen-Darm-Trakt und das zentrale Nervensystem zu verbessern. Außerdem wurden bereits direkte und indirekte Effekte auf das endokrine Pankreas beschrieben. Konkret als Ziel für die Natriuretischen Peptide in Betracht gezogen werden daher auch die insulinproduzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas (GRUDEN *et al.* 2014). Der gemeinsame GC-A-Rezeptor für ANP und BNP wird exprimiert auf insulinproduzierenden RINm5F- und INS-1-Zelllinien sowie pankreatischen β -Zellen von Ratten, wo er intrazelluläre cGMP-Anstiege als Reaktion auf die Stimulation mit synthetischem ANP vermittelt (VERSPHOHL *et al.* 1988; VERSPHOHL AND AMMON 1989). Auch cGMP-modulierte dritte Signalträger sind in pankreatischen Inseln und β -Zellen exprimiert: die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI oder PKG) (KUO 1974; ROPERO *et al.* 1999) sowie die Phosphodiesterasen PDE2A (ROSMAN *et al.* 1997; STEPHENSON *et al.* 2009) und PDE3B (ZHAO *et al.* 1997; HEIMANN *et al.* 2010). Ergebnisse der AG Kuhn aus einer Studie in Kooperation mit einer spanischen Arbeitsgruppe zeigten, dass ANP über das GC-A/cGMP/cGKI-System die Effekte von Glukose auf die Insulinsekretion von kultivierten β -Zellen und Langerhans-Inseln verbessert (ROPERO *et al.* 2010). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Behandlung isolierter Langerhans-Inseln mit synthetischem ANP zu einer erhöhten Proliferation von β -Zellen führt (YOU AND LAYCHOCK 2009). Wenige pharmakologische Studien lieferten kontroverse Ergebnisse zur Bedeutung der Natriuretischen Peptide für die β -Zellfunktion in vivo. Die Infusion von hohen Dosen an exogenem ANP führte bei Gesunden zu erhöhten Insulin- und gleichzeitig verringerten Glukosespiegeln (UEHLINGER *et al.* 1986). Am isoliert perfundierten Pankreas von Ratten wurde ebenfalls eine insulinotrope Wirkung von ANP beobachtet (FEHMANN *et al.* 1990). In anderen Studien hingegen hatte die Infusion von niedrigeren ANP-Dosen bei humanen Probanden entweder keine Auswirkungen auf die Plasma-Insulinspiegel (FERRARI *et al.* 1992) oder löste nur kurze, postprandiale Anstiege der Insulin-/Glukosespiegel aus (BIRKENFELD *et al.* 2008). Auch hemmende Effekte von exogenem ANP auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von Mäusen und Ratten wurden bereits beschrieben (AHREN 1988). Desweiteren lieferten Untersuchungen an einem genetischen Mausmodell die Ergebnisse, dass der globale Knockout des GC-A-Rezeptors den Insulingehalt von β -Zellen, die Größe von Langerhans-Inseln und die Masse an β -Zellen vermindert (ROPERO *et al.* 2010). Keine dieser genannten Studien gibt jedoch bisher Aufschluss darüber, inwiefern die endogenen NPs die Funktion und das Wachstum von β -Zellen in vivo beeinflussen. Lange bekannt sind beispielsweise Probleme bei der Kultivierung von insulinproduzierenden Zelllinien, welche aufgrund begrenzter Verfügbarkeit von primären β -Zellen häufig in der Diabetes-Forschung zum Einsatz kommen (SKELIN *et al.* 2010). Die

physiologischen Eigenschaften der RINm5F-Zelllinie unterscheiden sich stark von denen der Primärzellen und zeigen Beeinträchtigungen im Glukosetransport sowie in der Empfindlichkeit gegenüber Glukose (HALBAN *et al.* 1983). INS-1-Zellen hingegen weisen zwar viele Charakteristika von nativen β -Zellen auf, besitzen allerdings nur einen sehr geringen Insulingehalt und benötigen den Einsatz von toxischem Mercaptoethanol im Kulturmedium (ASFARI *et al.* 1992). Ebenso stellen die erwähnten Applikationen hoher ANP/BNP Konzentrationen *in vitro* oder *in vivo* nicht die Bedeutung der endogenen, weitaus niedrigeren Plasma-Spiegel dar. Aufgrund der eingangs erwähnten Eigenschaften ruft die systemische Gabe von ANP/BNP immer multiple kardiovaskuläre (Blutdruckabfall) und metabolische Effekte (erhöhte Insulinsensitivität, Lipolyse) hervor. Solche Veränderungen wiederum können, sei es direkt oder indirekt, durch deren Einwirkung auf den Sympathikus, auch Einfluss auf die pankreatischen β -Zellen ausüben. Und auch die genannte Studie von Ropero *et al.* an Mäusen mit globaler Deletion des GC-A-Rezeptors konnte nicht spezifisch die Auswirkungen auf die β -Zellen abbilden. Diese Tiere weisen viele systemische Veränderungen wie Bluthochdruck, Herzhypertrophie und erhöhten Sympathikustonus auf, welche ebenso indirekt die Insulin-Homöostase beeinflussen könnten (KUHN *et al.* 2009). Letzten Endes lässt bisher demnach keine dieser Studien das Fazit zu, dass die endogenen Natriuretischen Peptide das Wachstum und/oder die Funktion von pankreatischen β -Zellen modulieren.

1.6 Fragestellung

Die in Kapitel 1.4 und 1.5 erwähnten epidemiologischen, pharmakologischen sowie *in vitro*-Studien ließen erstmals vermuten, dass ANP und BNP eine regulierende Rolle im endokrinen Pankreas - speziell für die insulinproduzierenden β -Zellen - spielen (UEHLINGER *et al.* 1986; ROPERO *et al.* 2010; GRUDEN *et al.* 2014; SCHLUETER *et al.* 2014). Anhand dieser Studien entstand das Konzept, dass das sogenannte „Natriuretische Handicap“ bei Übergewichtigen nicht nur zu einer gestörten Insulinsensitivität führt, sondern vermutlich auch zu einer unzureichenden Insulinsekretion der β -Zellen (COUE AND MORO 2016; VERBOVEN *et al.* 2017). Außerdem lieferten *in vitro*-Versuche (YOU AND LAYCHOCK 2009) und Daten von Mäusen mit globaler Deletion des GC-A-Rezeptors (ROPERO *et al.* 2010) erste Hinweise, dass das NP/GC-A-System auch an der Proliferation der β -Zellen beteiligt sein könnte. Aufgrund der kontroversen Ergebnisse und der aufgezeigten Limitationen wurde die regulatorische Bedeutung der NPs für die Insulinsekretion sowie das β -Zellwachstum *in vivo* allerdings in keiner dieser Studien eindeutig gezeigt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb anhand eines neuen genetischen Mausmodells mit β -zellspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors zu untersuchen, ob das endogene NP/GC-A-System die Funktion und/oder die Proliferation von β -Zellen unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen *in vivo* moduliert und ob es darin geschlechtsspezifische Unterschiede gibt.

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen der Dissertation bearbeitet:

- Beeinflusst der endogene NP/GC-A-Signalweg in pankreatischen β -Zellen die Insulin/Glukose-Homöostase unter normalen, physiologischen Bedingungen?
- Verbessert ein Anstieg der NP-Plasmaspiegel durch pharmakologische Applikation die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von pankreatischen β -Zellen?
- Welche Bedeutung hat das endogene NP/GC-A-System für die Insulin/Glukose-Homöostase unter pathologischen Bedingungen einer Übergewicht-induzierten Insulinresistenz? Stimulieren ANP und BNP die adaptive Proliferation der β -Zellen, um die Insulinresistenz zu kompensieren?

Unerwartet war, dass die GC-A-Deletion in β -Zellen verschiedene, sogar gegensätzliche Effekte auf die Insulin/Glukose-Homöostase in männlichen gegenüber weiblichen Mäusen hervorrief. Deshalb wurden die Fragestellungen um eine weitere ergänzt:

- Welche Mechanismen sind beteiligt an den geschlechtsabhängigen Unterschieden im Einfluss der β -zellspezifischen GC-A-Deletion auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Generierung und Haltung eines neuen genetischen Mausmodells mit β -zellspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors

2.1.1 Maus-Zucht

Um die Bedeutung des ANP/GC-A-Systems bei der Regulation der Insulinsekretion sowie für die Vitalität der β -Zellen der Langerhans-Inseln *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Mausmodell mit einer konditionellen, zellspezifischen Deletion des GC-A-Rezeptors in pankreatischen β -Zellen genutzt (β GC-A KO). Generiert wurde dieses transgene Modell mittels des Cre/LoxP-Rekombinationssystems. Dabei ermöglicht das Enzym Cre-Rekombinase, welches ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammt, eine beliebige DNA-Sequenz zell- oder gewebespezifisch zu deletieren. Als Erkennungssequenz für die Rekombinase dienen zwei sogenannte loxP-Basenfolgen (locus of X-over P1), welche mittels homologer Rekombination gleichgerichtet vor und hinter die Sequenz inseriert werden. Erkennt die Cre-Rekombinase eine „geflochte“ DNA-Sequenz, katalysiert sie deren Ausschneiden aus dem Genom.

Für die Generierung einer zellspezifischen Knockout-Maus werden zwei transgene Mauslinien benötigt. Bei der Erzeugung der geflochten Mauslinie wird entweder das gesamte Zielgen oder ein bestimmter Abschnitt davon durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen mit loxP-Sequenzen flankiert und anschließend in die Keimbahn eingebracht. Phänotypisch unterscheidet sich das transgene Tier nicht vom Wildtyp, da die 34 bp langen loxP-Sequenzen üblicherweise in Exon-umfassenden Introns liegen und das Zielgen dennoch funktionsfähig exprimiert wird. Wird in einer zweiten Mauslinie das Cre-Transgen unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors integriert, so werden durch Verpaarung der beiden Linien doppelt transgene Nachkommen erzeugt. In diesen wird die Cre-Rekombinase zelltypspezifisch exprimiert und deletiert das geflochte Exon, was den gewünschten Knockout des Zielgens zur Folge hat.

Verpaart wurden für die vorliegende Arbeit homozygot geflochte GC-A Mäuse ($GC-A^{lox/flox}$), etabliert in der AG Kuhn (HOLTWICK *et al.* 2002), mit rat insulin 2 promotor-Cre ($RIPCre^{tg}$) Mäusen von Prof. Dr. Pedro L. Herrera (Medizinische Fakultät, Abteilung für genetische Medizin und Entwicklung, Universität Genf, Schweiz), in welchen die Cre-Rekombinase nur in den pankreatischen β -Zellen exprimiert wird (HERRERA 2000). Beide Mausstämme haben einen gemischten 129/SVxC57Bl6 Hintergrund.

2.1.2 Versuchstierhaltung

Die Mäuse wurden in vollklimatisierten, fensterlosen Räumen des Tierstalles des Physiologischen Institutes der Universität Würzburg mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h (Lichtphase von 6:00 Uhr

bis 18:00 Uhr) bei einer Temperatur von 21 - 23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % gehalten. Die Unterbringung erfolgte in Makrolon-Käfigen (Typ 2) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. Nachkommen wurden nach 19 - 21 Tagen von der Mutter getrennt. Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen 55.2-2531.01-32/11).

2.1.3 Verwendete Diäten

Nach dem Absetzen der Jungtiere von der Mutter ab der 3. Lebenswoche hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang zur Standardhaltungsdiät der Firma ssniff (Alleinfuttermittel Maus-Haltung, ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, 9 % kcal aus Fett). Für Studien eines experimentellen Diabetes Mellitus Typ 2 wurden Tiere ab der 5. Lebenswoche bis Versuchsende mit Experimentaldiäten der Firma Research Diets Inc. (New Brunswick, USA) gefüttert. Dabei handelte es sich jeweils um die Hochfettdiät (HFD) mit 60 % kcal aus Fett und die entsprechende Kontrolldiät (ND) mit 10 % kcal aus Fett. Außer in den Fastenzeiträumen von 4 h vor den Insulintoleranz-Tests (ITT) bzw. 16 h vor den oralen Glukosetoleranz-Tests (oGTT) stand den Tieren das Futter ad libitum zur Verfügung.

2.1.4 Euthanasie und Organentnahme

Die Tiere wurden vor einer Organentnahme oder der Insel-Isolation zunächst mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, 4 %) betäubt und mittels zervikaler Dislokation geopfert. Die entnommenen Gewebe wurden auf einer Feinwaage (TE214S, Sartorius, Göttingen) gewogen, sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Pankreasgewebe wurde für die Insel-Isolation vor der weiteren Organentnahme perfundiert oder für die Histologie in Einbettkassetten (Medite, Burgdorf) für 24 h in 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert.

2.2 Charakterisierung physiologischer und metabolischer Parameter der Versuchstiere

2.2.1 Blutdruckmessungen

Die Messungen des arteriellen Blutdrucks erfolgten nicht-invasiv mittels Plethysmographie an der Schwanzarterie der Mäuse und wurden dankenswerterweise von den Technischen Angestellten Frau Katharina Völker und Frau Lisa Krebs (beide Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt. Die Tiere wurden dazu in einer Stofftasche fixiert und diese in eine Kunststoffröhre mit

zugehöriger Wärmeverrichtung gesetzt. Nach einer Gewöhnungsphase von 10 Minuten wurde die Blutdruckmanschette in der Mitte des Schwanzes angebracht. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurde immer zur gleichen Uhrzeit über 15 Minuten lang minütlich der Blutdruck der Tiere aufgezeichnet. Die Versuchsdurchführung und die Dokumentation erfolgte mit dem „Softron Indirect Blood Pressure Meter BP-98A“ (Softron Co. Ltd., Tokyo, Japan). Aufgezeichnet wurden der systolische und diastolische Blutdruck.

2.2.2 Bestimmung des Körpergewichtes und der Futtermengeaufnahme

Zur Beobachtung des Gesundheitszustandes und zur Feststellung etwaiger Genotyp-abhängiger Unterschiede erfolgten über den Zeitraum der diätetischen Interventionen hinweg eine wöchentliche Dokumentation des Körpergewichtes (KGW) sowie der aufgenommenen Futtermenge. Dies geschah mit Hilfe einer elektronischen Waage (Mettler-Toledo GmbH, Gießen) morgens zwischen 8:00 Uhr und 9:00 Uhr. Außerdem wurde das KGW im Rahmen der oGTTs und ITTs für die Berechnung der jeweiligen Glukose- bzw. Insulin-Dosis am Vorabend des Versuchstages bestimmt.

2.2.3 Orale Glukosetoleranz-Test

Vor Messung des basalen Blutzuckerspiegels sowie dem oGTT wurde den Tieren - wenn nicht anders angegeben - ab dem Vorabend des Versuches 16 h lang das Futter entzogen und sie wurden in einen frischen Käfig gesetzt. Die Versuche fanden am nächsten Morgen ab 8:00 Uhr statt und wurden zusammen mit der Technischen Angestellten Katharina Völker durchgeführt. Die Tiere wurden mit der Hand fixiert und die Schwanzvene der Tiere mit einem Skalpell vorsichtig angeritzt. Der dabei austretende Blutstropfen wurde auf den Teststreifen eines Blutzuckermessgerätes (AccuChek Mobile, Roche, Mannheim) aufgetragen. Der Gehalt der Glukose im Kapillarblut wird dabei reflexionsphotometrisch bestimmt und in mmol/l im Display des Gerätes angezeigt. Sollte weiterhin im Rahmen eines oGTTs die Blutzucker-Regulations-Fähigkeit des Körpers ermittelt werden, bekamen die Tiere nach der basalen Blutzuckermessung oral eine Glukose-Menge von 2 mg pro g KGW mittels einer Kanüle zugeführt. Dazu wurde vor Versuchsbeginn eine 20%ige Glukose-Lösung (w/v) in destilliertem Wasser hergestellt. Im weiteren Verlauf des Tests wurden nach der basalen Blutzuckermessung (0 min) die Blutzuckerwerte 15 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min nach Glukosegabe gemessen. Der schnelle Blutzuckeranstieg stimuliert die Bauchspeicheldrüse zur Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen, welches wiederum blutzuckersenkende Reaktionen in Muskel-, Leber- und Fett-Zellen hervorruft. Im oGTT geben der Nüchternwert der Glukosekonzentration im Blut, der Anstieg, der

Maximalwert und der anschließende Abfall Aufschluss über Insulinresistenzen oder verminderter Insulinsekretionsfähigkeit der Bauchspeicheldrüse und damit einen möglichen Typ 2 Diabetes.

2.2.4 Insulintoleranz-Test

Vor Versuchsbeginn wurde den Tieren ab 7:00 Uhr morgens für 4 h das Futter entzogen und zunächst analog zu den oGTTs die basale Blutzuckerkonzentration mit dem Blutzuckermessgerät bestimmt. Anschließend wurde den Tieren Insulin (1 IU/g KGW; Actrapid Penfill Insulin human, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark) intraperitoneal (i.p.) injiziert und die Blutzuckerwerte zu den Zeitpunkten 15 min, 30 min und 60 min gemessen. Die Insulintoleranz-Tests wurden zusammen mit Frau Katharina Völker durchgeführt. Dieser Test dient zur Analyse der Insulinsensitivität sowie der Feststellung etwaiger Insulinresistenzen in Muskel-, Leber- und Fett-Zellen. Die applizierte Dosis senkt den Blutzuckerspiegel und der zeitliche Verlauf dessen gibt Aufschluss darüber, ob und wie schnell der Körper auf das Insulin reagiert.

2.2.5 Glukose-stimulierte Insulinsekretion

Im Rahmen der oGTTs wurde neben der Messung der Blutzuckerwerte zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min und 30 min das Blut aus der Schwanzvene gesammelt und aus dem daraus gewonnenen Blutplasma (siehe 2.2.6.1) die jeweiligen Insulinkonzentrationen mittels eines Insulin-ELISA bestimmt (siehe 2.2.6.2). Dieser Versuch diente dazu, die physiologische Insulinsekretionskapazität der β -Zellen als Reaktion auf die oral verabreichte Glukose in vivo zu untersuchen.

2.2.6 Untersuchung von Plasmaparametern

2.2.6.1 Blutentnahme zur Plasmagewinnung

Zur Blutabnahme für die Gewinnung von Blutplasma wurde die Schwanzvene der Tiere mit einem Skalpell vorsichtig angeritzt und das austretende Blut mittels einer heparinisierten Hämatokrit-Kapillare (A. Hartenstein GmbH, Würzburg) aufgenommen und in eisgekühlten Röhrchen aufbewahrt. Alternativ erfolgte die Blutabnahme vor der Organentnahme oder der Insel-Isolation unter leichter Betäubung am Auge durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Hilfe von EDTA-beschichteten 100 μ l Microvetten (Microvette® 100 K3E, Sarstedt, Nümbrecht). Anschließend wurden die Proben für 13.000 rpm x 2 min, bei 4 °C zentrifugiert (Heraeus® Fresco® 21 Microzentrifuge, Thermo Fisher

Scientific, Dreieich). Das Plasma wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C weggefroren.

2.2.6.2 Bestimmungen der Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid und BNP mittels spezifischer ELISAs

Die Konzentration an Insulin oder C-Peptid in je 5 µl Blutplasma wurde mit den Ultra Sensitive Mouse Insulin (Cat. #90080) oder C-Peptide (Cat. #90050) ELISA Kits von Crystal Chem (Downers Grove, Illinois, USA) anhand von Doppelwerten bestimmt. Es wurde genau nach Herstellerangaben gearbeitet. Das Prinzip der Messung beruht dabei auf der Bindung der Peptide an einen in einer 96-Lochplatte immobilisierten anti-Peptid-Antikörper sowie anschließender Bindung eines zweiten Enzym-konjugierten anti-Peptid-Antikörpers (Sandwich-ELISA). Durch Zugabe eines Substrates entsteht ein blaues Reaktionsprodukt. Dessen Menge ist direkt proportional zur Konzentration des Peptids. Die Messwerte wurden an einem Plattenlesegerät (Wallac VICTOR² 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und mithilfe einer Standardreihe die Konzentration in ng/ml berechnet. Die Plasmakonzentrationen von BNP wurden von Frau Dr. Franziska Werner mit dem Mouse BNP ELISA Kit (Cat. #MBS2510603) von MyBiosource Inc. (SanDiego, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.3 Studien mit exogen zugeführten, synthetischen Natriuretischen Peptiden

2.3.1 Akute, intraperitoneale Injektion von ANP

Um zu untersuchen, ob eine akute Gabe von ANP die Insulinsekretion der β -Zellen in vivo beeinflusst, wurde Kontroll- und β GC-A KO-Tieren 15 min vor der Durchführung eines oGTTs mit begleitender Blutabnahme für die Bestimmung der GSIS einmalig ANP (ChinaPeptides Co Ltd, Shanghai, China) i.p. injiziert. In Anlehnung an Brunner und Wölkart (2001) wurde eine Dosis von 1,5 µg/g KGW verabreicht. Das ANP wurde vor dem Versuch in 0,9%iger steriler NaCl-Lösung unter der Sterilbank gelöst. Am Ablauf des oGTTs sowie der Blutabnahme für die Plasmagewinnung wurde nichts verändert.

2.3.2 Chronische Infusion von BNP mittels subkutan implantierten osmotischen Mini-Pumpen

Für eine stressfreie Verabreichung des zu testenden BNP über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden den Tieren osmotische Mini-Pumpen (Typ 1107D, ALZET® Osmotische Pumpen, Kalifornien, USA) subkutan implantiert. Dieser Pumpentyp hat ein Füllvolumen von 100 µl und eine kontinuierliche Abgaberate von 0,5 µl/h. In Anlehnung an Bordicchia et al. (2012) wurde eine Dosis von 2 ng/g KGW/h BNP gewählt. Die Pumpen wurden nach Herstellerangaben von Frau Katharina Völker mit der erforderlichen Menge an BNP (BNP-45 (mouse) trifluoroacetate salt, Bachem, Bubendorf, Schweiz) bzw. 0,9%iger, steriler NaCl-Lösung (= Vehikel) befüllt und implantiert (KILIC *et al.* 2007; KLAIBER *et al.* 2010).

2.4 Studien an isolierten und kultivierten Langerhans-Inseln

2.4.1 Präparation von Langerhans-Inseln

Die Tiere wurden zunächst mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (2 %) betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Der Bauchbereich wurde mit 70 % Ethanol besprüht und die Maus fixiert. Mit einer Schere und einer Hakenpinzette wurde das Fell vom Abdomen gelöst und mit einem Längsschnitt die Bauchdecke geöffnet. Ohne die Leber zu verletzen wurden die Leberlappen nach oben geklappt, um den Gallengang (Ductus choledochus) freizulegen. Dieser wurde mit einer Arterienklemme nahe bei seiner Mündung in die Leber abgeklemmt. Außerdem wurde das Duodenum links und rechts nahe der Papilla duodeni, der Mündung des Gallenganges in den Zwölffingerdarm, abgeklemmt. Die weiteren Schritte erfolgten bei etwa 20facher Vergrößerung unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena) mit Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Schott, Mainz). Mittels einer 30 G Kanüle (Sterican®, G 30 x 1/2" / ø 0,30 x 12 mm, gelb, B. Braun AG, Melsungen) wurden 2 ml einer eisgekühlten Collagenase P-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit einer Konzentration von 2 mg/ml in A + AB-Lösung (135 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂ wasserfrei, 1,28 mM CaCl₂, 3 mM Glucose, 10 mM Hepes, 0,1 % BSA, 1 % (v/v) Pen/Strep (final: 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), pH 7,4) durch den Ductus pancreaticus langsam in das Pankreas injiziert. Das so perfundierte Pankreasgewebe wurde vorsichtig von Darm, Magen und Milz entfernt und in ein vorgekühltes 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte der Verdau des Pankreas durch 6-minütige Inkubation in einem 37 °C warmen Wasserbad. Zwischendurch wurde das Röhrchen alle zwei Minuten kurz gevortext. Durch Zugabe von etwa 10 ml eiskalter A + AB-Lösung wurde die Aktivität der Collagenase gestoppt. Die Suspension wurde kräftig geschüttelt und durch zweimaliges Zentrifugieren (30 g x 2 min bei RT, Heraeus® Multifuge 1 S-R, Thermo Fisher Scientific, Dreieich), Abnahme des Überstandes sowie Zugabe frischer Lösung gewaschen. Für die weiteren Schritte wurde die Mischung aus Inseln und Anteilen aus exokrinen

Pankreas in ein 100 ml Becherglas auf Eis überführt und mit A + AB-Lösung auf etwa 50 ml aufgefüllt. Je 5 ml der Zellsuspension wurden mit einer 5 ml Spritze in eine sterile Glaspetrischale unter dem Stereomikroskop gegeben und die enthaltenen Inseln (zwischen 80 - 300 Stück pro Maus) mittels einer 100 µl Pipette in eine zweite Petrischale mit frischer A + AB-Lösung überführt. Sollte aus den Inseln im Folgenden RNA isoliert werden, wurden diese zum Schutz vor RNase-Abbau in den weiteren Schritten in RNeasy Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) überführt und vor dem Wegfrieren über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Inseln mussten 2 - 3 mal in neue Glaspetrischalen passagiert werden, um sie so von den restlichen Gewebeteilchen zu befreien. Die gewonnen Inseln wurden anschließend entweder für Inkubationsexperimente in Kultur genommen, für RNA-Extraktion oder Bestimmung des zellulären cGMP-Gehalts wie im Folgenden beschrieben lysiert oder zu späteren Verwendung bei -80 °C weggefroren.

2.4.2 Kultivierung von Langerhans-Inseln

Zur Kultivierung endokriner Inseln wurden, wenn nicht anders angegeben, je 50 der frisch isolierten Inseln in 1,5 ml Röhren pipettiert und für 2.000 g x 2 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde unter der Sterilbank in je 500 µl vorgewärmtem RPMI-1640 GlutaMAX Supplement Medium (11 mM Glukose; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) inklusive 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert) und 1 % (v/v) Pen/Strep (final: 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) resuspendiert und in Zellkulturschalen mit vorgelegtem Medium ausplattiert. Für ein besseres Anhaften der Inseln wurden die Böden der Schalen 1 h im Brutschrank mit dem kollagenähnlichen Glykoprotein Laminin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) beschichtet. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre im Brutschrank (HeraCell 150, Heraeus, Hanau). Nach 2 - 3 Stunden waren die Inseln soweit adhärirt, dass weiteres Medium zugegeben werden konnte. Zur Regeneration der vom Isolationsvorgang gestressten Inseln wurden diese vor weiteren Experimenten über Nacht kultiviert oder sie konnten bis zu vier Tage bei regelmäßigem Mediumwechsel in Kultur gehalten werden.

2.4.3 Bestimmungen des intrazellulären cGMP-Gehalts in frisch isolierten oder inkubierten Langerhans-Inseln

Um die Expression und die Funktion des GC-A-Rezeptors zu untersuchen, wurde der zelluläre cGMP-Gehalt mit einem spezifischen Radioimmunassay (RIA) (CHEN *et al.* 2013) in frisch isolierten Inseln oder mit ANP (ChinaPeptides Co Ltd, Shanghai, China) bzw. 17β-Östradiol (E2; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) behandelten Inseln bestimmt. Für die Inkubation wurden je 35 Inseln wie in Abschnitt 2.4.2

beschrieben auf 24-Loch-Platten in Kultur genommen. Nach der Regenerationsphase über Nacht wurde das Medium abgenommen und die Inseln in RPMI-1640 Glutamaxx Supplement Medium mit 1 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Pen/Strep (final: 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) über 3 h im Brutschrank äquilibriert. Anschließend wurden die Inseln 30 min lang bei RT mit dem unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) in einer finalen Konzentration von 0,5 mM vorbehandelt. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch 15-minütige Inkubation ohne oder mit verschiedenen Konzentrationen von ANP oder E2 im Brutschrank. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von eiskaltem Ethanol (finale Konzentration 75 %, v/v) und die Platte über Nacht bei -80 °C weggefroren. Für die Bestimmung des cGMP-Gehaltes in frisch isolierten Inseln wurden je 35 wie in Abschnitt 2.4.1 präparierte Inseln mit eiskaltem Ethanol 75 % v/v lysiert und ebenfalls über Nacht bei -80 °C weggefroren. Am nächsten Tag wurde der Ethanol bei 56 °C im Wasserbad abgedampft. Das erhaltene Pellet wurde in 70 µl Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 6,0) aufgenommen. Die cGMP-Messung mittels RIA wurde dankenswerterweise von Frau Birgit Gaßner oder Frau Lisa Krebs (beide Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) übernommen. In diesem kompetitiven Assay konkurrieren Antigene aus der Probe (cGMP) mit einer bestimmten Menge radioaktiv markierter Antigene (¹²⁵Iod-cGMP) um die Bindungsstelle an einem cGMP-Antikörper. Der ausgebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird gefällt und die Radioaktivität des Präzipitats gemessen. Je höher die cGMP-Konzentration in der Probe ist, desto niedriger ist die gemessene Strahlungsintensität. Anhand von Standardkurven wird der Gehalt an cGMP in den einzelnen Proben gemessen und auf den Proteingehalt normiert (BROOKER *et al.* 1979).

2.4.4 Inkubation der kultivierten Langerhans-Inseln für Genexpressionsanalysen

Für Genexpressionsanalysen an kultivierten, endokrinen Inseln wurden diese wie in 2.4.2 beschrieben auf 24-Loch-Platten in Kultur genommen. Allerdings wurde hierbei Medium mit 5,5 mM Glukose eingesetzt, da bereits beschrieben wurde, dass höhere Glukose-Konzentrationen die Genexpression beeinflussen können (GILL *et al.* 2011). Um diese Konzentration zu erreichen, wurde RPMI-1640 Glutamaxx Supplement Medium (11 mM Glukose) mit RPMI-1640 Medium ohne Glukose (beide Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) 1:1 gemischt und mit 10 % (v/v) FCS (HI) und 1 % (v/v) Pen/Strep (final: 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) versetzt. Nach Regeneration von circa 12 h wurde den Inseln über 24 h Medium mit nur 1 % (v/v) FCS (HI) zugegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und es folgte die Inkubation mit ANP, E2 oder beidem über 24 h in verschiedenen Konzentrationen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Hormone in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM eingesetzt. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Inseln wie in 2.5.2.1 beschrieben mit Trizol lysiert sowie die RNA isoliert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Genotypisierung der Versuchstiere anhand von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien und Gewebe

Alle Tiere wurden im Alter von 3 Wochen mittels genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien und Gewebe sowie nachfolgender PCR genotypisiert. Wie bereits erwähnt, finden sich unter den Nachkommen GC-A^{flox/flox}, β GC-A KO- sowie Tiere mit ektopischer GC-A-Deletion (im nachfolgenden als „KO“ bezeichnet). Für die Genotypisierungs-PCR wurden spezifische Primer für den Nachweis des Cre-Transgens eingesetzt (Primer Cre800/Cre1200) (HOLTWICK *et al.* 2002) außerdem Primer für den Nachweis des geflochtenen GC-A-Allels (MK115/MK116) und solche, welche nur ein Produkt („deletiertes GC-A-Allel“) amplifizieren, wenn das geflochte GC-A-Gen zwischen den loxP-Sequenzen deletiert wurde (Primer MK116/MK117) (SKRYABIN *et al.* 2004).

2.5.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Gewebe

Die DNA-Isolation aus den Schwanzspitzenbiopsien der Mäuse erfolgte mit der Phenol/Chloroform-Extraktionsmethode. Außerdem wurde von Frau Dr. Franziska Werner und Frau Lisa Krebs genomische DNA aus weißem Fettgewebe, Skelettmuskel, isolierten Inseln und Herzen isoliert. Die Gewebeproben wurden dazu zunächst mit 500 μ l Verdau-Puffer (100 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % (w/v) SDS, PCR-H₂O) unter Zugabe von 5 μ l Proteinase K (final 20 mg/ml) im Thermomixer 4 h lang bei 55 °C verdaut. Zu dem Verdau wurden 700 μ l Phenol pipettiert und die Ansätze bei 13.000 x g, 5 min, RT zentrifugiert. Zu der oberen Phase mit der genomischen DNA wurden 700 μ l Chloroform gegeben und wiederum bei 13.000 x g, 5 min, RT zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand zu 500 μ l Isopropanol pipettiert, gemischt und für 13.000 g x 5 min, bei RT zentrifugiert. Der Isopropanol wurde vollständig abgenommen und das Pellet über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurde die DNA in 50 μ l PCR-Wasser gelöst, die Konzentration am SimpliNano-Spektralphotometer (siehe 2.5.1.2) bestimmt und die Proben bei 4 °C gelagert.

2.5.1.2 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration am SimpliNano

Für die Genotypisierung der Mäuse sollten einheitlich 200 ng genomische DNA in der jeweiligen PCR-Reaktion eingesetzt werden. Zudem sollte für Analysen mittels qRT-PCR eine einheitliche Menge RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde die Konzentration sowie die Reinheit der aus den Inseln oder Gewebe isolierten RNA bestimmt. Die Konzentrationsmessung erfolgte mittels Photometrie an

einem Spektralphotometer (SimpliNano, Biochrom, Cambridge, UK) durch Auswahl des entsprechenden Programmes für DNA bzw. RNA. Je 2 µl Probe wurden auf den Detektor pipettiert und die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Außerdem ermittelt das Photometer eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm. Der Quotient der optischen Dichte OD260/OD280 sollte zwischen 1,6 und 2,2 liegen, um eine Verunreinigung mit Proteinen möglichst auszuschließen.

2.5.1.3 PCR und DNA-Gelelektrophorese

Für die PCR-Analysen wurde je ein 25 µl Reaktions-Ansatz mit 200 ng genomischer DNA sowie den spezifischen Primern (1,2 µM final) hergestellt und mit dem entsprechenden PCR-Programm im ThermoCycler (T1 Thermocycler, Biometra, Göttingen) amplifiziert. Die PCR-Analysen zum Nachweis von RIPCre (Cre-PCR), dem deletierten GC-A-Allel (KO-PCR) und dem geflochtenen GC-A-Allel (Flox-PCR) mittels der genomischen DNA aus weißem Fettgewebe, Skelettmuskel, Inseln und Herzen wurden dankenswerterweise von Frau Dr. Franziska Werner und Frau Lisa Krebs übernommen. Zusätzlich wurde hier mit der Kontroll-PCR die Integrität der DNA überprüft.

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
H ₂ O, PCR-Qualität	9,16 µl
RedMastermix (2X) Taq PCR Mastermix (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm)	12,5 µl
Primer FW (30 µM)	0,67 µl
Primer RV (30 µM)	0,67 µl
DNA (200 ng)	2 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tab. 1: Verwendete Primer für die Genotypisierung

Bezeichnung	Primer	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge
Cre-PCR	Cre800 (FW)	gctgccacgaccaagtgacagcaatg	ca. 400 bp
	Cre1200 (RV)	gtagttattcggatcatcagctacac	
KO-PCR	MK116 (FW)	atcagagaataaccagccagag	ca. 700 bp
	MK117 (RV)	gcatgtagttttagtctcatac	
Flox-PCR	MK115 (FW)	tcctgtctcccgtgaccttc	343 bp
	MK116 (RV)	atcagagaataaccagccagag	
Kontroll-PCR	TRPA_D (FW)	gaccaccaggaagtcccttttatg	210 bp
	TRPA_R (RV)	aataagctgcccaaaggtcaggac	

PCR-Programme:

Cre-PCR / Kontroll-PCR			
Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	94 °C	2 min	Denaturierung
35	94 °C	30 s	Denaturierung
	63 °C	30 s	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
1	72 °C	3 min	Finale Elongation
1	4 °C		Pause

KO-PCR			
Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	94 °C	3 min	Denaturierung
40	94 °C	15 s	Denaturierung
	56 °C	15 s	Annealing
	72 °C	45 s	Elongation
1	72 °C	7 min	Finale Elongation
1	4 °C		Pause

Flox-PCR			
Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	94 °C	2 min	Denaturierung
35	94 °C	30 s	Denaturierung
	56 °C	30 s	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
1	72 °C	3 min	Finale Elongation
1	4 °C		Pause

Die erhaltenen PCR-Produkte sowie Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden in einem 2 %-Agarose-Gel (w/v, in 1x TAE-Puffer: 2 M Tris, 0,25 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Spannung von 80 V über 45 min in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Als Größenmarker diente der GeneRuler 100 bp DNA-Ladder (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich). Um die Produkt-Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar zu machen und zu dokumentieren (KODAK® Gel-Logic-100, Rochester, New York, USA), wurde der Agarose-Gel-Ansatz vor dem Aufkochen mit dem dsDNA-bindenden Fluoreszenz-Farbstoff Nancy-520 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) versetzt. Anhand der entstandenen PCR-Produkte aus der genomischen DNA der Schwanzspitzenbiopsien wurden die Tiere wie folgt genotypisiert:

RIPCre	Deletiertes GC-A-Allel	Gefloxtes GC-A-Allel	Genotyp
-	-	+	GC-A ^{flx/flx}
+	-	+	β GC-A KO
-/+	+	-/+	KO

2.5.2 Untersuchung der Genexpression durch quantitative real-time PCR

2.5.2.1 Isolation von RNA aus Langerhans-Inseln oder Gewebe mit Trizol®

Die im Nachfolgenden beschriebene Isolation von RNA erfolgte aus jeweils 50 frisch gewonnenen oder kultivierten Inseln aus Inkubationsversuchen oder aus tiefgefrorenem Gewebe. Frisch isolierte Inseln wurden in möglichst wenig A+AB-Lösung oder in RNALater® (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich), welches den Abbau von RNA durch RNasen verhindert, in 1,5 ml Röhrchen überführt, für 2.000 g x 2 min bei RT pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und je 500 µl Trizol® (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) für 5 min bei RT zugegeben. Handelte es sich um kultivierte Inseln, wurde das Medium vorsichtig mit der Pipette abgesaugt, 500 µl Trizol® für 5 min bei RT in die Kulturschalen pipettiert und die Inseln anschließend mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und in 1,5 ml Röhrchen überführt. Sollte RNA aus Gewebe isoliert werden, wurde dieses zunächst auf Eis aufgetaut und ebenfalls 5 min lang bei RT in 500 µl Trizol® inkubiert. Die Lysate wurden danach entweder bei -80 °C in Trizol® gelagert oder es erfolgte direkt die weitere RNA Isolation. Als erstes wurden die Inseln bzw. das Gewebe mit einem Ultra-Turrax®-Dispergiergerät (T10 basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) zerkleinert und 5 min bei RT stehen gelassen. Es wurden je 100 µl Chloroform in die Röhrchen pipettiert, gemischt und weitere 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 13.000 rpm x 5min bei 4 °C. Die oberste der dabei entstandenen drei Phasen (etwa 200 µl) wurde abgenommen und in neue 1,5 ml Röhrchen gegeben. Zur Fällung der RNA wurden 140 µl Isopropanol in jedes Röhrchen pipettiert und diese leicht geschwenkt, wobei Schlieren zu sehen sein sollten. Bei der Isolation aus Inseln empfahl es sich, die Tubes anschließend mehrere Stunden oder über Nacht bei 4 °C stehen zu lassen, um die Ausbeute an RNA zu erhöhen. Im Anschluss daran folgten zwei Waschschrte mit 75 % Ethanol in RNase-freiem Wasser. Dazu wurden die Röhrchen zunächst für 13.000 rpm x 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden dann je 800 µl Ethanol 75 % zugegeben und für 13.000 rpm x 5 min bei 4 °C zentrifugiert sowie der Überstand abpipettiert. Nach dem zweiten Waschen wurden die Röhrchen für 15 - 20 min offen stehen gelassen, damit der Ethanol abdampfen und das Sediment trocknen konnte. Die RNA wurde zuletzt in 20 µl RNase-freiem H₂O gelöst und für 10 min bei 56 °C gehalten. Für die Konzentrationsmessung wurden je 2 µl abgenommen, die restliche RNA in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.2.2 cDNA-Synthese aus RNA für qRT-PCR

Für Untersuchungen der Genexpression mittels qRT-PCR musste die RNA aus Inseln oder Gewebe in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Es wurde mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) gearbeitet, wobei Oligo-(dT)₁₈-Primer für die selektive

Umschreibung von mRNA in „full-length“ cDNA eingesetzt wurden. Da die Ausbeute an RNA aus Inseln sehr gering war, wurden hier jeweils 100 ng RNA, aus Gewebe dagegen jeweils 1 µg RNA umgewandelt.

cDNA-Synthese:

Komponente	Volumen	Finale Mengen bzw. Konzentrationen
RNA	x µl	100 ng bzw. 1 µg
H ₂ O, PCR-Qualität	variabel	zusammen mit RNA max. 12 µl
Oligo-(dT) ₁₈ Primer, 50 pmol/µl	1 µl	2,5 µM
Transcriptor Reverse Transkriptase Reaktionspuffer, 5x conc.	4 µl	1x (8 mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl	0,5 µl	20 U
dNTP Mix, 10 mM	2 µl	1 mM
Transcriptor Reverse Transkriptase, 20 U/µl	0,5 µl	10 U
Gesamtvolumen	20 µl	

ThermoCycler-Programm:

Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	55 °C	30 min	Reverse Transkription
1	85 °C	5 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
1	4 °C		Pause

Die cDNAs wurden danach auf Eis gestellt, je nach Zielgen entsprechend verdünnt sowie aliquotiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.2.3 Quantitative real-time RT-PCR

Die quantitative (q) „real-time“ RT-PCR dient der Bestimmung der mRNA-Menge eines zu untersuchenden Ziel-Gens. Durch die Detektion DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenz-markierter Sonden kann über die Zunahme des Fluoreszenzsignals nach jeder Amplifikationsrunde die Menge des PCR-Produktes in Echtzeit beobachtet werden. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA und die zunehmende Menge an Ziel-DNA korreliert mit dem Anstieg der Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus. Aufgrund der geringen Spezifität dieses Verfahrens wird am Ende der qRT-PCR mittels einer Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der PCR-Produkte sowie das Auftreten von Primerdimeren und von DNA-Kontaminationen untersucht. Eine weitere, spezifischere Methode ist der Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden. Dabei handelt es sich um 5'-Nuklease Assays, in welchen einzelne, am 3'-Ende nicht verlängerbare Sonden während der PCR-Amplifikation aufgespalten werden, um den Anstieg einer spezifischen Ziel-DNA-Sequenz zu detektieren. Jede einzelne Sonde enthält zwei Fluoreszenz-Markierungen, einen Reporter und einen Quencher, welche nahe beieinander liegen. Ist die Sonde intakt und der Quencher-Farbstoff somit in räumlicher Nähe zu dem Reportermolekül, wird das Fluoreszenzsignal des Reporters durch FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Wird im Verlauf der PCR durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase die Sonde abgebaut, wird das Reporter-Fluoreszenzsignal nicht mehr länger unterdrückt und kann gemessen werden. Das Fluoreszenzsignal steigt mit zunehmender Menge des PCR-Produktes. Wird die Intensität des Signals gegen die PCR-Zykluszahl aufgetragen, erhält man einen typischen Kurvenverlauf mit einer Anfangsphase, einer exponentiellen Wachstumsphase (Log-Phase) sowie einer Plateauphase. In der Log-Phase dient der sogenannte C_T -Wert (cycle threshold) zur Bestimmung der Produktmenge. Dies ist die Zykluszahl, an welcher das Fluoreszenzsignal einen spezifischen Schwellenwert überschreitet und signifikant aus dem Hintergrundrauschen heraustritt. Der C_T -Wert ist indirekt proportional zur Expression des Zielgens, das bedeutet, je größer die Ausgangsmenge von dessen cDNA in der Probe ist, desto früher wird der Schwellenwert überschritten. Für jede Probe errechnet das jeweilige Geräteprogramm über verschiedene Rechenalgorithmen einen von der Menge an enthaltener cDNA abhängigen C_T -Wert. Zur Ermittlung der cDNA-Konzentration eines bestimmten C_T -wertes wurden Standardkurven aus Proben mit jeweils definierter DNA-Konzentration eingesetzt. Mit deren Hilfe wurden die ermittelten C_T -Werte in arbiträre Werte umgerechnet und mit unterschiedlicher Effizienz ablaufende Reaktionen miteinander verglichen. Zur relativen Quantifizierung wurden konstant exprimierte, nicht regulierte Referenzgene mitgemessen.

Die Genexpressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem LightCycler®96 (Roche Diagnostics, Mannheim) in 20 µl-Reaktionsansätzen auf 96-Well-Platten (LightCycler® 480 Multiwell

Plates 96, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt und die mit dem Geräteprogramm erhobenen Daten weiter in Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) ausgewertet. Alle Proben, Standardkurven sowie Negativ-Kontrollen wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Für die Erstellung der Standardkurven wurde für jedes Ziel-Gen cDNA mit hoher Ausgangskonzentration über mindestens vier bis sechs 10er-Potenzen verdünnt und amplifiziert. Die Standardreihen wurden in jedem Versuch für die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung durch die Gerätesoftware mitgeführt. Als Referenzgene dienten je nach Gewebe oder Versuchsansatz die zuvor ausgetesteten Gene β 2-Mikroglobulin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder Ribosomales Protein S12 (S12). Von den cDNA Proben wurden je 5 μ l unverdünnt oder verdünnt eingesetzt. Die Verdünnung wurde für jedes Ziel-Gen in Vorversuchen ermittelt und ist in Tabelle 1 angegeben. Für die Standardkurven wurden je 5 μ l cDNA unverdünnt eingesetzt. Die Genexpression von GC-A mit cDNA von isolierten Inseln sowie die Expression von ANP und BNP mit cDNA-Proben aus linken Herzventrikeln wurde mittels qRT-PCR untersucht, was dankenswerterweise von Frau Dr. Franziska Werner übernommen wurde. Die Expression der anderen Zielgene wurde in cDNA-Proben aus frisch isolierten oder kultivierten Langerhans-Inseln untersucht. Mithilfe der Universal Probe Library (UPL) (www.universalprobelibrary.com, Version 2.52) von Roche wurden Primer und Sonden für die spezifische Amplifizierung ausgewählt. Hier stehen 165 Hydrolyse-Sonden aus 8 - 9 Nukleotiden zur Auswahl, welche am 5'-Ende mit FAM und am 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül markiert sind. Für einige Targets standen gebrauchsfertige, validierte Assays (RealTime Ready Assays) zur Verfügung, welche Sequenz-spezifische Primer und die entsprechende UPL-Sonde beinhalten. Für GAPDH kam der Mouse GAPD Gene Assay zum Einsatz, bei welchem die UPL-Sonde am 5'-Ende mit LightCycler®Yellow555 markiert ist. Alternativ zu Sonden wurde bei den Targets ANP, BNP und S12 mit SYBR Green I als Fluoreszenz-Farbstoff gearbeitet. Alle Angaben zu Primern, Sonden und Farbstoffen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle für die qRT-PCR verwendeten Reagenzien von Roche (Roche Diagnostics, Mannheim) bezogen.

qRT-PCR mit UPL-Sonden (FAM):

Komponente	Volumen
cDNA	5 µl
Sonde	0,4 µl
Primer forward	0,2 µl
Primer reverse	0,2 µl
FastStart Essential DNA Probes Master, 2x	10 µl
H ₂ O, PCR-Qualität	4,2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

qRT-PCR mit RealTime Ready Assay (FAM):

Komponente	Volumen
cDNA	5 µl
Realtime Ready Assay, 20x	1 µl
FastStart Essential DNA Probes Master, 2x	10µl
H ₂ O, PCR-Qualität	4 µl
Gesamtvolumen	20 µl

qRT-PCR mit SYBR Green I:

Komponente	Volumen
cDNA	5 µl
Primer forward	0,2 µl
Primer reverse	0,2 µl
FastStart Essential DNA Green Master, 2x	10 µl
H ₂ O, PCR-Qualität	4,6 µl
Gesamtvolumen	20 µl

qRT-PCR mit Yellow555 (GAPD Gene Assay):

Komponente	Volumen
cDNA	5 μ l
Sonde GAPDH	0,4 μ l
Primermix GAPDH	0,4 μ l
FastStart Essential DNA Green Master, 2x	10 μ l
H ₂ O, PCR-Qualität	4,2 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

LightCycler-Programme:

qRT-PCR mit FAM bzw. Yellow555			
Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	95 °C	10 min	Prä-Inkubation
65	95 °C	10 s	Denaturierung
	60 °C	30 s	Annealing
	72 °C	1 s	Elongation
1	40 °C	30 s	Kühlung
1	4 °C		Pause

qRT-PCR mit Sybr Green I			
Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	95 °C	10 min	Prä-Inkubation
55 (45 bei ANP)	95 °C	10 s	Denaturierung
	60 °C (53 °C)	10 s (30 s)	Annealing
	72 °C	10 s (30 s)	Elongation
1	95 °C	10 s	Schmelzkurve
	65 °C	1 min	
	97 °C	1 s	
1	40 °C	30 s	Kühlung
1	4 °C		Pause

Tab. 2: Verwendete Primer bzw. Sonden für qRT-PCR

Gen	Name	Primersequenz (5'-3') oder Assay ID	Sonde	cDNA (Verd.)	Farbstoff
B2m	β 2 Mikroglobulin	Assay ID 301298	-	5 μ l (1:5)	FAM
Ccnd2	CyclinD2	FW: gctgtgcatttacaccgaca RV: acactaccagttcccactcca	#45	5 μ l (1:2)	FAM
GAPDH	Glycerinaldehyd -3-phosphat- Dehydrogenase	Assay ID 05046211001	-	5 μ l (1:10)	Yellow555
Gsk3b	Glykogensyntha se-Kinase 3 beta	Assay ID 300746	-	5 μ l (1)	FAM
MKI67	Ki-67	FW: agggtactcgtggaaccaa RV: ttaacttcttggtcatacaatgtc	#88	5 μ l (1:2)	FAM
NPPA	ANP	FW: gtacagtgcggtgtccaaca RV: gctcaagcagaatcgactgc	-	5 μ l (1:10)	SYBR Green
NPPB	BNP	FW: aagctgctggagctgataga RV: gttacagccaacgactgac	-	5 μ l (1:10)	SYBR Green
NPR1	GC-A	Assay ID 315333	-	5 μ l (1:10)	FAM
Pdx1	Pancreatic and Duodenal Homeobox 1	Assay ID 314873	-	5 μ l (1:2)	FAM
S12	Ribosomales Protein S12	FW: gaagctgccaaggccttaga RV: aactgcaaccaaccaccttc	-	5 μ l (1:10)	SYBR Green
Ucp2	Uncoupling Protein 2	Assay ID 310488	-	5 μ l (1)	FAM

2.5.3 Genexpressionsanalyse mit dem RT² Profiler® PCR Array Mouse Diabetes

2.5.3.1 Isolation von RNA aus Langerhans-Inseln mit dem RNeasy® Micro Kit

Für nachfolgende Expressionsanalysen von 84 Genen mit dem RT² Profiler® PCR Array Mouse Diabetes (Cat. Nr. PAMM-023Z, Qiagen, Hilden) erfolgte die RNA-Isolation aus Langerhans-Inseln mit dem RNeasy® Micro Kit von Qiagen (Cat. Nr. 74004). Dazu wurden die Röhrchen mit je 50 Inseln in RNALater® auf Eis aufgetaut und diese mit dem etwa 1,5-fachen Volumen an PBS versetzt, da RNALater® sehr viskos ist. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 8.000 rpm x 2 min bei 4 °C und das Verwerfen des Überstandes. Das Pellet wurde in je 350 µl Lysepuffer resuspendiert. Die nachfolgenden Schritte Fällung, Reinigung und Wiederaufnahme der RNA in RNase-freiem H₂O erfolgten genau nach Anweisungen des Herstellers. Außerdem wurde ein DNase-Verdau der Proben nach Herstellerangaben durchgeführt, um eine Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA auszuschließen. Die Ausbeute betrug 12 µl RNA mit einer durchschnittlichen Konzentration von 24,4 ng/µl und einer Reinheit zwischen 1,77 und 2,01. Bis zur Umschreibung in cDNA wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.5.3.2 cDNA-Synthese aus RNA für RT² Profiler® PCR Array

Für die Genexpressionsanalyse mit dem RT² Profiler® PCR Array Mouse Diabetes wurde die mit dem RNeasy® Micro Kit isolierte RNA, wie vom Hersteller empfohlen, mit dem RT² PreAMP cDNA Synthesis Kit (Cat. Nr. 330451, Qiagen) umgeschrieben und diese durch den RT² PreAMP Pathway Primer Mix Mouse Diabetes (Cat. Nr. PBM-023Z, Qiagen) genspezifisch für den Array präamplifiziert. Es wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet und je Probe 100 ng RNA umgeschrieben.

1) cDNA Synthese:

- Eliminierung genomischer DNA

Komponente	Volumen
RNA	100 ng
H ₂ O, RNase-frei	variabel
Puffer „GE“	2 µl
Gesamtvolumen	10 µl

ThermoCycler-Programm:

Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	42 °C	5 min	Eliminierung genomischer DNA
1	4 °C		Pause

- Reverse Transkription

Je 10 µl Reverse Transkriptions-Mix zu den 10 µl Eliminations-Mix pipettieren.

ThermoCycler-Programm:

Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	2 °C	30 min	Reverse Transkription
1	95 °C	5 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
1	4 °C		Pause

2) Präamplifizierung:

Komponente	Volumen (für 1 Ansatz)
RT ² PreAMP PCR Mastermix	12,5 µl
RT ² PreAMP Pathway Primer Mix	7,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Je 20 µl Präamplifikations-Mix zu je 5 µl cDNA in einem 0,2 ml Tube pipettieren.

ThermoCycler-Programm:

Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	95 °C	10 min	Aktivierung HotStart DNA Taq Polymerase
12	95 °C	15 s	Denaturierung
	60 °C	2 min	Primer-Anlagerung und Elongation
1	4 °C		Pause

2 µl Side Reaction Reducer zu jeder Probe pipettieren.

ThermoCycler-Programm:

Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	37 °C	15 min	Inkubation
1	95 °C	5 min	Inaktivierung der Reaktion
1	4 °C		Pause

Sofort 84 µl RNase-freies H₂O in jede Probe pipettieren, auf Eis stellen.

Entweder wurde anschließend mit der RT-PCR fortgefahren oder die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert.

2.5.3.3 RT² Profiler[®] PCR Array

Die 96-Well-Platten dieses Array sind mit spezifischen, SYBR-Green-optimierten Primer-Assays für 84 Diabetes-Gene sowie fünf Housekeeping Gene beschichtet. Desweiteren sind Kontrollen für Verunreinigung mit genomischer DNA, die reverse Transkription sowie die positive PCR enthalten. Es wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet und dabei das Format F für den Roche[®] LightCycler[®] 480 (96-well block) angewendet.

qRT-PCR:

Komponente	Volumen
2x RT ² SYBR Green Mastermix	1275 µl
Präamplifizierte cDNA	102 µl
H ₂ O, RNase-frei	1173 µl
Gesamtvolumen	2550 µl

Je 25 µl des PCR-Ansatzes in jedes Well des Arrays pipettieren und die Platte mit Folie abdecken.

LightCycler-Programm:

Zyklen	Temp.	Zeit	Programmschritt
1	95 °C	10 min	Aktivierung HotStart DNA Taq Polymerase
45	95 °C	15 s	Denaturierung
	60 °C	1 min	Primer-Anlagerung und Elongation
1	60 °C	15 s	Schmelzkurve
	95 °C	1 s	

Mittels der im Internet zur Verfügung gestellten Software RT² Profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5 von Qiagen (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) wurden die erhobenen Daten mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet.

2.6 Western Blot

2.6.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Für die Untersuchung der Translokation des Glukosetransporter Typ 4 (GLUT-4) im Skelettmuskel, speziell im Zwillingswadenmuskel (Musculus Gastrocnemius), wurde bei der Lyse der Gewebe die Plasmamembran-Fraktion (PM) von der Post-Plasmamembran-Fraktion (PPM, enthält Membranen intrazellulärer Organellen) nach der Methode von Nishiumi und Ashida (2007) getrennt. Das tiefgefrorene Gewebe wurde zunächst unter Zugabe von 50 μ l Puffer A (50 mM Tris pH 8, 0,5 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 % (v/v) Nonidet-P40 (NP-40), 50x Protease-Inhibitoren, 10x Phosphatase-Inhibitoren, ddH₂O) im Mikro-Dismembrator (Sartorius, Göttingen) bei 1.800 rpm pulverisiert, das Pulver in ein 1,5 ml Röhrchen übertragen und bis zur weiteren Lyse in flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Die dabei verwendeten Teflon-Gefäße und Metallkugeln wurden vor Verwendung in flüssigem Stickstoff gekühlt. Zu dem Pulver wurde je nach Menge 50 - 100 μ l Puffer zugegeben und gut gemischt. Das Lysat wurde anschließend für 1.000 g x 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Röhrchen pipettiert und auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde in Puffer A resuspendiert und 10 min unter Schütteln auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1.000 g x 10 min bei 4 °C. Das Pellet wurde in Puffer A, versetzt mit 1 % (v/v) Nonidet-P40, resuspendiert und 1 h unter Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 16.000 g x 20 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand, welcher die Plasmamembran-Fraktion darstellt, wurde abgenommen und aliquotiert bei

-80 °C weggefroren. Die Überstände aus den ersten beiden Zentrifugationsschritten wurden gesammelt und alles bei 16.000 x g, 20 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält die Post-Plasmamembran-Fraktion, welche ebenfalls aliquotiert bei -80 °C weggefroren wurde.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration der Gewebelysate wurde mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA) bestimmt (SMITH *et al.* 1985). Dieses Verfahren beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Proteine im alkalischen Milieu (Biuretreaktion). Die einwertigen Kupfer-Ionen bilden mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm am Photometer gemessen wird. Alle Proben und Standards wurden in Doppelbestimmungen durch Einsatz von kommerziellem BCA Reagenz A und 4%iger Kupersulfat-Lösung im Verhältnis 50:1 gemessen. Aus gelöstem bovinem Serumalbumin (BSA) bekannter Konzentration wurde für jede Messung eine Standardreihe eingesetzt. Als Leerwert diente der jeweils verwendete Lysepuffer. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wärmeschrank erfolgte die Messung am Plattenlesegerät (Wallac VICTOR² 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA).

2.6.3 Western Blot-Analyse

2.6.3.1 Nodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine in den Gewebelysaten nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamid-Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Die Proben wurden mit ddH₂O zur entsprechenden Auftragungsmenge verdünnt und mit 3x Laemmli-Probenpuffer (200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 6 % (w/v) SDS, 15 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,7) im Verhältnis 1:3 versetzt. Für eine optimale Auftrennung der Proben wurde ein diskontinuierliches Gelsystem aus einem Sammel- und einem Trenngel zwischen zwei Glasplatten eines Elektrophorese-Systems (PerfectBlue® Doppel-Gelsystem Twin L, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegossen. Als erstes wurde ein 10%iges Trenngel (7,9 ml ddH₂O, 6,7 ml Acrylamid (30 %), 5,0 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8), 200 μ l SDS (10 %), 200 μ l Ammoniumpersulfat (APS, 10 %), 8 μ l TEMED) eingefüllt und dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde der Isopropanol entfernt und ein 4%iges Sammelgel (6,8 ml ddH₂O, 1,7 ml Acrylamid (30 %), 1,25 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8), 100 μ l SDS (10 %), 100 μ l APS (10 %), 10 μ l TEMED) darauf gegossen. In dieses wurde zur Herstellung von Probenaschen ein Kamm gesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophorese-Kammer eingebaut und diese mit Lauf-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin,

0,1 % (w/v) SDS) befüllt. Anschließend wurde der Kamm gezogen und die Taschen mit den Proben und einem Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 - 170 kDa, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) beladen. Von jeder Fraktion wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für eine optimale Trennschärfe zu Beginn 20 min lang bei 100 V und anschließend für 90 min bei 150 V.

2.6.3.2 Semi-Dry-Transfer auf Nitrocellulose-Membran

Die im Trenngel aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren für 1 h bei 15 V (2 mA/cm²) in einer Blotting-Kammer (Biometra GmbH, Göttingen) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Aufbau hierfür bestand aus zwei Whatman-Papieren, der Membran, dem Gel und wiederum zwei Whatman-Papieren. Alles wurde zuvor kurz in Transfer-Puffer befeuchtet und in die Blotting-Apparatur gelegt. Der Transfer der Proteine wurde durch Ponceau S-Färbung überprüft und die Membran anschließend mit TBS-T-Puffer (19,8 mM Tris, 94,6 mM NaCl, pH 7,4, 0,1 % (v/v) Tween®20) wieder entfärbt.

2.6.3.3 Immunchemischer Nachweis mit peroxidasevermittelter Chemilumineszenz

Im Anschluss an den Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch 1 h Inkubation mit 5 % (m/v) Milchpulver/TBS-T bei RT geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min wurde die Membran über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln mit dem Primärantikörper in der in Tabelle 3 aufgeführten Verdünnung in 5 % Milchpulver/TBS-T inkubiert.

Tab. 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Western Blot-Analyse

Antigen	Bezeichnung	Firma	Cat. Nr.	Wirtsspezies	Verdünnung
GLUT-4	Anti-Glucose Transporter GLUT4	Abcam, Cambridge, UK	Ab654	Kaninchen, polyklonal	1:2.000
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Anti-Natrium Potassium ATPase [EP1845Y]	Abcam, Cambridge, UK	Ab76020	Kaninchen, monoklonal	1:50.000
Kaninchen-IgG	Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO	Dianova GmbH, Hamburg	111-035-144	Ziege, polyklonal	1:10.000

Am nächsten Tag wurde die Membran erneut dreimal je 5 min mit TBS-T gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt in 5 % Milchpulver/TBS-T, 1 h lang bei RT unter leichtem Schütteln behandelt. Nach einem erneuten dreiteiligen Waschschrift wurden die Zielproteine

mit ECL-Lösung (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific Fisher GmbH, Dreieich) sichtbar gemacht. Die Meerrettich-Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert hierbei die Oxidation des Luminols in der ECL-Lösung. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde mithilfe einer CCD-Kamera in Verbindung mit einer dunklen Kammer (FluorChem SP Chemilumineszenz Detektionssystem, Alpha Innotech, Santa Clara, USA) aufgenommen und mit der zugehörigen Software visualisiert sowie ausgewertet. Na^+/K^+ -ATPase diente als Ladekontrolle für die Plasma-Membran sowie zur Überprüfung der Zellfraktionierung. In Abbildung 7 ist der Western Blot-Nachweis von GLUT-4 und Na^+/K^+ -ATPase in Plasma- und Post-Plasmamembran-Fractionen aus Skelettmuskeln von GC-A^{flox/flox}-Mäusen zur Etablierung der Methode dargestellt. Die Tatsache, dass in der PPM-Fraktion Na^+/K^+ -ATPase nicht detektiert werden konnte, zeigt, dass die Trennung von Plasma- und Post-Plasmamembranen nach der Methode von Nishiumi und Ashida (2007) erfolgreich war und diese für nachfolgende Versuche eingesetzt werden konnte.

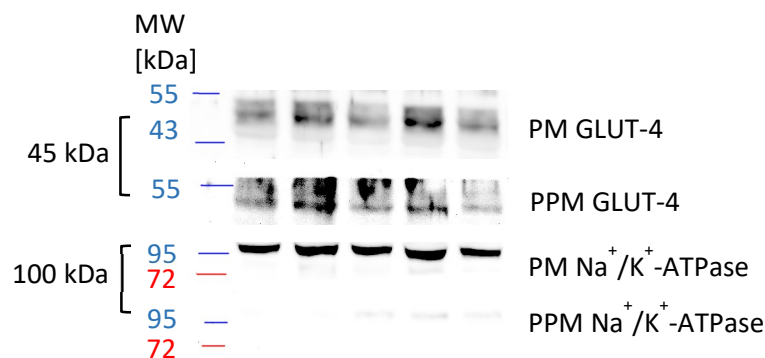


Abbildung 7: Western Blot-Nachweis von GLUT-4 und Na^+/K^+ -ATPase in Plasma- und Post-Plasmamembran-Fractionen aus Skelettmuskeln von GC-A^{flox/flox}-Mäusen zur Überprüfung der Zellfraktionierung (MW= Molekulargewicht; kDa=Kilo-Dalton; (P)PM=(Post-) Plasmamembran).

2.7 Histologie und Immunhistochemie

2.7.1 Gewebeaufbereitung

Die bei der Nekropsie entnommenen Pankreata wurden in Einbettkassetten über Nacht bei 4 °C in 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert und anschließend für die Paraffineinbettung zur Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hideo A. Baba, Institut für Pathologie Universitätsklinikum Essen, geschickt. Die Einbettung sowie das Herstellen der Paraffinschnitte übernahm dort dankenswerterweise Frau Dorothe Möllmann. Die Schnittebene verlief horizontal von Kopf nach Fuß des Gewebes und die Schnittdicke betrug 8 µm.

2.7.2 Immunhistochemie

Vor der Färbung wurden die Paraffinschnitte in Glasküvetten in den im Folgenden aufgeführten Lösungen rehydriert und entparaffiniert:

Lösung	Inkubationszeit
Xylol	10 min
Ethanol, 100 %	10 min
Ethanol, 90 %	5 min
Ethanol, 70 %	5 min
Ethanol, 50 %	5 min
VE Wasser	5 min

Im Anschluss daran wurde das Wasser von den Objektträgern durch Abklopfen auf Whatman-Papier entfernt und die Schnitte mit einem hydrophoben Stift (Dako Pen, Agilent, Waldbronn) umrandet. Die Schnitte wurden je nach Größe mit 500 - 800 μ l 0,3 % Triton-X/PBS-Lösung 30 min bei RT inkubiert und danach dreimal 5 min lang mit PBS gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Schnitte 1 h lang bei RT mit 5 % Normal Goat Serum (NGS) / PBS-Lösung behandelt. In der Zwischenzeit wurde eine Kammer mit feuchten Tüchern vorbereitet, damit die Präparate bei einer Inkubation über Nacht nicht austrocknen. Nach Abklopfen der Blockierungs-Lösung wurden die Objektträger in die Kammer gelegt. Auf die Schnitte wurde der Primäre Insulin-Antikörper, wie in Tabelle 3 angegeben, pipettiert und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Paraffinschnitte dreimal 5 min lang mit PBS gewaschen und in der feuchten Kammer abgedunkelt 1 h lang bei RT mit dem Sekundär-Antikörper versetzt. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe zu verhindern. Nach erneutem Waschen folgte ein weiterer Blockierungsschritt mit 5 % NGS/PBS für 1 h bei RT. Wiederum wurden die Schnitte gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primären Glukagon-Antikörper bzw. dem Primären GC-A-Antikörper in der Feuchtkammer gelagert. Die Schritte von Tag 2 wurden wiederholt und nach dem Abwaschen des zweiten spezifischen Sekundär-Antikörpers wurden die Schnitte einmal für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde auf die Schnitte jeweils 30 μ l DAPI-Eindeckmedium (Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI, Dianova GmbH, Hamburg) pipettiert, diese mit einem Deckglas (24 x 60 mm) bedeckt und bis zur weiteren Verwendung

bei 4 °C im Dunklen gelagert. Bei der Immunhistochemie der Paraffinschnitte der Weibchen (s. Abschnitt 3.5.2) entfiel der Nachweis von Glukagon. Diese Schnitte wurden nur für Insulin angefärbt und direkt nach dem Abwaschen des ersten spezifischen Sekundär-Antikörpers mit dem DAPI-Medium eingedeckt.

Tab. 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Immunhistochemie

Antigen	Bezeichnung	Quelle	Cat. Nr.	Wirtsspezies	Verdünnung
Insulin	Polyclonal Guinea Pig Anti-Insulin	Dako, Santa Clara, CA, US	#A0564	Meerschwein, polyklonal	1:1000 in 1,5 % NGS/PBS
GC-A	Anti-GC-A	AG Kuhn (SCHROTER <i>et al.</i> 2010)	-	Kaninchen, polyklonal	1:1000 in 1,5 % NGS/PBS
Glukagon	Glucagon monoclonal antibody	Sigma, Darmstadt	#G2654	Maus, monoklonal	1:2000 in 1,5 % NGS/PBS
Kaninchen-IgG	Cy3-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, US	#111-165-003	Ziege, polyklonal	1:200 in 1,5 % NGS/PBS
Meerschwein-IgG	Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig IgG (H+L)	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, US	#106-545-003	Ziege, polyklonal	1:200 in PBS
Maus-IgG	Cy TM 3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, US	#115-165-003	Ziege, polyklonal	1:200 in PBS

2.7.4 Mikroskopische und morphometrische Auswertung von Färbungen

Die Mikroskopie der gefärbten Pankreasschnitte erfolgte an dem Axiovert 200M Mikroskop von Zeiss (Carl Zeiss, Jena). Jede Langerhans-Insel wurde in 20-facher Vergrößerung mit der CCD-Kamera des Mikroskops in jeder der Fluoreszenz-Färbungen fotografiert und mit der computergestützten Analysesoftware (Olympus Europe, Hamburg) dokumentiert. Von jeder Maus wurden, sofern nicht anders angegeben, drei Schnitte mikroskopiert. Die morphometrische Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.48, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) oder mit dem Programm Islet Morphometry (programmiert von Dr. Sören Doose, Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Universität Würzburg, Version 3.4, Mathematica

Version 10.4.0, Computable Document Format (CDF) für Wolfram Player Pro (Wolfram Research Inc., Champaign, USA)). Bestimmt wurden in der HFD-Studie die ganze Fläche der Langerhans-Inseln, die Fläche der β -Zellen und die Anzahl der β -Zellen pro Insel. An den Pankreasschnitten der Weibchen wurden nur die Fläche der β -Zellen und die Anzahl der β -Zellen pro Inseln bestimmt. In Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurde für jeden Parameter zunächst ein Mittelwert aus den ausgewerteten Schnitten berechnet und anschließend über alle Tiere jeder Gruppe gemittelt, sowie die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet.

2.8 Datenanalyse und Statistik

Die Daten wurden mit Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) bzw. dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ausgewertet und grafisch dargestellt. Die Bearbeitung der Grafiken erfolgte mit Microsoft® PowerPoint 2013. Sofern nicht anders angegeben, werden in den Grafiken die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) abgebildet. Zusätzlich zu den Kurvenverläufen der oGTTs und ITTs wurde die jeweilige Fläche unter den Kurven, die Area under the curve (AUC), nach der Linearen Trapezregel berechnet: $AUC_{0-t_n} \approx \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n-1} (t_{i+1} - t_i)(C_i + C_{i+1})$. Zur statistischen Auswertung der Daten bei Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Bei Messungen derselben Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten bzw. vor und nach Behandlung wurde der gepaarte t-Test für die statistische Auswertung eingesetzt. Bei der Analyse von mehr als zwei Datensätzen wurde eine „Two-Way Analysis of Variance“ (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test durchgeführt. Für alle Tests wurde ein p-Wert von kleiner 0,05 als statistisch signifikant erachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Effiziente Deletion des GC-A-Rezeptors in pankreatischen β -Zellen

3.1.1 Etablierung der GC-A^{flox/flox};RIPCre^{tg}-Mauslinie

Um den Einfluss des endogenen NP/GC-A-Systems auf den Glukosehaushalt, die Insulinsekretion sowie die Vitalität pankreatischer β -Zellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein neues genetisches Mausmodell mit einer β -zellspezifischen Deletion des GC-A-Rezeptors generiert und charakterisiert. Hierfür wurden homozygot geflochte GC-A-Mäuse (GC-A^{flox/flox}) (HOLTWICK *et al.* 2002) mit rat insulin 2 promotor-Cre (RIPCre^{tg}) Mäusen verpaart. Die RIPCre^{tg}-Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase nur in den pankreatischen β -Zellen und wurden von Prof. Dr. Pedro L. Herrera (Medizinische Fakultät, Abteilung für genetische Medizin und Entwicklung, Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt (HERRERA 2000). Die Nachkommen wurden im Alter von drei Wochen mittels DNA aus Schwanzspitzenbiopsien und nachfolgender PCR genotypisiert. Für die Genotypisierungs-PCR wurden spezifische Primer für den Nachweis des Cre-Transgens eingesetzt (RIPCre, ca. 400 bp) (HOLTWICK *et al.* 2002). Zudem wurden Primer für das geflochte GC-A-Allel (343 bp) verwendet und solche, welche nur ein Produkt bilden, wenn das geflochte GC-A-Gen zwischen den loxP-Sequenzen deletiert wurde (deletiertes GC-A-Allel, ca. 800 bp) (SKRYABIN *et al.* 2004).

Abbildung 8 zeigt beispielhaft einen PCR-Nachweis zur Genotypisierung von sechs Tieren anhand genomischer DNA aus Schwanzspitzengewebe. Mäuse mit β -zellspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors wurden anhand der Cre-Bande identifiziert. Bei wenigen Tieren wurde ausschließlich, oder auch zusätzlich zur Cre-Bande und dem geflochten GC-A-Allel, ein Produkt des deletierten GC-A-Allels beobachtet, welches aufgrund der β -zellspezifischen Aktivität der RIPCre-Rekombinase nicht im Schwanzspitzengewebe auftreten dürfte. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die Cre-Rekombinase bei einzelnen Mäusen nicht ausschließlich in den β -Zellen exprimiert wird, sondern auch in anderen Zellen. Dieses Phänomen wurde bereits beschrieben und tritt vermutlich durch spontane ektopische Rekombinations-Aktivität der Cre-Rekombinase auf (ECKARDT *et al.* 2004; SKRYABIN *et al.* 2004). Ist die Bande des deletierten GC-A-Allels in Abwesenheit des Cre-Transgens zu beobachten, handelt es sich vermutlich um eine Deletion in den Keimzellen der Tiere. Sind sowohl die Cre-Bande als auch die Bande des deletierten GC-A-Allels zu erkennen, scheint die Rekombinase auch in Zellen des Schwanzspitzengewebes aktiv zu sein. Diese Tiere (bezeichnet mit „KO“) waren für die Zucht sowie die Versuche nicht geeignet und wurden nach der Genotypisierung geopfert.

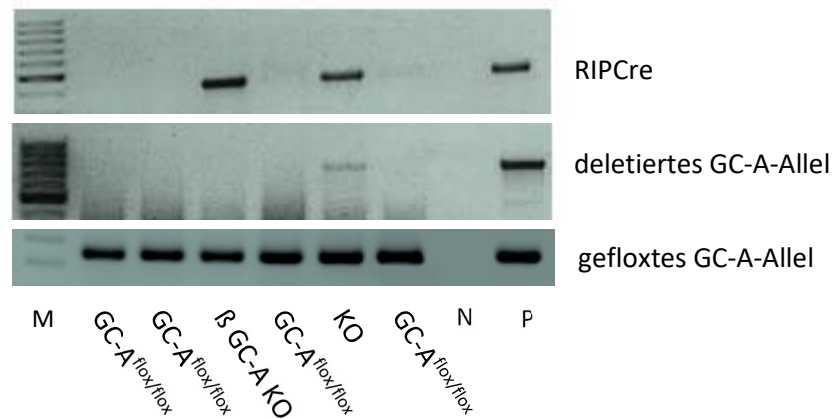


Abbildung 8: Repräsentative Darstellung eines PCR-Nachweises von RIPCre, dem deletierten GC-A-Allel sowie dem gefloxten GC-A-Allel zur Genotypisierung von sechs Mäusen anhand genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien. (M: Größenstandard; N: Negativ-Kontrolle; P: Positiv-Kontrolle).

Die PCR-Analyse von genomischer DNA aus weißem Fettgewebe, Skelettmuskel, pankreatischen endokrinen Inseln und Herzen von GC-A^{flox/flox} und GC-A^{flox/flox};RIPCre^{tg} Mäusen bewies außerdem, dass in Tieren ohne KO-Bande in der PCR mit Schwanzspitzen-DNA die Cre-vermittelte Deletion des gefloxten GC-A-Allels nur in den Inseln stattgefunden hat, da nur in diesen das PCR-Produkt für das deletierte GC-A-Allel nachzuweisen war (Abb. 9). In Folge bezeichneten wir diese Tiere als β GC-A KO- Mäuse. Das Produkt der internen Kontrolle zeigte, dass alle DNA-Proben intakt waren.

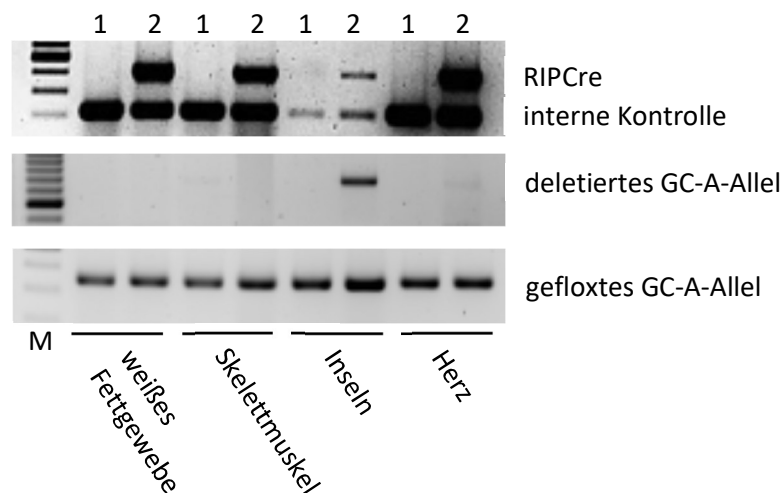


Abbildung 9: PCR zum Nachweis von RIPCre, dem deletierten GC-A-Allel, dem gefloxten GC-A-Allel sowie als interne Kontrolle anhand genomischer DNA aus weißem Fettgewebe, Skelettmuskeln, Inseln sowie Herzen von GC-A^{flox/flox}- (1) und β GC-A KO-Mäusen (2). (M: Größenstandard).

Die Genotypisierung alleine gab jedoch nur einen Hinweis auf die Deletion des GC-A-Rezeptors in β-Zellen. Schließlich zeigte sie lediglich an, ob das Cre-Transgen in den Inseln vorhanden und aktiv ist, nicht

in welchen Zelltypen die Rekombinase aktiv ist. Um die Zellspezifität, die Effizienz und die Auswirkungen der GC-A-Deletion näher zu analysieren, wurden ex vivo-Untersuchungen an isolierten Langerhans-Inseln und Pankreasschnitten sowie in vivo-Versuche kombiniert.

3.1.2 Verminderte Expression des GC-A-Rezeptors in Inseln von β GC-A KO-Mäusen

Um die Auswirkungen der Gendeletion zu untersuchen, wurde die GC-A mRNA-Expression in isolierten Inseln von Kontroll- und β GC-A KO-Mäusen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Expression war in den Inseln der β GC-A KO-Tiere signifikant reduziert (Abb. 10). Die mRNA-Expression von GC-A ist in den Inseln der β GC-A KO-Tiere nicht vollständig aufgehoben, da das gefloxt GC-A-Gen durch RIPCre nur in den β -Zellen ausgeschaltet wird, jedoch in anderen Zelltypen innerhalb der Langerhans-Inseln, wie in Endothelzellen, erhalten bleibt (KUHNS *et al.* 2009).

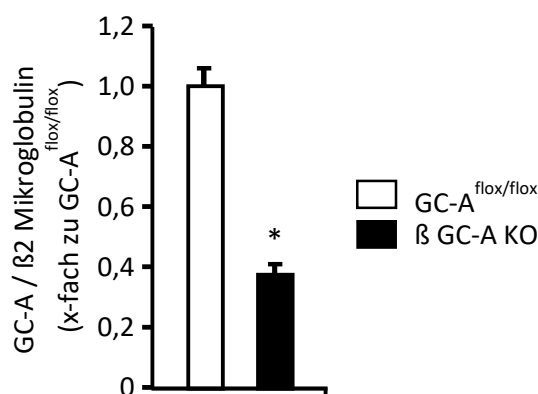


Abbildung 10: GC-A mRNA-Expression (normalisiert auf β 2 Mikroglobulin) in isolierten Inseln von GC-A $^{flox/flox}$ - und β GC-A KO-Mäusen (n=10-11 Mäuse pro Genotyp; $p < 0,05$; * vs. GC-A $^{flox/flox}$).

Außerdem wurde die Expression des GC-A-Rezeptors in Inseln mittels Immunhistochemie an Paraffinschnitten von Pankreata von Kontroll- und β GC-A KO-Tieren untersucht. GC-A-Immunreaktivität (rot) wurde in den Inseln der Kontroll-Tiere sowohl in den Insulin-enthaltenden β -Zellen (grün) als auch in den peripheren α -Zellen nachgewiesen (Abb. 11). In den Inseln der β GC-A KO-Tiere hingegen war die Immunreaktivität von GC-A in den β -Zellen kaum erkennbar. Hinter diesen sehr schwachen Signalen in den β -Zellen vermuteten wir eine unspezifische Reaktion des GC-A-Antikörpers. In den peripheren Inselzellen der β GC-A KO-Tiere war die GC-A-Immunreaktivität wie in den Kontroll-Tieren deutlich nachweisbar. Aufgrund deren Lokalisation handelt es sich hierbei vermutlich um pankreatische α -Zellen, welche bei murinen Langerhans-Inseln am äußeren Rand liegen (DOLENSEK *et al.* 2015).

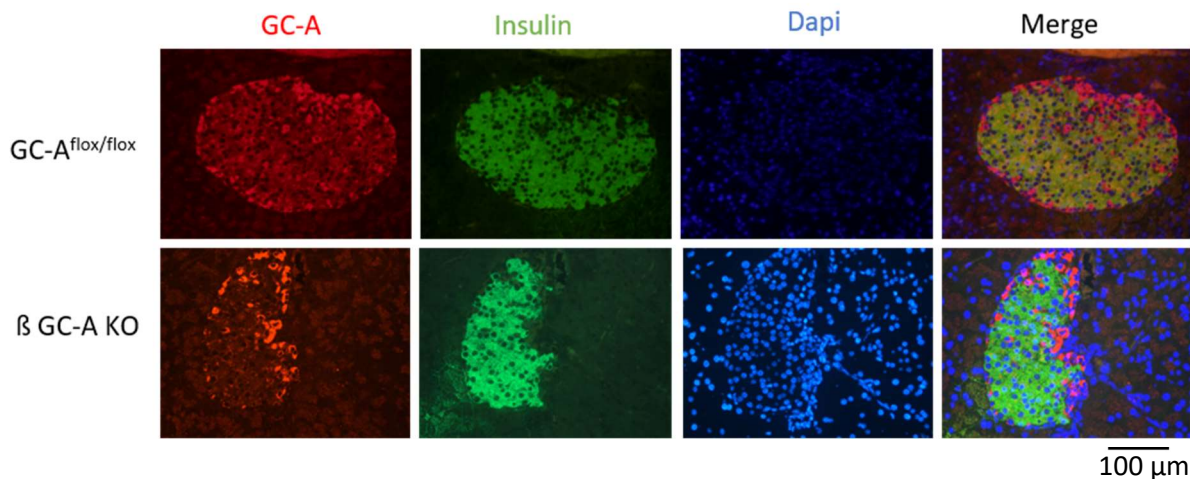


Abbildung 11: Repräsentative immunhistochemische Färbung von GC-A, Insulin und der Zellkerne (Dapi) anhand von Pankreas-Schnitten von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen.

3.1.3 Der stimulierende Effekt von ANP auf den zellulären cGMP-Gehalt isolierter Inseln ist an β GC-A KO-Mäusen abgeschwächt

Um die Signalfunktion des GC-A-Rezeptors zu untersuchen, wurde der Effekt von ANP auf den cGMP-Gehalt von Langerhans-Inseln bestimmt. Dazu wurden kultivierte Inseln aus GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Tieren über 15 Minuten ohne oder mit 1000 nM ANP inkubiert und der cGMP-Gehalt mittels RIA gemessen. Wie in Abbildung 12 dargestellt, zeigten die Inseln der Kontroll-Tiere nach ANP-Stimulation einen etwa siebenfach höheren cGMP-Gehalt als unter Kontrollbedingungen (Vehikel: $4,3 \pm 0,45$ fmol/Kulturschale; ANP: $30,5 \pm 1,45$ fmol/ Kulturschale). Dieser Effekt war an den Inseln der β GC-A KO-Mäuse zwar nicht aufgehoben, aber signifikant vermindert. Der verbleibende, etwa dreifache Anstieg des cGMP-Gehalts (Vehikel: $5,4 \pm 0,78$ fmol/ Kulturschale; ANP: $14,8 \pm 3,45$ fmol/Kulturschale) ist dadurch zu erklären, dass der GC-A-Rezeptor, wie bereits in Abschnitt 3.1.2 erwähnt, in anderen Zelltypen innerhalb der Langerhans-Inseln erhalten bleibt.

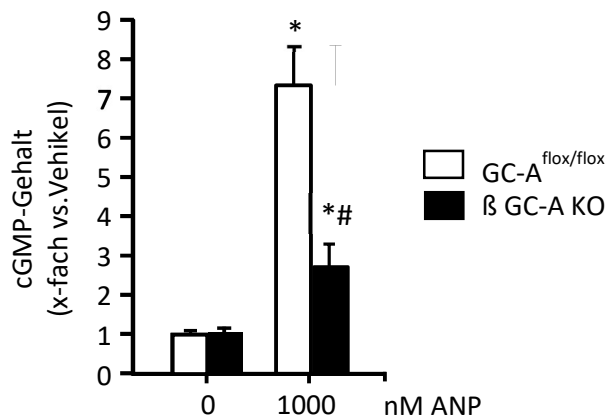


Abbildung 12: Effekte von 1000 nM ANP auf den cGMP-Gehalt von isolierten Langerhans-Inseln aus GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 15 Minuten Inkubation (n=4 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. Vehikel; # vs. GC-A^{flox/flox}).

3.1.4 Die akuten Effekte von ANP auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung sind an isolierten Langerhans-Inseln von β GC-A KO-Tieren aufgehoben

Desweiteren wurde an isolierten Langerhans-Inseln untersucht, inwiefern das ANP/GC-A-System die Insulinsekretion von pankreatischen β-Zellen beeinflusst. Da es sich hierbei um einen β-zellspezifischen Vorgang handelt, dienten diese Versuche als weiterer Nachweis für die Effizienz und Zellspezifität der GC-A-Deletion. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gisela Drews (Universität Tübingen) wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Dr. Sabrina Undank („Modulation der β-Zellfunktion durch ANP“ (UNDANK *et al.* 2017a) der Einfluss von ANP auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung untersucht. Bei einer Blutzuckerkonzentration über 5 mmol/l gelangen Glukosemoleküle über Glukosetransporter in die β-Zellen, wo sie durch Glykolyse verstoffwechselt werden. Das dabei entstehende ATP führt zum Schließen ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K_{ATP}) und daraus folgt eine Depolarisation der Zellmembran der β-Zellen. Diese wiederum bewirkt das Öffnen spannungsabhängiger L-Typ-Kalzium Kanäle und das Einströmen von Kalzium-Ionen (Ca²⁺) ins Zellinnere. Die erhöhte zytosolische Ca²⁺-Konzentration triggert die Verschmelzung insulinhaltiger Vesikel mit der Zellmembran und die Ausschüttung von Insulin. An isolierten Inseln aus GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Tieren wurden die Effekte von 10 nM ANP auf die Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP}-Kanäle, intrazelluläre Ca²⁺-Oszillationen und die Glukose-stimulierte Insulinsekretion untersucht. In Inseln von GC-A^{flox/flox}-Tieren senkte ANP unter substimulatorischen Glukosekonzentrationen von 0,5 mM die Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP}-Kanäle in den β-Zellen signifikant von 100 % auf 29 ± 11 % (repräsentative Darstellung der K_{ATP}-Einzelstrommessungen in Abb. 13A). Außerdem erhöhte ANP unter Schwellenbedingungen von 6 mM Glukose signifikant die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration

(repräsentative Darstellung von Ca^{2+} -Oszillationen gemessen mit der Fura-2-Methode in Abb. 13B). Ebenfalls unter 6 mM Glukose konnte ANP die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von β -Zellen aus GC-A^{fl^{ox}/fl^{ox}}-Mäusen signifikant erhöhen (Abb. 13C). Diese akuten Effekte von ANP waren in Inseln von β GC-A KO-Mäusen aufgehoben (Abb. 13A-C). Diese Ergebnisse zeigten zum einen, dass ANP über den GC-A-Rezeptor die Glukose-induzierte Insulinsekretion verbessert, zum anderen bewiesen sie die erfolgreiche Deletion des GC-A-Rezeptors in β -Zellen.

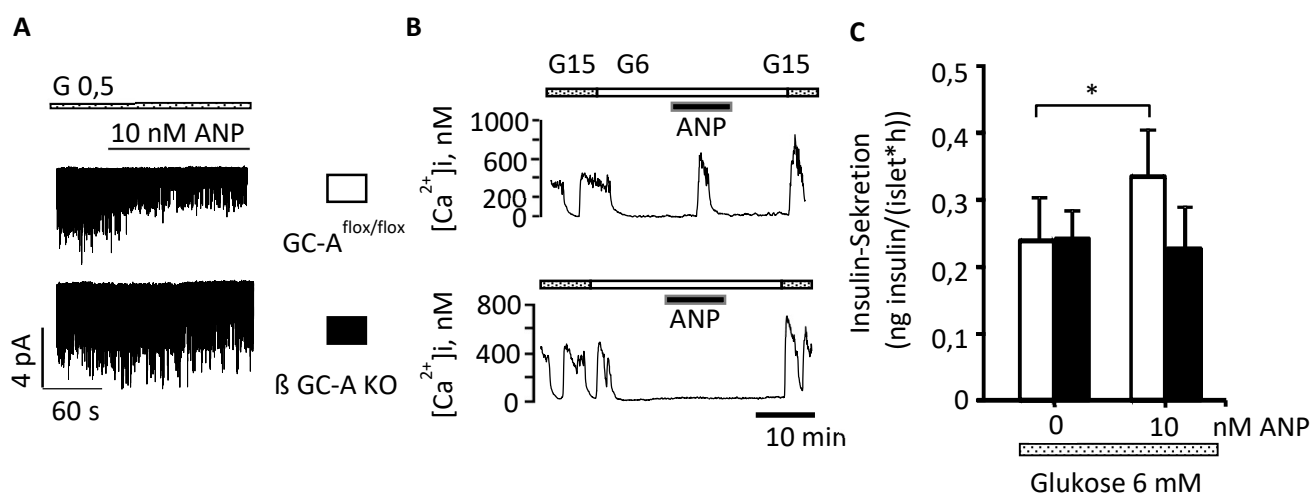


Abbildung 13 (UNDANK *et al.* 2017a): Effekte von 10 nM ANP auf (A) die Offenwahrscheinlichkeit von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen, (B) intrazelluläre Kalzium-Oszillationen und (C) die Insulin-Sekretion von isolierten Langerhans-Inseln aus GC-A^{fl^{ox}/fl^{ox}}- und β GC-A KO-Mäusen (n=4-6 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. Kontrolle; G= mM Glukose).

3.2 Ablation des NP/GC-A-Signalweges in murinen β -Zellen hat keinen Einfluss auf physiologische und metabolische Parameter unter basalen Bedingungen in vivo

3.2.1 Normaler arterieller Blutdruck und unverändertes Körpergewicht bei β GC-A KO-Tieren

Mäuse mit konventioneller, globaler Deletion des GC-A-Rezeptors haben viele systemische Veränderungen wie Bluthochdruck, Herzhypertrophie und erhöhten Sympathikustonus, welche indirekt die Insulin-Homöostase alterieren könnten (KUH *et al.* 2009). Um die β -zellspezifischen Effekte des NP/GC-A-Systems in vivo zu beobachten, wurden männliche und weibliche GC-A^{fl^{ox}/fl^{ox}}- und β GC-A KO-Tiere im Alter von etwa 2 Monaten untersucht. Anders als globale KO-Tiere zeigten weder die Männchen noch die Weibchen genotypabhängige Unterschiede im systolischen oder diastolischen Blutdruck (Abb. 14). Auch im Körpergewicht wurden keine Differenzen festgestellt (Abb. 15). Diese Daten unterstützen die Zellspezifität der GC-A-Deletion.

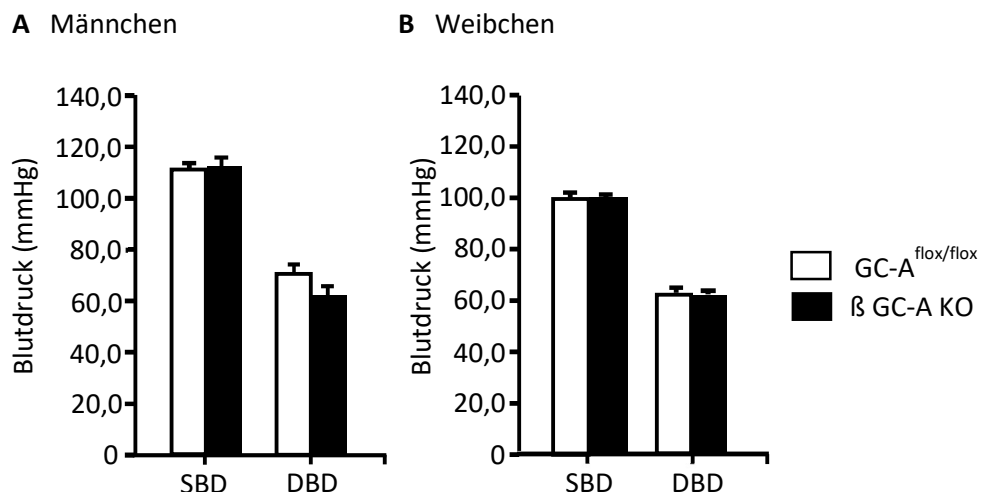


Abbildung 14: Systolischer (SBD) und diastolischer (DBD) Blutdruck von (A) männlichen und (B) weiblichen GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen im Alter von etwa 2 Monaten (n=4-8 Mäuse pro Genotyp).

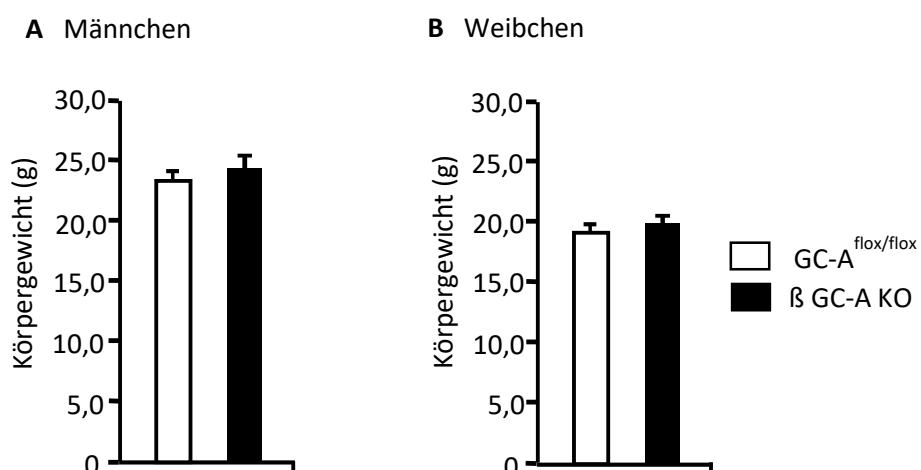


Abbildung 15: Körpergewicht von (A) männlichen und (B) weiblichen GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen im Alter von etwa 2 Monaten (n=8-10 Mäuse pro Genotyp).

3.2.2 Die basale Insulin/Glukose-Homöostase ist in β GC-A KO-Tieren nicht beeinträchtigt

Da Ropero et al. (2010) bereits zeigten, dass globale GC-A KO-Mäuse kleinere Langerhans-Inseln mit weniger β-Zellen sowie einen geringeren Insulin-Gehalt haben, wurde vermutet, dass die β-zellspezifischen GC-A KO-Tiere Veränderungen in der Glukose- und/oder Insulin-Homöostase aufweisen. Die basalen Blutzucker- und Insulinspiegel nach Fasten über Nacht waren jedoch ähnlich zu denen von Kontroll-Tieren (Abb. 16 und 17). Weibchen beider Genotype zeigten im Vergleich zu den Männchen niedrigere Blutdruckwerte, geringeres Körpergewicht und niedrigere basale

Blutzuckerspiegel. Diese Ergebnisse zeigen, dass die β GC-A KO-Tiere in diesem Alter unter normalen physiologischen Bedingungen entweder keine Defekte der Insulin/Glukosehomöostase aufweisen oder diese erfolgreich kompensieren können.

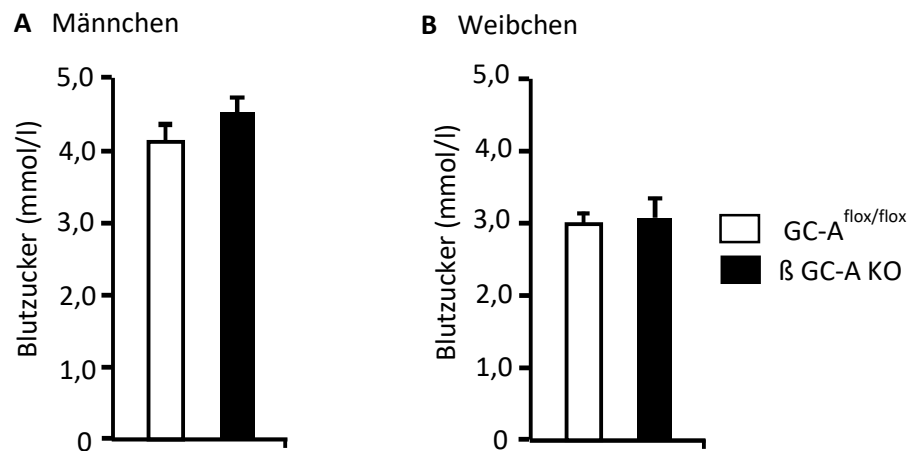


Abbildung 16: Basale Blutzuckerspiegel (nach Fasten über Nacht) von (A) männlichen und (B) weiblichen GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen im Alter von etwa 2 Monaten (n=8-10 Mäuse pro Genotyp).

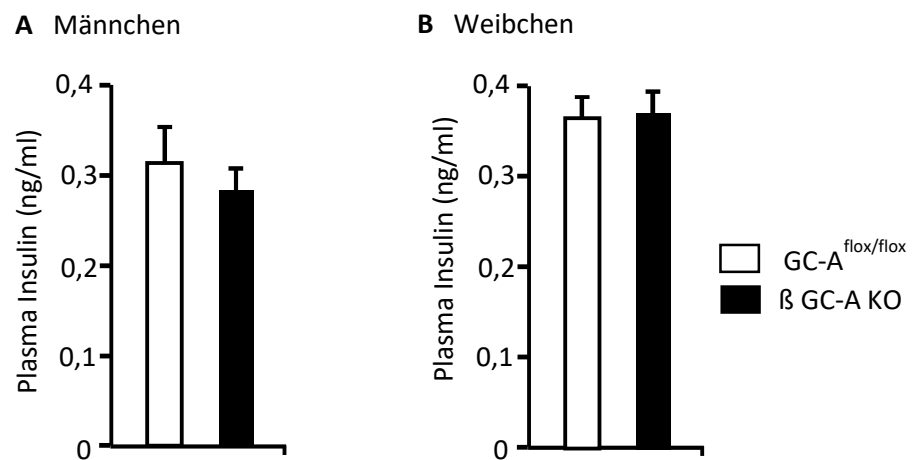


Abbildung 17: Basale Plasma-Insulinspiegel (nach Fasten über Nacht) von (A) männlichen und (B) weiblichen GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen im Alter von etwa 2 Monaten (n=8-10 Mäuse pro Genotyp).

3.3 Entgegengesetzte metabolische Effekte von akuter versus chronischer Applikation von synthetischen Natriuretischen Peptiden in vivo

3.3.1 Die akute Injektion einer hohen ANP-Dosis vermindert die Glukose-stimulierte Insulinsekretion sowie die Glukosetoleranz in männlichen Mäusen beider Genotype

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, beobachteten Uehlinger et al. 1986, dass die Infusion von synthetischem ANP bei gesunden Probanden die Insulinspiegel erhöht und die Blutzuckerwerte geringfügig senkt. Die in 3.1.4 beschriebene Stimulation der Insulinsekretion isolierter Inseln durch 10 nM ANP unterstützt die These, dass ANP die Insulinsekretion fördert (siehe Abb. 13, UNDANK *et al.* 2017). Um herauszufinden, ob solche akuten Anstiege der ANP-Spiegel die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen auch in vivo beeinflussen, wurden männliche Kontroll- und β GC-A KO-Mäuse mit exogenem, synthetischem ANP behandelt. Dazu erhielten über Nacht gefastete Tiere eine intraperitoneale Injektion von Vehikel (physiologische Kochsalzlösung) oder 1,5 μ g/g KGW ANP. 15 min später wurde ein oGTT mit begleitender Blutabnahme für die Bestimmung der basalen Insulinspiegel sowie der GSIS durchgeführt. Interessanterweise hatte die ANP-Gabe in den Kontroll-Tieren keinen Effekt auf die basalen Insulinspiegel, verringerte aber deutlich die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (Abb. 18A). Dies ging einher mit einer deutlich verschlechterten Glukosetoleranz (oGTT in Abb. 19A). Ähnliche Effekte wurden an den β GC-A KO-Mäusen beobachtet. Die ANP-Gabe hatte auch hier keinen Einfluss auf die basalen Insulinspiegel; die GSIS sowie die Glukosetoleranz waren leicht verschlechtert (Abb. 18B, 19B). Diese akuten, hemmenden Effekte von exogenem ANP auf die GSIS werden demnach nicht über den GC-A-Rezeptor der β -Zellen vermittelt.

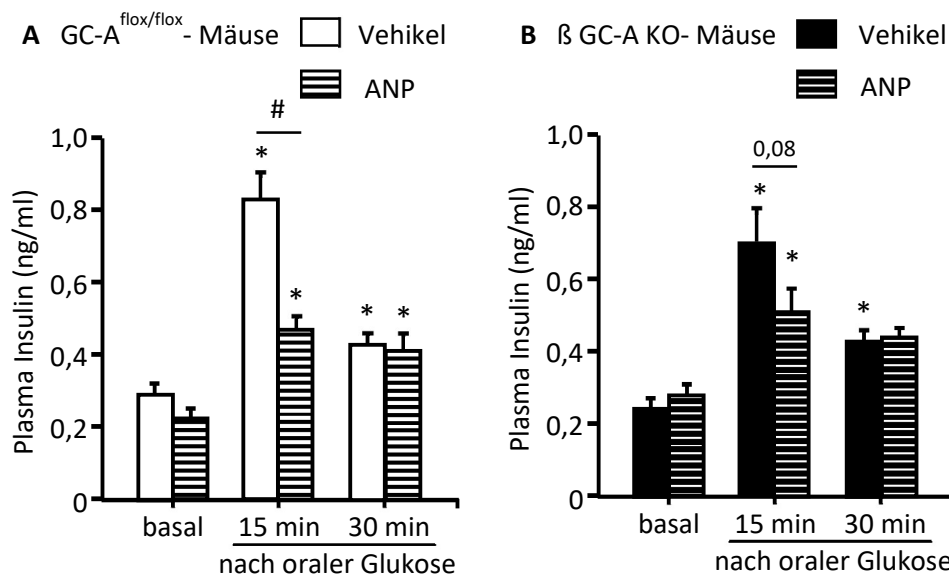


Abbildung 18: Basale Plasma-Insulinspiegel und Glukose-stimulierte Insulinsekretion von (A) GC-A^{flox/flox}- und (B) β GC-A KO-Mäusen 15 min nach akuter intraperitonealer Vehikel- oder ANP-Injektion (n=7-10 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. basal; # vs. Vehikel).

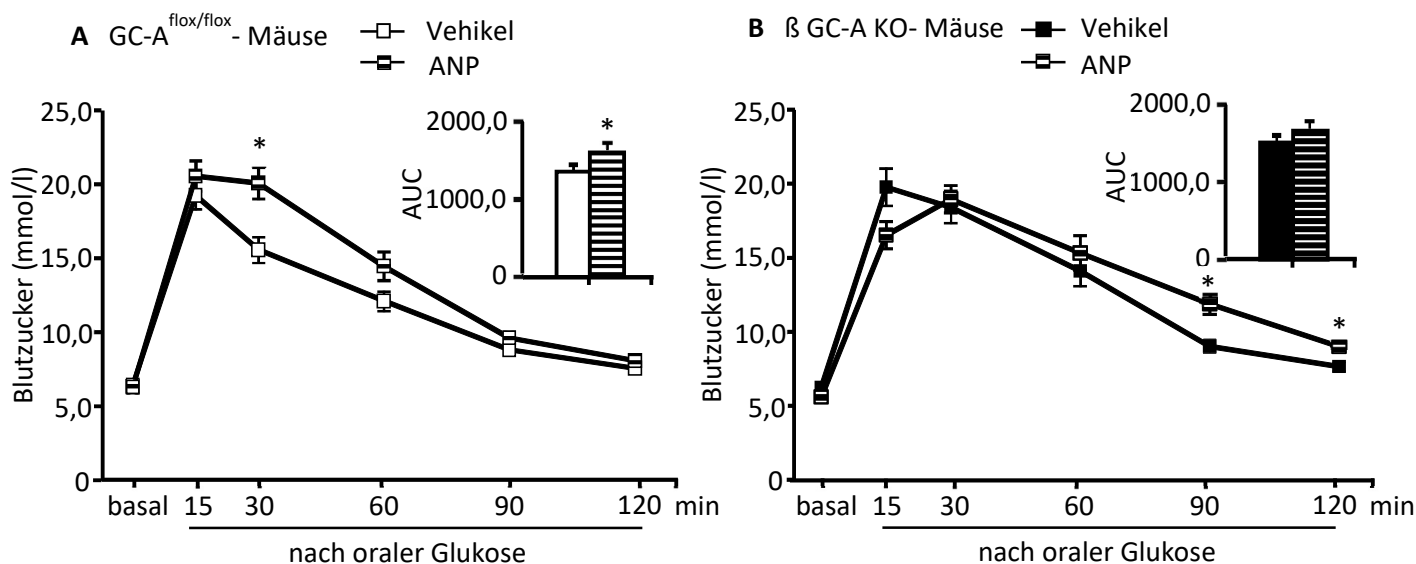


Abbildung 19: Orale Glukosetoleranz-Tests und korrespondierende AUCs von männlichen (A) GC-A^{flox/flox}- und (B) β GC-A KO- Mäusen 15 min nach akuter intraperitonealer Vehikel- oder ANP-Injektion (n=14 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. Vehikel).

3.3.2 Die chronische Infusion einer niedrigen BNP-Dosis verbessert die Glukose-stimulierte Insulinsekretion sowie die Glukosetoleranz in Kontroll-, nicht aber in β GC-A KO-Tieren

3.3.2.1 Die stimulierenden Effekte von chronisch-infundiertem, synthetischem BNP werden durch die Aktivierung des GC-A-Rezeptors der β-Zellen vermittelt

Um zu untersuchen, ob und wie längerfristig erhöhte Plasmakonzentrationen der Natriuretischen Peptide die β-Zellfunktion beeinflussen und ob diese Effekte direkt über den GC-A-Rezeptor von β-Zellen vermittelt werden, wurden Kontroll- und β GC-A KO-Mäuse über 7 Tage mit synthetischem BNP infundiert. BNP wurde für diese Versuche gewählt, da es stabiler ist als ANP und eine höhere Halbwertszeit im Plasma aufweist (BORDICCHIA *et al.* 2012; STAFFEL *et al.* 2017). Den Tieren wurden subkutan osmotische Minipumpen implantiert, welche 7 Tage lang BNP mit einer Rate von 2 ng/g KGW/h abgeben. Diese Konzentration führt nachgewiesenermaßen zu einer Verdoppelung der BNP-Plasmaspiegel (BORDICCHIA *et al.* 2012). Die Versuche wurden an weiblichen GC-A^{flox/flox}-Tieren im Alter von etwa 2 Monaten durchgeführt. In den Kontroll-Tieren führte die BNP-Infusion im Vergleich zur Vehikel-Behandlung zu signifikant erhöhten basalen Plasma-Insulinspiegeln sowie zu einer signifikant erhöhten GSIS 15 min nach oraler Glukosegabe (Abb. 20A). Orale Glukosetoleranz-Tests vor und nach Infusion zeigten, dass die BNP-Behandlung in den Kontroll-Tieren zu einer signifikant verbesserten Glukosetoleranz führt (im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Pumpenimplantation) (Abb. 21A). Die AUC, als Veranschaulichung für die Glukosetoleranz, war im Vergleich zu vorher um etwa 12 ± 4 % signifikant

verringert. Verglichen mit der Vehikel-Infusion war die AUC tendenziell um etwa $9 \pm 4\%$ vermindert. Die Untersuchungen wurden an weiblichen β GC-A KO-Tieren wiederholt. Hier hatte BNP keine Effekte auf die basalen Plasma-Insulinspiegel, die GSIS und die Glukosetoleranz (Abb. 20B und 21B). Diese in vivo-Versuche zeigten, dass die stimulierenden Effekte von chronisch-infundiertem, synthetischem BNP auf die basalen und Glukose-stimulierten Insulin-Plasmaspiegel über die Aktivierung des GC-A-Rezeptors der β -Zellen vermittelt werden.

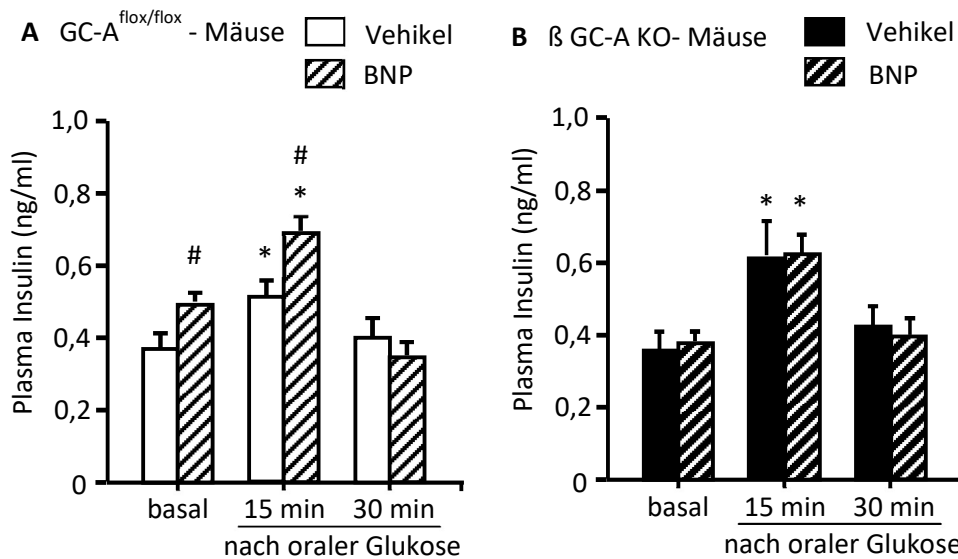


Abbildung 20: Basale Plasma-Insulinspiegel und Glukose-stimulierte Insulinsekretion von (A) GC-A^{flox/flox}- und (B) β GC-A KO- Mäusen nach 7-tägiger Vehikel- oder BNP-Infusion (n=5-6 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. basal; # vs. Vehikel).

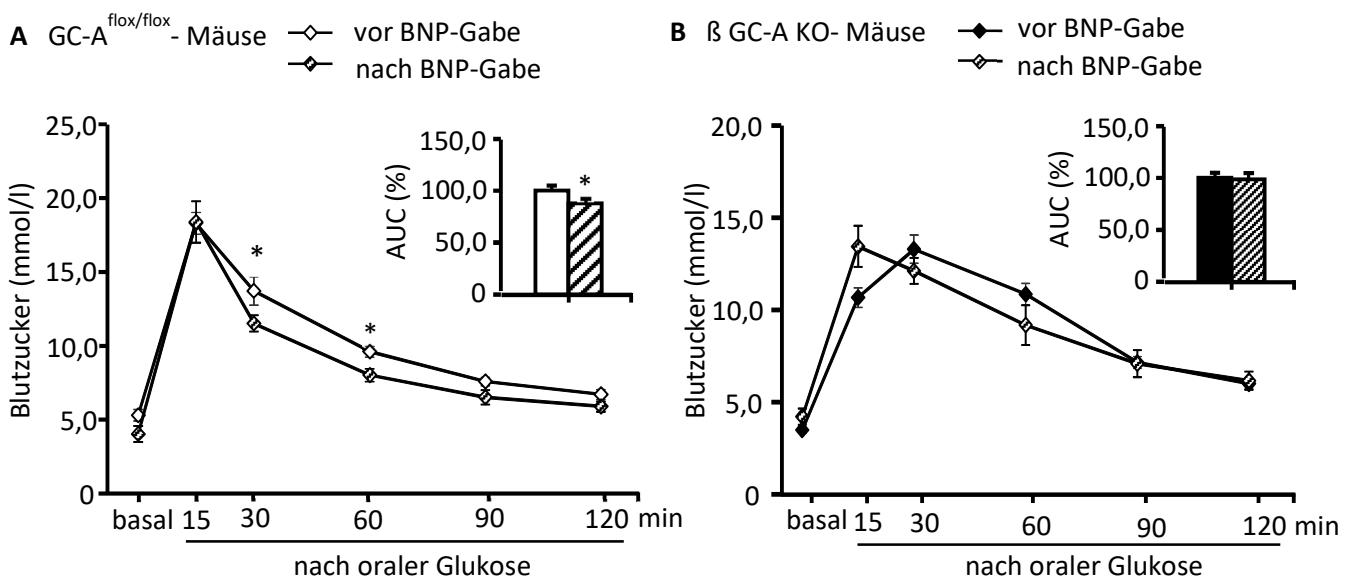


Abbildung 21: Orale Glukosetoleranz-Tests und korrespondierende AUCs (% zu vor BNP-Gabe) von (A) GC-A^{flox/flox}- und (B) β GC-A KO-Mäusen vor und nach 7-tägiger BNP-Infusion (n=5-6 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. vor BNP-Gabe).

Bei der Betrachtung der Körpergewichte vor und nach 7 Tagen Pumpenimplantation fiel zudem auf, dass die BNP-Infusion in den Kontroll-Tieren zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichts führte. Wie in Abbildung 22 zu erkennen, blieb dieser Effekt in den β GC-A KO-Tieren aus.

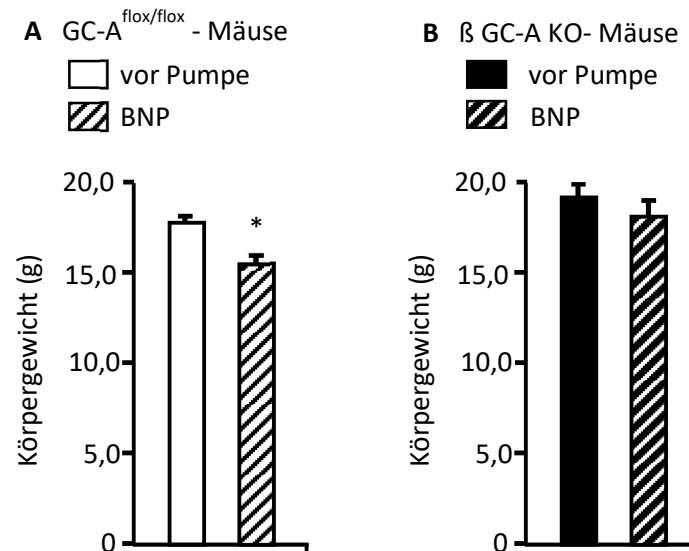


Abbildung 22: Körpergewicht von (A) GC-A^{flox/flox}- und (B) β GC-A KO-Mäusen vor und nach 7 Tagen BNP-Infusion (n=5-6 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. vor Pumpe).

3.3.2.2 Die chronische Infusion von BNP erhöht die Translokation von GLUT-4 im Skelettmuskel von Kontroll-Tieren

Als Parameter für die Insulinaktivität wurde die Translokation von GLUT-4 im Skelettmuskel untersucht. Insulin regt in Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen und Fettzellen die Translokation von GLUT-4 aus zytosolischen Vesikeln zur Plasmamembran an und erhöht dadurch die Glukoseaufnahme in die Zelle. Ist die Insulinwirkung (speziell im Muskel) gestört, spricht man von Insulinresistenz, einem Charakteristikum des Typ 2 Diabetes. Die Insulinwirkung kann auch mit einem Insulintoleranz-Test geprüft werden, bei welchem der Effekt von i.p. injiziertem Insulin auf den Blutzuckerspiegel untersucht wird. Auf diese Untersuchung wurde in dieser Studie bewusst verzichtet, um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten. Stattdessen wurden im Anschluss an die Studie (siehe 3.3.2.1) bei der Nekropsie die Zwillingswadenmuskel (Musculus Gastrocnemius) asserviert und für Western-Blot Analysen aufgearbeitet. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass die BNP-Infusion in den GC-A^{flox/flox}-Tieren zu einer erhöhten Translokation von GLUT-4 zur Plasmamembran der Skelettmuskelzellen führte und dass dieser Effekt in den β GC-A KO-Tieren ausblieb.

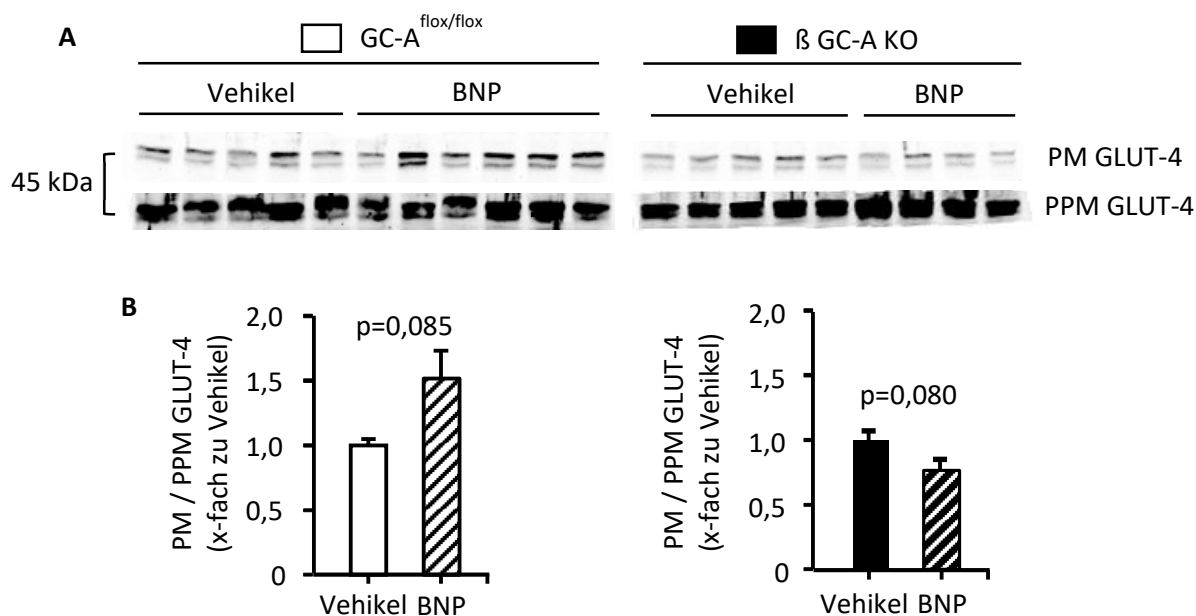


Abbildung 23: (A) Western Blot-Nachweis von GLUT-4 in Plasma- und Post-Plasmamembran-Fractionen aus Skelettmuskeln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 7-tägiger Vehikel- oder BNP-Infusion sowie (B) das Verhältnis von PM zu PPM zur Untersuchung der Translokation von GLUT-4 (n=4-6 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; (P)PM=(Post-) Plasmamembran).

3.4 Natriuretische Peptide modulieren über den GC-A-Rezeptor die β-Zell-Funktion und Vitalität unter pathologischen Bedingungen einer Hochfettdiät

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das endogene NP/GC-A-System unter basalen, physiologischen Bedingungen die Funktion pankreatischer β-Zellen nicht beeinflusst, da der β-zellspezifische Knockout von GC-A hierauf keine Auswirkung hatte. Deswegen sollte die Bedeutung des GC-A-Rezeptors in β-Zellen für deren Funktion und Vitalität unter den pathologischen Bedingungen eines experimentellen Modells für T2D untersucht werden. Dazu erhielten männliche Kontroll- und β GC-A KO-Tiere ab einem Alter von 5 Wochen entweder eine Normal- (ND) oder eine Hochfettdiät (HFD). Abbildung 24 gibt einen Überblick über den Studienverlauf von 16 Wochen sowie über die Zeitpunkte der Messungen für die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

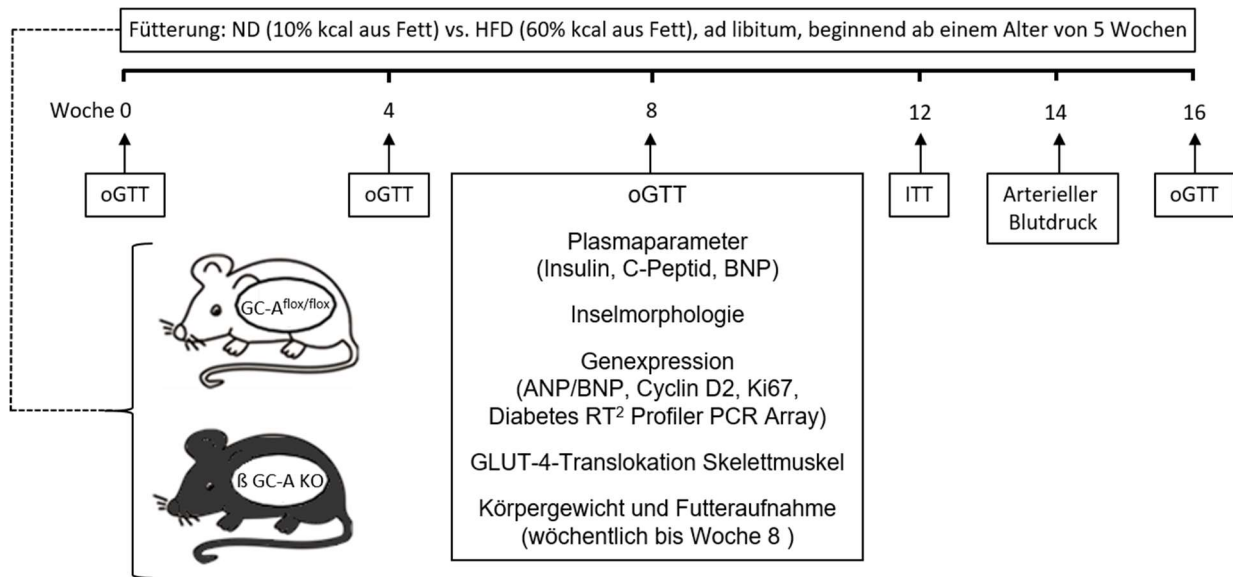


Abbildung 24: Schematischer Überblick über die Messzeitpunkte verschiedener Parameter während der bis zu 16-wöchigen Fütterung von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen mit einer Normal (ND)- bzw. Hochfettdiät (HFD) ab einem Alter von 5 Wochen.

3.4.1 Genotypunabhängige, Hochfettdiät-induzierte Zunahme des Körpergewichts und arteriellen Blutdrucks bei gleichbleibender Futteraufnahme

Die wöchentlichen Aufzeichnungen zeigten eine stetige Zunahme des Körpergewichts sowohl unter ND als auch unter HFD ohne genotypabhängige Unterschiede (Abb. 25A). Unter der HFD war die Zunahme des KGWs wie zu erwarten deutlich höher (Abb. 25B).

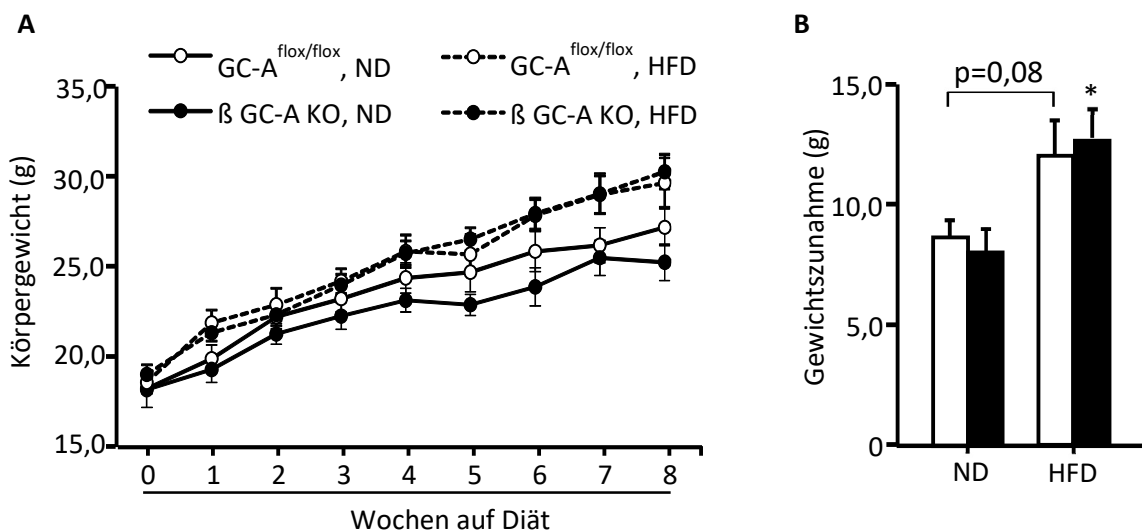


Abbildung 25: (A) Körpergewichtsverlauf und (B) Gewichtszunahme von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen während (A) bzw. nach (B) 8-wöchiger ND bzw. HFD (n=6-9 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. ND).

Ebenso war die Futtermittelaufnahme in g/Maus/Tag bei den GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Tieren sehr ähnlich (Abb. 26A), wengleich durchschnittlich in den Mäusen unter HFD signifikant niedriger (Abb. 26B). Die dennoch höhere Gewichtszunahme lässt sich erklären, wenn man die Energieaufnahme durch die jeweilige Diät betrachtet. Diese war durch den höheren Brennwert der HFD mit 5,24 kcal/g im Vergleich zur ND mit 3,85 kcal/g signifikant höher (Abb. 26C).

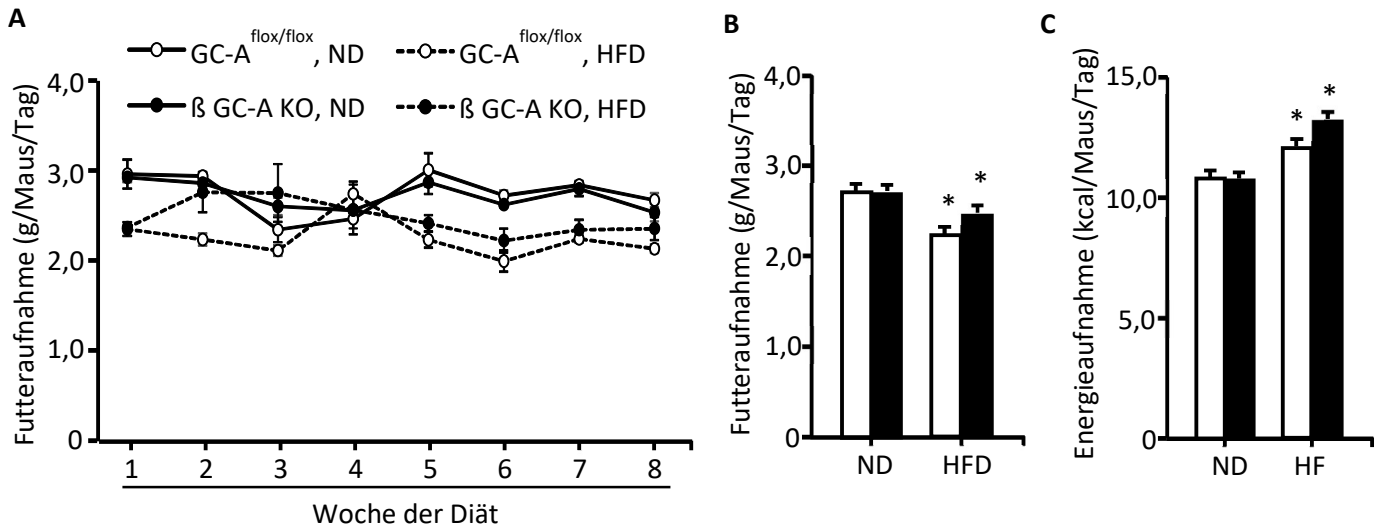


Abbildung 26: (A) Verlauf der Futtermittelaufnahme sowie durchschnittliche (B) Futter- und (C) Energieaufnahme von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen über (A) bzw. nach (B,C) 8 Wochen ND bzw. HFD (n=6-9 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. ND).

In beiden Genotypen war das durch die HFD hervorgerufene Übergewicht gleichermaßen assoziiert mit erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruckwerten (Abb. 27A,B).

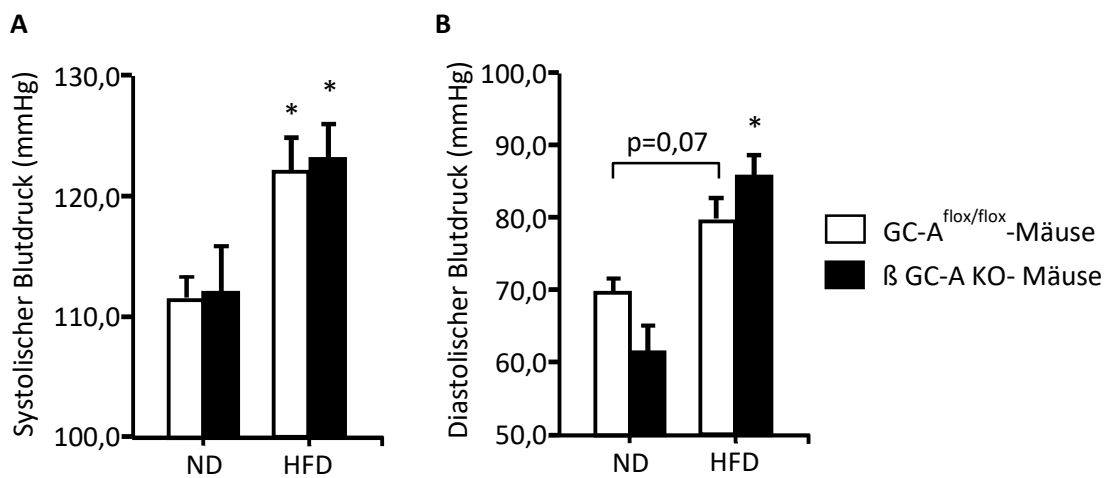


Abbildung 27: (A) Systolischer und (B) diastolischer Blutdruck von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 14 Wochen ND bzw. HFD (n=4-7 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. ND).

3.4.2 Erhöhte BNP mRNA-Expression in linken Herzventrikeln und erniedrigte BNP-Plasmaspiegel nach Hochfettdiät

Da arterieller Bluthochdruck und Herzbelastung zu erhöhter Genexpression von ANP und BNP in linken Herzventrikeln führen kann (SERGEEVA AND CHRISTOFFELS 2013), wurde von Frau Dr. Franziska Werner die mRNA-Expression von beiden Peptiden in linken Herzventrikeln von Tieren unter ND und HFD untersucht. Die Expression von ANP war in den Kontroll-Tieren unter HFD nicht signifikant erhöht (Abb. 28A). Die linken Ventrikel der β GC-A KO-Tiere wurden nicht untersucht. Die kardiale Expression von BNP hingegen war in beiden Genotypen unter HFD signifikant höher als unter ND, in den β GC-KO-Tieren sogar noch stärker (Abb. 28B). Außerdem wurden, ebenfalls von Frau Dr. Franziska Werner, die BNP-Plasmaspiegel von den Tieren nach 8 Wochen ND und HFD mittels einem spezifischen ELISA bestimmt. Diese waren in beiden Genotypen unter HFD verringert (Abb. 28C). Obwohl die BNP-Spiegel in beiden Genotypen ähnlich waren, war der cGMP-Gehalt in frisch isolierten Inseln von β GC-A KO-Tieren nach HFD deutlich verringert im Vergleich zu dem von Kontrolltieren (Abb. 28D).

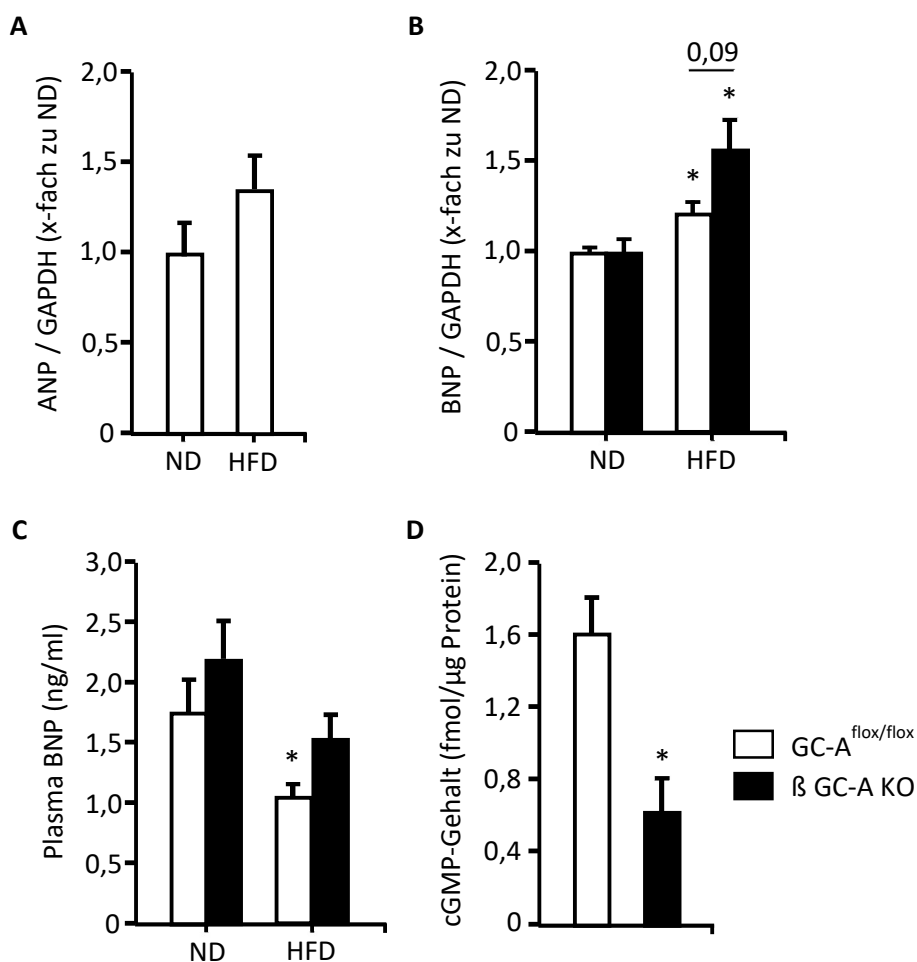


Abbildung 28: (A) ANP und (B) BNP mRNA-Expression (normalisiert auf GAPDH) in linken Herzventrikeln sowie (C) BNP-Plasmaspiegel und (D) cGMP-Gehalt von isolierten Inseln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 8 Wochen ND bzw. HFD (n=5-7 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. ND).

3.4.3 β GC-A KO-Mäuse zeigen stärkere Glukoseintoleranz nach 8-wöchiger Hochfettdiät

Vor der Diätintervention sowie 4, 8 und 16 Wochen nach Beginn wurde die Glukosehomöostase der Tiere mittels oraler Glukosetoleranz-Tests analysiert. Abbildung 29A zeigt, dass die Tiere beider Genotypen vor Diätbeginn im Alter von 5 Wochen (unter Standardfutter) eine annähernd gleiche Glukosetoleranz aufweisen. Dies bestätigt, dass die Deletion des GC-A-Rezeptors in den β -Zellen unter physiologischen Bedingungen keine Auswirkungen auf den Phänotyp hat und die Tiere in diesem Alter einen normalen Glukosestoffwechsel haben (siehe auch Abschnitt 3.2.2). Auch nach 4 Wochen unter Normal- oder Hochfettdiät zeigten sich keine genotypabhängigen Unterschiede. Die Glukosetoleranz hatte sich in den Tieren unter HFD im Vergleich zu den Tieren unter ND und vor Diät nur geringfügig verschlechtert (Abb. 29B). Veranschaulicht wird dies in Abbildung 29E, welche die AUCs zu den entsprechenden oGTTs abbildet. Die AUCs zu dem oGTT waren demnach nach 4 Wochen HFD nur leicht höher als in den Tieren unter ND und vor Diät. Nach 8-wöchiger HFD waren allerdings bereits die basalen Blutzuckerwerte gefasteter β GC-A KO-Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu ND (β GC-A KO ND: $3,03 \pm 0,14$ mmol/l; β GC-A KO HFD: $3,79 \pm 0,16$ mmol/l; $p = 0,0015$). In den Kontroll-Tieren hingegen war dieser Unterschied nur tendenziell erkennbar, mit einem Nüchtern-Blutzucker von $3,1 \pm 0,17$ mmol/l in der ND-Gruppe und $3,57 \pm 0,18$ mmol/l unter HFD ($p = 0,08$). Aber auch hier zeigten sich nur kleine Abweichungen zwischen den Genotypen. Erst der oGTT zeigte, dass die beiden Genotypen unterschiedlich auf die HFD reagierten. Zwar war die Glukosetoleranz in beiden Gruppen signifikant schlechter als unter ND, in den β GC-A KO-Tieren jedoch waren die Blutzuckerwerte zu jedem Zeitpunkt des Tests tendenziell oder signifikant höher als in den Kontroll-Tieren (Abb. 29C). Besser veranschaulicht ist dieses Ergebnis ebenfalls in Abbildung 29E. Die AUC der Glukosetoleranz der β GC-A KO-Tiere war nach 8 Wochen um etwa 22 ± 5 % signifikant höher als die der GC-A^{flox/flox}-Tiere unter HFD. Dieser genotypabhängige Unterschied verschwand nach 16 Wochen Diät. Die Glukosetoleranz der Kontroll-Tiere verschlechterte sich nach diesen weiteren 8 Wochen HFD auf ein ähnliches Niveau wie das der β GC-A KO-Mäuse (Abb. 29D,E). Die Glukosehomöostase in den Tieren unter ND veränderte sich über den gesamten Zeitraum der Diät nicht.

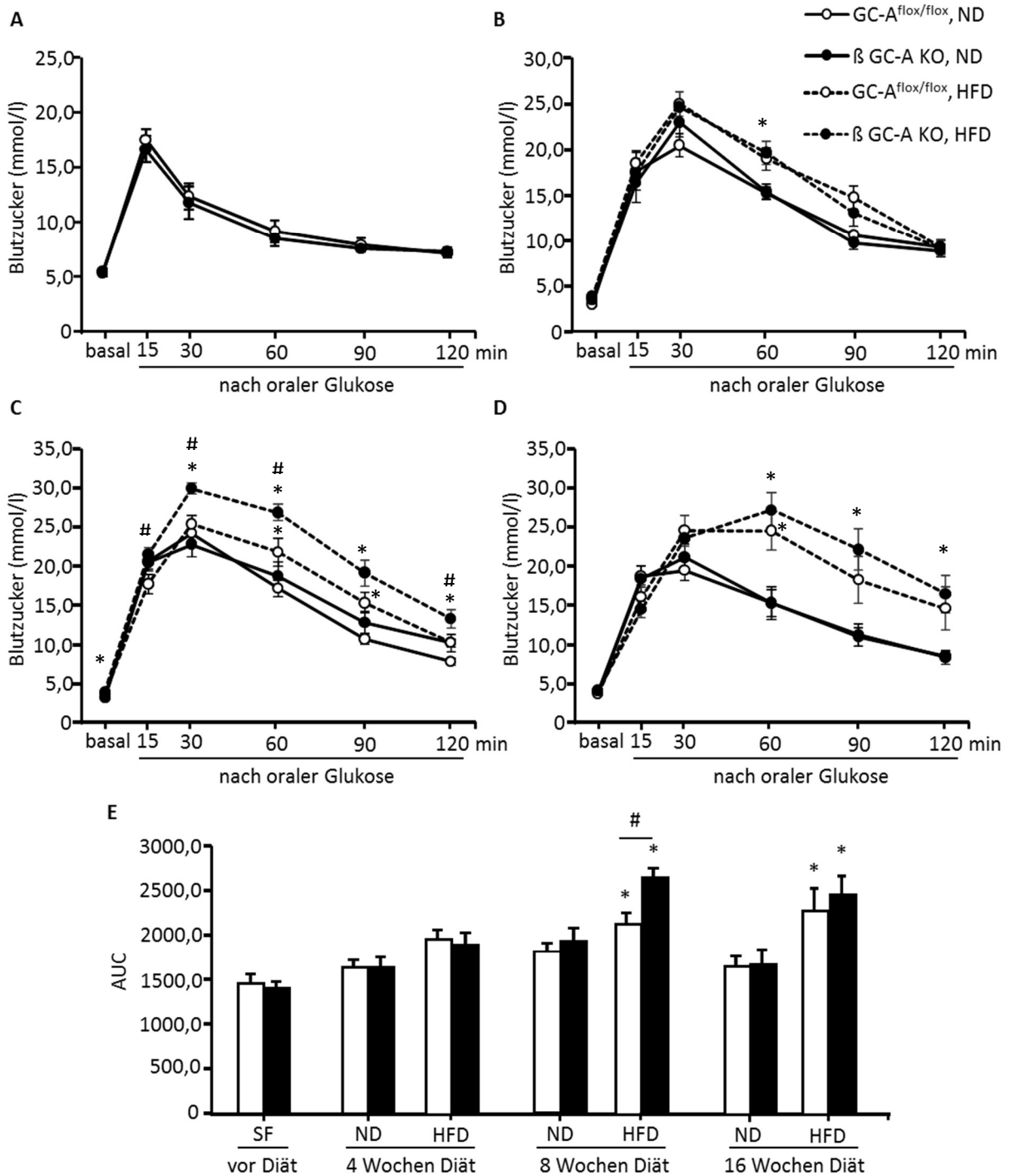


Abbildung 29: Orale Glukosetoleranz-Tests von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen (A) vor Diät und nach (B) 4, (C) 8 und (D) 16 Wochen ND bzw. HFD sowie (E) die korrespondierenden AUCs im Zeitverlauf (n=6-10 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. ND; # vs. Genotyp; SF=Standardfutter).

3.4.4 Die Insulinsensitivität ist in Kontroll- und β GC-A KO-Tieren unter Hochfett diät unverändert

Mit weiteren Versuchen sollte der nach 8-wöchiger HFD beobachtete Unterschied in der Glukosetoleranz der beiden Genotypen erklärt werden. Mittels eines ITT wurde 12 Wochen nach Beginn der Futterumstellung untersucht, ob die Tiere Insulinresistenzen aufweisen. Wie in Abbildung 30A zu erkennen, war die Insulintoleranz der Mäuse zwischen den Genotypen nicht verschieden. Zudem war die Insulinsensitivität in den Tieren nach 12 Wochen HFD im Vergleich zur ND unerwarteterweise nicht verändert. Dies ist verdeutlicht an den jeweils entsprechenden AUCs in Abb. 30B, welche unter HFD nicht erhöht waren. Ein Unterschied zeigte sich in den basalen Blutzuckerwerten, welche im Rahmen des ITT nach 4 h Fasten gemessen wurden. Diese waren in beiden Genotypen unter HFD leicht erhöht (Abb. 30C).

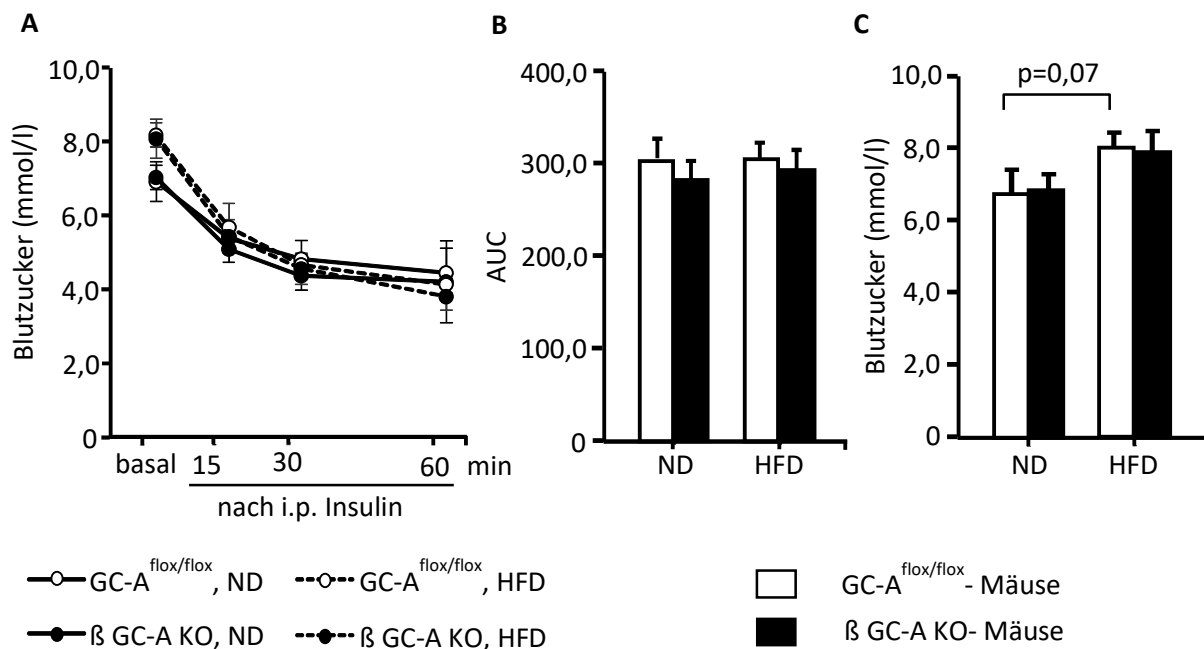


Abbildung 30: (A) Insulintoleranz-Test von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 12 Wochen ND bzw. HFD, (B) die korrespondierende AUC und (C) die basalen Blutzuckerwerte nach 4 h Fasten (n=9 Mäuse pro Genotyp und Bedingung).

3.4.5 Erhöhte C-Peptid-Spiegel und unveränderte Glukose-stimulierte Insulinsekretion in beiden Genotypen unter Hochfettdiät

Zudem wurden die Auswirkungen der HFD auf die Plasmaspiegel von C-Peptid (Abb. 31A) und Insulin sowie auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion untersucht (Abb. 31B). C-Peptid wird bei der Umwandlung von Proinsulin zu Insulin abgespalten und zusammen mit Insulin aus den β -Zellen ins Blut sezerniert. Die basalen C-Peptid-Spiegel von ungestauten Tieren waren in beiden Genotypen nach 8 Wochen HFD signifikant erhöht. Dementsprechend waren auch die basalen Insulinspiegel gefasteter Mäuse unter HFD nicht unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen (Abb. 31B). Auch die Glukose-stimulierte Insulinsekretion war ähnlich in den β GC-A KO- und den Kontroll-Tieren nach 8-wöchiger HFD. Diese Ergebnisse waren unerwartet aufgrund des stärker pathologischen oGTTs der β GC-A KO-Tiere zu diesem Zeitpunkt der Studie (Abb. 29C).

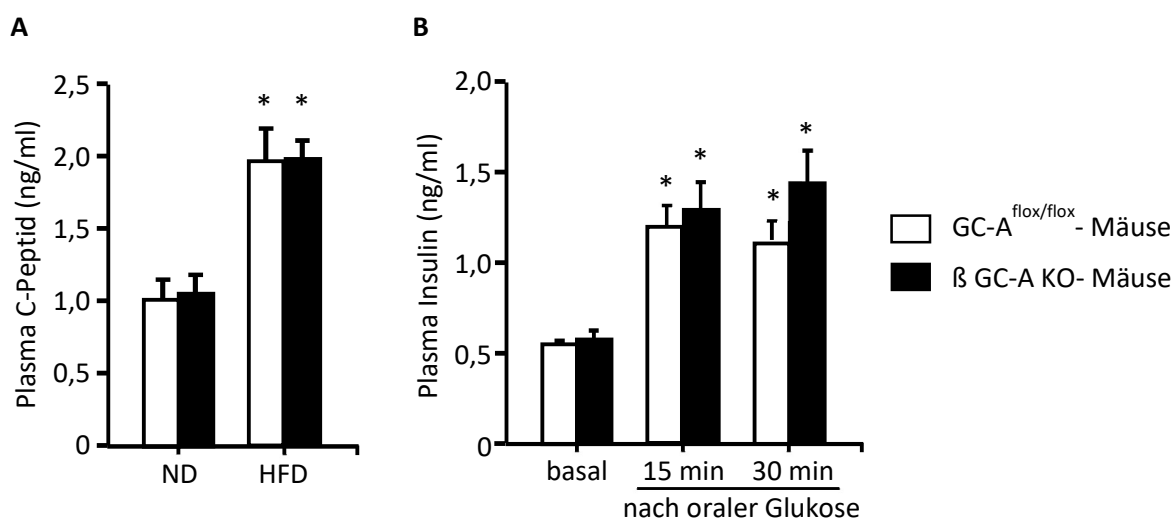


Abbildung 31: (A) Plasma C-Peptid-Spiegel (von ungestauten Tieren) nach 8 Wochen ND und HFD sowie (B) basale und Glukose-stimulierte Insulinsekretion (bei gefasteten Tieren) nach 8 Wochen HFD von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen. (n=5-7 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. ND).

3.4.6 Die Translokation von GLUT-4 im Skelettmuskel von β GC-A KO-Tieren unter Hochfettdiät ist vermindert

Die Diskrepanz zwischen der höheren Glukoseintoleranz der β GC-A KO-Mäuse (Abb. 29C) und der unveränderten GSIS (Abb. 31B) bei gleicher Insulinsensitivität (Abb. 30A) beider Genotypen nach 8-wöchiger HFD führte zu der Hypothese, dass die β -Zellen der β GC-A KO-Tiere unter HFD vermehrt unprozessiertes, biologisch weniger aktives Proinsulin ausschütten. Um diese These zu testen, wurde erneut mittels Western Blot die Translokation von GLUT-4 im Zwillingswadenmuskel als Nachweis für

die Aktivität von endogenem Insulin untersucht. In Abbildung 31 ist anhand der Na⁺/K⁺-ATPase in der Plasmamembran zu erkennen, dass die Proteinladung der Gele leider etwas ungleichmäßig war. Die Trennung von Plasma- und Post-Plasmamembran war allerdings sauber, da die Na⁺/K⁺-ATPase in der Post-Plasmamembran-Fraktion nicht nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurde bei dieser Auswertung die Expression von GLUT-4 zunächst auf die Expression der Na⁺/K⁺-ATPase in der Plasmamembran normiert. Da die Translokation der GLUT-4-Moleküle aus zytosolischen Vesikeln in die Plasmamembran untersucht werden sollte, wurde das Verhältnis der Plasmamembran-Expression von GLUT-4-zu-Na⁺/K⁺-ATPase anschließend, wie auch in Abschnitt 3.3.2.2, auf die Expression von GLUT-4 in der Post-Plasmamembran normiert. Tatsächlich war in den β GC-A KO-Tieren sowohl nach 8-wöchiger ND als auch HFD die Translokation von GLUT-4 in die Plasmamembran signifikant niedriger als in den Kontroll-Tieren (Abb. 32). Dieses Ergebnis spricht für die Annahme, dass von den β-Zellen der β GC-A KO-Tiere weniger biologisch aktives Insulin ausgeschüttet wird, die Translokation von GLUT-4 deswegen vermindert und die Glukosetoleranz der Tiere unter HFD zu diesem Zeitpunkt der Studie gestört war.

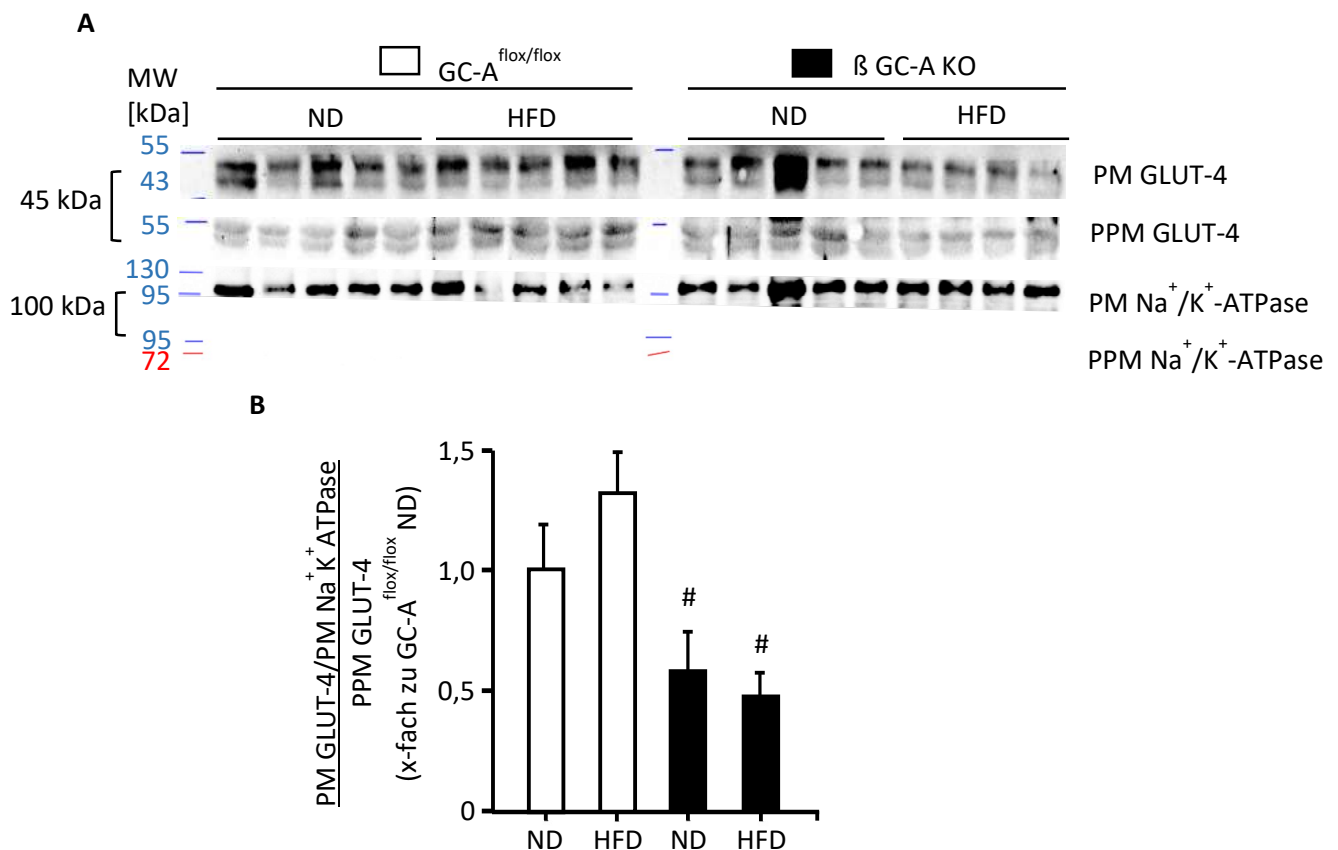


Abbildung 32: (A) Western Blot-Nachweis von GLUT-4 und Na⁺/K⁺-ATPase in PM- und PPM-Fractionen aus Skelettmuskeln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 8-wöchiger ND bzw. HFD sowie (B) das Verhältnis von PM GLUT-4 (normiert auf PM Na⁺/K⁺-ATPase) zu PPM GLUT-4 zur Untersuchung der Translokation (n=4-5 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; # vs. Genotyp; (P)PM=(Post-) Plasmamembran).

3.4.7 Stimulierende Effekte des NP/GC-A-Systems auf die Proliferation pankreatischer β -Zellen

3.4.7.1 ANP induziert über den GC-A-Rezeptor die Cyclin D2 mRNA-Expression in kultivierten Inseln von Kontroll-Tieren

Als nächstes sollte der Einfluss des NP/GC-A-Systems auf die Proliferation von β -Zellen untersucht werden. Zuvor wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass ANP in kultivierten Inseln die DNA-Replikation sowie die mRNA-Expression des Zellzyklus-Markers Cyclin D2 induziert (YOU AND LAYCHOCK 2009). In der vorliegenden Studie wurde dieser Effekt an isolierten, kultivierten Inseln von Kontroll-Tieren nach 24 h Inkubation mit ANP-Konzentrationen ab 1 nM reproduziert. Diese Bedingungen führten zu signifikant erhöhten Cyclin D2 mRNA-Expressionswerten (Abb. 33). Höhere Konzentrationen hatten keinen zusätzlichen Effekt. Da Inseln auch Endothelzellen enthalten, welche auf ANP ebenfalls mit erhöhter Proliferation reagieren (KUHN *et al.* 2009), wurden diese Versuche zusätzlich an Inseln von β GC-A KO-Mäusen durchgeführt. Hier hatte ANP keinen Effekt auf die Expression von Cyclin D2. Dies zeigt, dass ANP die Cyclin D2-Expression, als Index für Proliferation, speziell in den β -Zellen induziert.

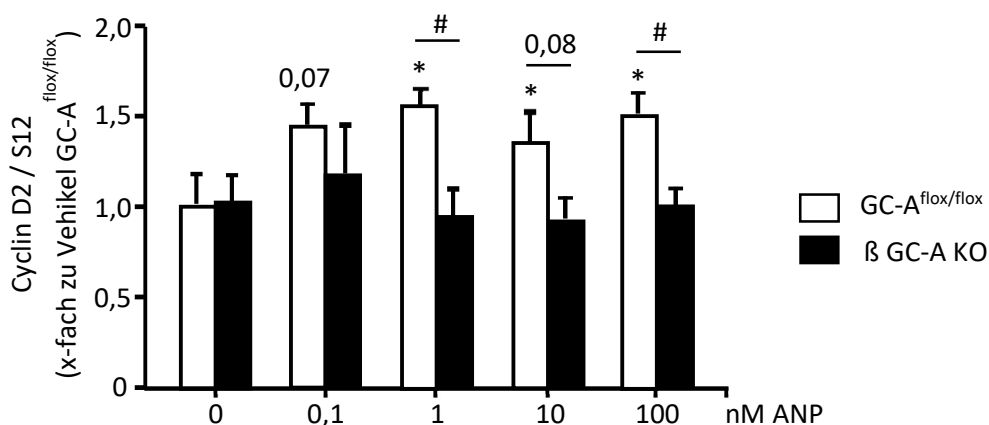


Abbildung 33: Cyclin D2 mRNA-Expression (normalisiert auf S12) in kultivierten Langerhans-Inseln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 24 h Inkubation ohne oder mit ANP (n=8-9 Ansätze á 50 Inseln pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. Vehikel; # vs. Genotyp).

3.4.7.2 ANP verbessert die adaptive Proliferation der β -Zellen in Kontroll-Mäusen unter Hochfettdiät

Ob ANP die β -Zellproliferation auch in vivo steigert, wurde anhand des neuen genetischen Mausmodells analysiert. In der Anfangsphase eines Typ 2 Diabetes kommt es zu einer adaptiven Zunahme der β -Zellmasse, um periphere Insulinresistenzen, welche mit Übergewicht einhergehen, zu kompensieren (RHODES 2005). Bei Mäusen führt die Fütterung mit HFD zur Proliferation von β -Zellen (MOSSER *et al.* 2015). Um dies nachzuvollziehen, wurden Insulin, Glukagon und die Zellkerne in Pankreasschnitten immunhistochemisch angefärbt und diese morphometrisch analysiert (Abb. 34A). Diese Immunhistochemie sowie deren Auswertung wurden von Dr. Hitoshi Nakagawa in der AG M. Kuhn durchgeführt. Tatsächlich führte die HFD in den Kontroll-Tieren zu einer signifikanten Zunahme der Inselgröße und einer signifikant größeren β -Zellfläche in den Inseln. Ursache für diese Zunahme war eine signifikant erhöhte Anzahl an β -Zellen innerhalb der Inseln (Abb. 34B-D). Diese Effekte der HFD blieben in den β GC-A KO-Mäusen aus, was darauf hindeutet, dass die adaptive Proliferation der β -Zellen durch das NP/GC-A-System verbessert wird.

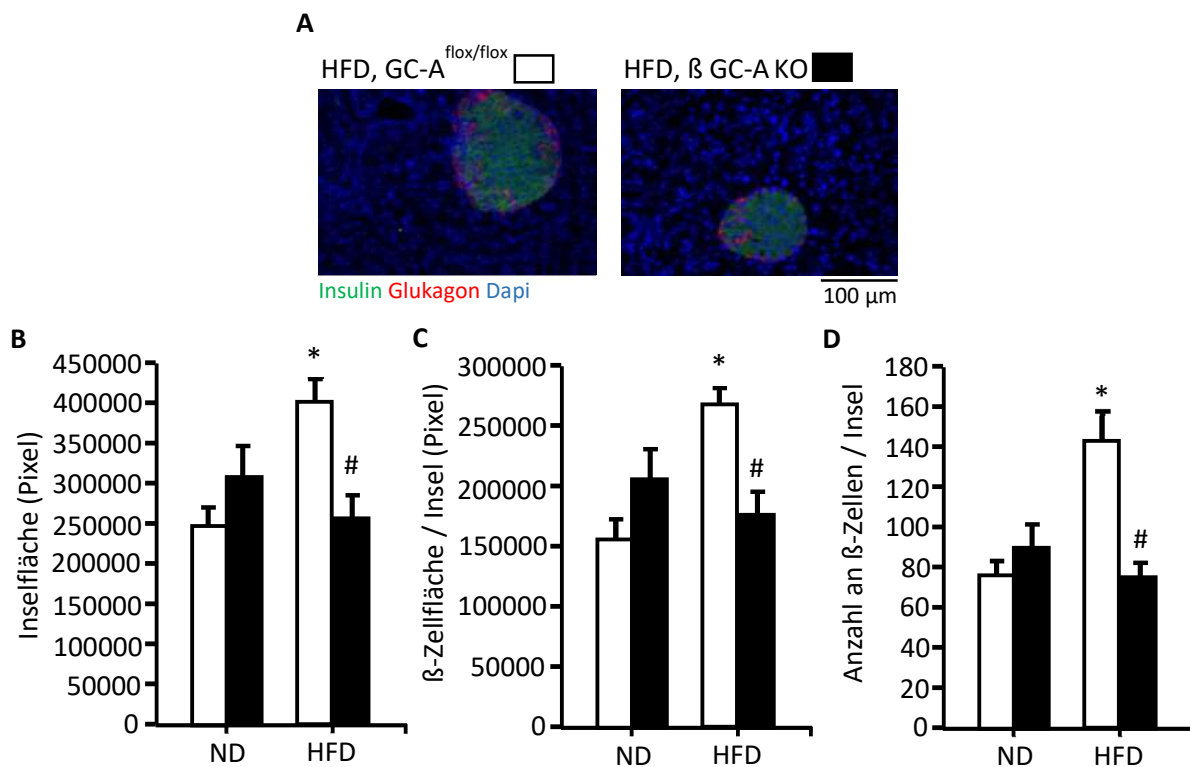


Abbildung 34: (A) Repräsentative immunhistochemische Färbung von Insulin, Glukagon und der Zellkerne (DAPI) sowie die morphometrische Auswertung der (B) Inselgröße, der (C) β -Zellfläche pro Insel und der (D) Anzahl der β Zellen pro Insel anhand von Pankreas-Schnitten von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 8 Wochen ND bzw. HFD (n=5 Mäuse pro Genotyp und Bedingung, 3 Schnitte pro Maus; p<0,05; * vs. ND; # vs. Genotyp).

3.4.7.3 Die Cyclin D2 mRNA-Expression ist in isolierten Inseln von β GC-A KO-Tieren nach Hochfettdiät vermindert

Untermauert wurden diese Daten durch das Ergebnis, dass die mRNA-Expression von Cyclin D2 in isolierten Inseln von GC-A^{flox/flox}-Tieren nach 8 Wochen HFD erhöht war und dieser Anstieg in den β GC-A KO-Tieren unter HFD ausblieb (Abb. 35A). Damit wurden die Daten von You und Laychok (2009) nicht nur in vitro, sondern auch in vivo unter pathologischen Bedingungen reproduziert. Zusätzlich haben wir in diesen Proben die mRNA-Expression von Ki-67, einem weiteren Marker der Zellproliferation, untersucht. In den β GC-A KO-Tieren nach 8-wöchiger ND sowie HFD und ebenso in den Kontroll-Tieren unter HFD war die Genexpression von Ki-67 leicht verringert (Abb. 35B).

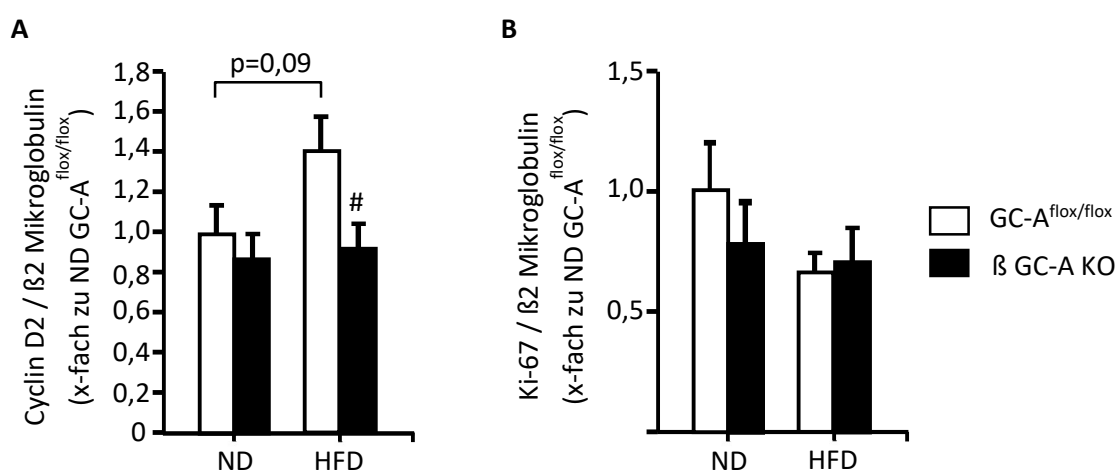


Abbildung 35: (A) Cyclin D2 und **(B)** Ki-67 mRNA-Expression (normalisiert auf β 2 Mikroglobulin) in isolierten Inseln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 8 Wochen ND bzw. HFD (n=7-9 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; # vs. Genotyp).

3.4.8 Effekte von NP/GC-A auf die Expression Diabetes-bezogener Gene nach 8-wöchiger Hochfettdiät

3.4.8.1 Untersuchung der Genexpression mittels Diabetes RT² Profiler PCR Array in isolierten Langerhans-Inseln

Mithilfe des RT² Profiler PCR Array von Qiagen wurde weiterhin untersucht, welche Diabetes-bezogenen Gene in den Inseln der Kontroll- und β GC-A KO-Tiere nach den 8-wöchigen Diätmaßnahmen verändert waren und ob dahingehend Genotyp-spezifische Unterschiede zu beobachten waren. Zu diesem Zeitpunkt war die Glukosetoleranz der β GC-A KO-Mäuse unter HFD deutlich schlechter als in den entsprechenden Kontroll-Tieren (Abb. 29C,E). Abbildung 35 stellt ausgewählte Gene, unterteilt in funktionelle Gruppen, normiert auf die Kontroll-Tiere unter ND dar.

Metabolische Enzyme

Betrachtet man die mRNA-Expression der ATP-Citrat-Lyase (Acl_y) nach 8 Wochen Diät, fällt auf, dass diese in den Kontroll-Tieren unter HFD nur leicht, in den β GC-A KO-Tieren unter ND bereits auf $0,60 \pm 0,10$ und unter HFD sogar auf $0,29 \pm 0,06$ verringert war (Abb. 36A). Die mRNA-Expression der Dipeptidylpeptidase 4 (Dpp4) war in beiden Genotypen unter ND sowie in den Kontroll-Tieren unter HFD nicht verändert, in den β GC-A KO-Tieren nach HFD jedoch stark erhöht ($4,21 \pm 0,56$). Die Fructose-1,6-bisphosphatase (Fbp1) mRNA-Expression war in beiden Genotypen unter HFD deutlich erhöht (Abb. 18C). Auch die β GC-A KO-Tiere unter ND zeigten eine 1,5-fach ($\pm 0,38$) verstärkte Expression. Die mRNA-Expression von Glykogensynthase-Kinase 3b (Gsk3b) war ähnlich wie bei Dpp4 nur in den β GC-A KO-Tieren unter HFD stark erhöht ($4,05 \pm 0,69$). Ebenso war die Expression der Mangan-haltigen Superoxiddismutase (Sod2) nur in den Inseln der β GC-A KO-Tiere nach HFD erhöht ($2,90 \pm 0,41$).

Zytokine und Wachstumsfaktoren

Die mRNA-Expression von Insulin I (Ins1) war in der vorliegenden Studie sowohl in den β GC-A KO-Tieren unter ND als auch in beiden Genotypen nach HFD leicht verringert (Abb. 36B). Bei der Betrachtung der mRNA-Expression des Transforming Growth Factor beta 1 (Tgfb1) fällt auf, dass die Expression in den Kontroll-Tieren unter HFD und den β GC-A KO-Tieren unter ND um mehr als die Hälfte reduziert war (Abb. 36B). In den Inseln der Knockouts unter HFD war die Expression hingegen auf das etwa dreifache erhöht ($2,64 \pm 0,15$). Die mRNA-Expression des Vascular Endothelial Growth Factor alpha (Vegfa) war in den Kontroll-Tieren unter HFD unverändert, in den Inseln der β GC-A KO-Tieren unter ND etwa 1,72-fach ($\pm 0,43$) und unter HFD sogar 5,78-fach ($\pm 0,69$) erhöht.

Rezeptoren, Transporter und Kanäle

Die Expression von α 1A-Adrenozeptor mRNA (Adra1a) war nach 8 Wochen HFD in den Kontroll-Tieren geringfügig erniedrigt und in den β GC-KO-Tieren erhöht (Abb. 36C). In den β GC-A KO-Mäusen unter ND war die Expression stark erhöht ($2,03 \pm 0,77$), wobei der hohe Standardfehler keine konkrete Aussage zulässt. Die mRNA-Expression des Ras Proto-Onkogens Rab4a war unter ND in den β GC-A KO-Tieren ähnlich erhöht wie in den Kontroll-Tieren unter HFD. Die HFD-gefütterten β GC-A KO-Tiere hingegen zeigten eine deutliche Reduktion der Genexpression. Die Genexpression der Synaptosomal-assoziierten Proteine 23 und 25 (Snap23/25) war in den untersuchten Gruppen ähnlich. Unter ND war sie in den β GC KO-Tieren annähernd unverändert (Snap23) bzw. geringfügig erhöht (Snap25). Die HFD induzierte in den Kontroll-Tieren eine etwas erhöhte Expression mit $1,28 \pm 0,06$ bei Snap23 und $1,37 \pm 0,05$ bei Snap25, in den β GC-A KO-Tieren war diese unverändert bzw. leicht erniedrigt. Die Expression von Vesikel-assoziierten Membranprotein 2 (Vamp2) war in den β GC-A KO-Tieren unter ND leicht ($1,27 \pm 0,27$), in den Kontroll-Tieren unter HFD kaum ($1,10 \pm 0,01$) und in den β GC-A KO-Tieren unter HFD sogar mehr als 3-fach ($3,28 \pm 0,25$) erhöht. Die Expression der mRNA von Vamp-assoziiertem Protein

(Vapa) war annähernd unverändert in den β GC-A KO-Tieren unter ND sowie den Kontroll-Tieren unter HFD, jedoch war sie in den β GC-A KO-Tieren unter HFD deutlich reduziert.

Transkriptionsfaktoren

Abbildung 36D veranschaulicht die mRNA-Expression der beiden Transkriptionsfaktoren CCAAT/Enhancer-bindendes Protein alpha (Cebpa) und Pancreatic-duodenal Homeobox 1 (Pdx1) nach 8-wöchiger Diätintervention in Kontroll- und β GC-A KO-Tieren. Die Expression von Cebpa war bei den β GC-A KO-Tieren unter ND bereits auf etwa die Hälfte reduziert ($0,49 \pm 0,10$), in den Kontroll-Tieren unter HFD sogar auf etwa ein Drittel ($0,31 \pm 0,04$) im Vergleich zu den Kontrollen unter ND. Die β GC-A KO-Tiere unter HFD hingegen wiesen eine deutlich erhöhte Genexpression auf ($2,90 \pm 0,13$). Die Pdx1-Expression war in den β GC-A KO-Tieren unter ND sowie den Kontroll-Tieren unter HFD weitestgehend unverändert. Eine massive Reduktion der Genexpression zeigte sich jedoch in den β GC-A KO-Tieren nach HFD ($0,03 \pm 0,0005$).

Kernrezeptoren und andere Diabetes-Gene

In der vorliegenden Untersuchung wurden die beiden Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren Ppara und Pparg einbezogen (Abb. 36E). Die mRNA-Expression beider Kernrezeptoren war ähnlich in den einzelnen Gruppen. So wurde in den β GC-A KO-Tieren eine deutlich erhöhte Expression (Ppara: $3,19 \pm 0,03$; Pparg: $2,00 \pm 0,31$) festgestellt, in den Kontroll-Tieren eine etwas weniger erhöhte Expression (Ppara: $1,82 \pm 0,18$; Pparg: $1,68 \pm 0,23$). In den β GC-A KO-Tieren induzierte die HFD keine Veränderung der Ppara-Expression; die Expression von Pparg war in dieser Versuchsgruppe sogar stark reduziert auf $0,33 \pm 0,02$. Die mRNA-Expression von Uncoupling Protein 2 (Ucp2) war in allen Gruppen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren unter ND reduziert. In den β GC-A KO-Tieren war die Genexpression nach der HFD sogar auf etwa ein Hundertstel verringert ($0,01 \pm 0,0004$).

Signaltransduktion

Die mRNA-Expression der Serin/Threonin Kinase Akt2 war in den β GC-A KO-Tieren unter ND auf $1,40 \pm 0,19$, unter HFD sogar auf $2,78 \pm 0,20$ erhöht. Unverändert war hingegen die Expression in den Kontroll-Tieren unter HFD. Die mRNA-Expression von Protein Inhibitor of Nuclear Factor kappa-B Kinase Subunit beta (Ikbkb) war in den β GC-A KO-Tieren unter ND herunterreguliert ($0,63 \pm 0,05$), unter HFD hingegen geringfügig erhöht ($1,12 \pm 0,04$). Die HFD induzierte in den Kontroll-Mäusen eine um etwa 50 % reduzierte Genexpression ($0,53 \pm 0$). Die β GC-A KO-Tiere zeigten unter HFD eine stark verringerte Expression von Inositol Polyphosphat Phosphatase Like 1 (Inpp1) ($0,18 \pm 0,01$). In den β GC-A-KO-Tieren unter ND und den Kontroll-Tieren unter ND war die Genexpression hingegen geringfügig erhöht (Abb. 36F). Die Expression der Mitogen-aktivierten Proteinkinase 14 (Mapk14) war leicht herunterreguliert in den β GC-A KO-Mäusen unter ND und den Kontroll-Tieren unter HFD. In den β GC-A KO-Tieren unter HFD war die Expression sogar um etwa 70 % reduziert ($0,29 \pm 0,01$). Die Expression von Mitogen-

aktivierten Proteinkinase 8 (Mapk8) war ebenfalls in den β GC-A KO-Tieren unter HFD deutlich reduziert ($0,50 \pm 0,04$), in den anderen Gruppen hingegen unverändert.

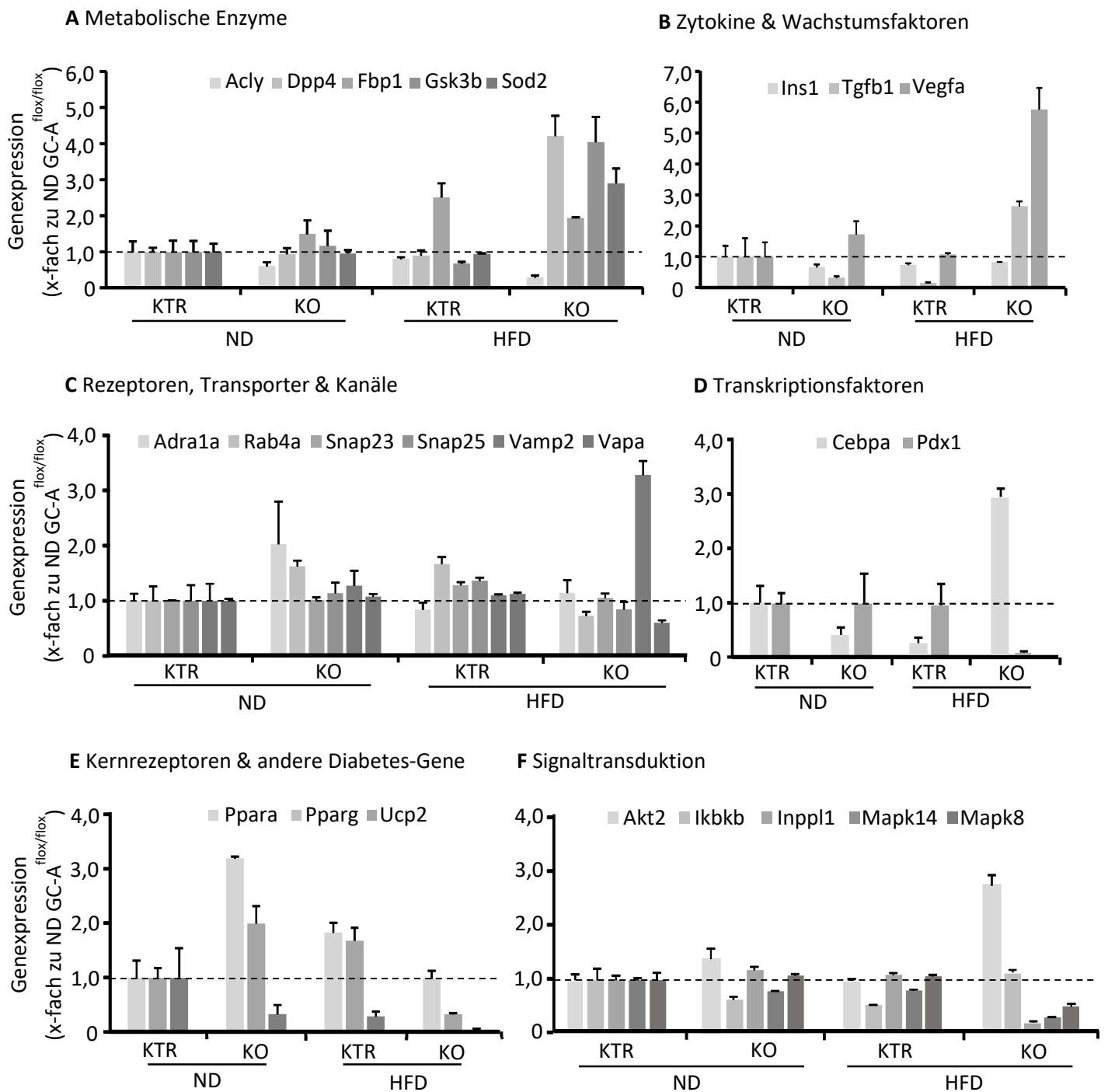


Abbildung 36: mRNA-Expression von 24 ausgewählten Genen des Diabetes RT² Profiler PCR Array in isolierten Langerhans-Inseln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 8 Wochen ND bzw. HFD (n=2-3 Mäuse pro Genotyp und Bedingung).

3.4.8.2 Validierung der Genexpression von Gsk3b, Pdx1 und Ucp2

Einzelne Gene, deren Expressionsmuster bei der Analyse mit dem RT² Profiler PCR Array auffällig erschien, wurden mittels quantitativer qRT-PCR in allen Inseln der einzelnen Gruppen untersucht, um die Ergebnisse zu überprüfen und zu validieren. Wie bereits in 3.4.8.1 erwähnt, war die mRNA-Expression von Glykogensynthase-Kinase 3b (Gsk3b) in den β GC-A KO-Tieren unter HFD auf das 4-fache erhöht, in den anderen Gruppen hingegen kaum verändert (Abb. 36A). Dieses Ergebnis konnte durch qRT-PCR Analysen weiterer cDNA-Proben untermauert werden. Wie Abbildung 37A veranschaulicht, war die Expression in den β GC-A KO-Tieren unter ND im Vergleich zu den Kontroll-Tieren nur geringfügig erhöht. Die HFD induzierte in den Kontroll-Mäusen einen leichten Anstieg der Expression auf $1,16 \pm 0,3$. Die β GC-A KO-Mäuse zeigten nach der HFD eine um das 1,55-fache ($\pm 0,16$) gesteigerte Expression, welche damit signifikant höher war als in den Kontroll-Tieren unter ND. Weiterhin wurde die Expression von Pdx1 näher untersucht. Die Gene Array-Analyse hatte angedeutet, dass die Expression in den β GC-A KO-Tieren unter HFD sehr stark vermindert ist ($0,03 \pm 0,0005$), in den anderen Gruppen jedoch unverändert bleibt. Dieses Ergebnis konnte nur annähernd reproduziert werden. In den β GC-A KO-Mäusen unter ND war die Expression nur geringfügig vermindert auf $0,93 \pm 0,19$. In den Kontroll-Tieren hingegen induzierte die HFD einen leichten Anstieg der Expression auf $1,18 \pm 0,19$, welcher in den β GC-A KO-Tieren ausblieb. Hier war die Expression leicht verringert auf $0,90 \pm 0,14$ (Abb. 36B). Zudem wurde die mRNA-Expression von Ucp2 validiert. In der Gene Array-Analyse war die Expression in allen Gruppen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren um mehr als die Hälfte reduziert (Abb. 36E). Bei Einbezug aller cDNA-Proben zeigte sich allerdings, dass die Expression nur in den β GC-A KO-Tieren unter ND und HFD verringert war. In den Kontroll-Tieren war die Expression nach der HFD-Fütterung sogar 1,31-fach ($\pm 0,22$) erhöht und damit annähernd signifikant höher als in den β GC-A KO-Mäusen unter HFD (Abb. 37C).

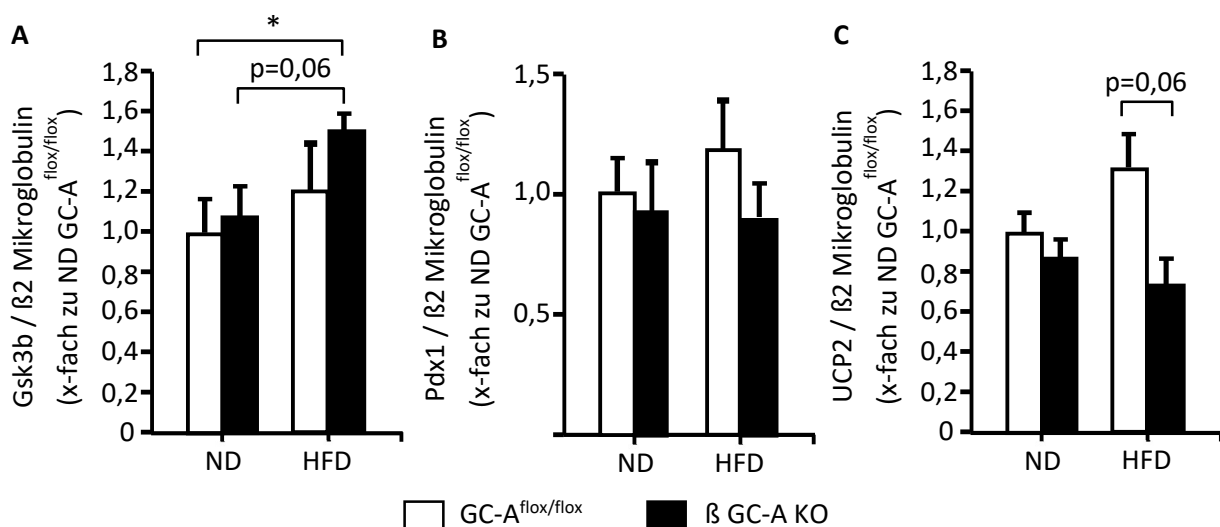


Abbildung 37: qRT-PCR Analysen der Gsk3b, Pdx1 und Ucp2 mRNA-Expression (normalisiert auf $\beta 2$ Mikroglobulin) in isolierten Langerhans-Inseln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 8 Wochen ND bzw. HFD (n=7-9 Mäuse pro Genotyp und Bedingung).

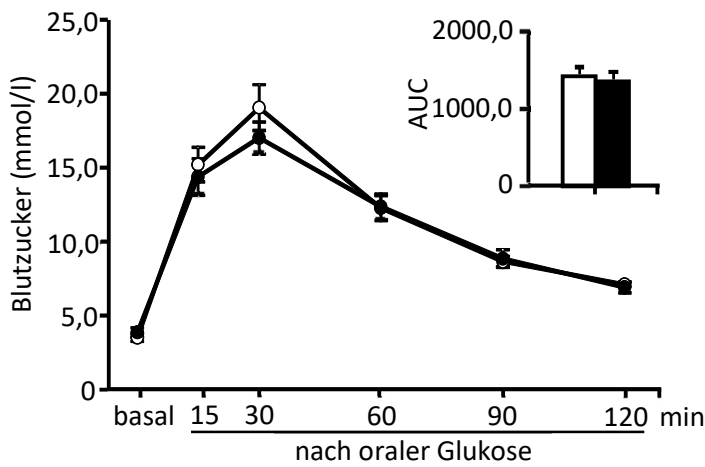
3.5 Geschlechtsabhängiger Unterschied im Einfluss der GC-A-Deletion auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion

Unter basalen Bedingungen hatte die Ablation des GC-A-Rezeptors keinen Einfluss auf physiologische und metabolische Parameter *in vivo*. Sowohl männliche als auch weibliche β GC-A KO-Tiere zeigten im Vergleich zu Kontroll-Tieren keine Unterschiede im arteriellen Blutdruck und im Körpergewicht (s. Kapitel 3.2.1). Ebenfalls unbeeinträchtigt war die basale Insulin- und Glukosehomöostase in den β GC-A KO-Tieren beider Geschlechter, da sie ähnliche Nüchtern-Blutzucker- und Insulinspiegel (nach Fasten über Nacht) zeigten wie die Kontroll-Mäuse (s. Kapitel 3.2.2). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit fiel allerdings bei weiterer getrennter Betrachtung von männlichen und weiblichen Tieren auf, dass weibliche β GC-A KO-Tiere unter physiologischen Bedingungen eine höhere Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung sowie eine verbesserte Glukosetoleranz hatten. Bei männlichen Tieren unterschieden sich diese beiden Parameter hingegen nicht zwischen den Genotypen. Deshalb wurde der These von einem geschlechtsabhängigen Unterschied im Einfluss der GC-A-Deletion auf die Glukosetoleranz und die GSIS im Folgenden genauer nachgegangen.

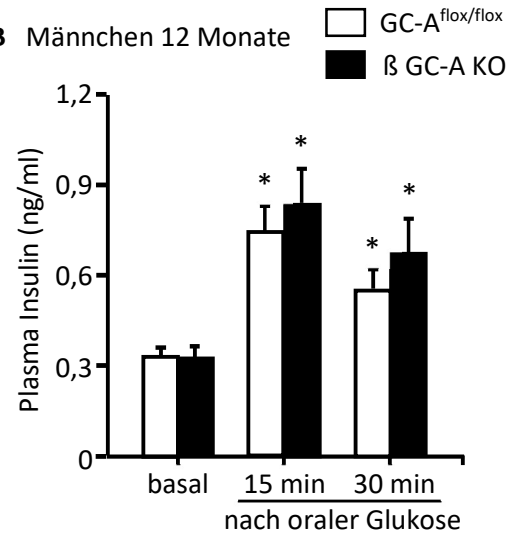
3.5.1 Verbesserte Glukosetoleranz und Glukose-stimulierte Insulinsekretion in weiblichen β GC-A KO-Tieren

Wie in Abbildung 38 zu erkennen waren in etwa 12 Monate alten Männchen die Glukosetoleranz (Abb. 38A), die basalen Plasma-Insulinspiegel sowie die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (Abb. 38B) annähernd gleich in beiden Genotypen. Bei gleichaltrigen oder jüngeren Weibchen hingegen war die Glukosetoleranz der β GC-A KO-Tiere mit einer AUC von $1238,3 \pm 52,3$ signifikant niedriger als bei den Kontroll-Tieren mit einer AUC von $1649 \pm 101,2$ (Abb. 38C). In den basalen Plasma-Insulinspiegeln zeigten sich keine genotypabhängigen Unterschiede. Verglichen mit den Männchen waren diese in den Weibchen allerdings tendenziell höher (Abb. 38D). Unerwarteterweise war die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in den β GC-A KO-Weibchen 15 Minuten nach oraler Glukosegabe ($1,166 \pm 0,18$ ng/ml) im Vergleich zu den Kontroll-Tieren ($0,744 \pm 0,09$ ng/ml) signifikant erhöht. Diese Unterschiede zwischen Kontroll- und β GC-A KO-Weibchen waren im Alter von 20 Monaten aufgehoben. Hier waren der oGTT, die basalen Plasma-Insulinspiegel sowie die GSIS nicht mehr unterschiedlich zwischen den Genotypen (Abb. 38E,F). Da weibliche Mäuse sich ab einem Alter von 18 Monaten in der Menopause befinden (MOBBS *et al.* 1984), vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen dem Östrogenspiegel der Tiere und dem Genotyp-abhängigen Unterschied der Insulin/Glukose-Homöostase.

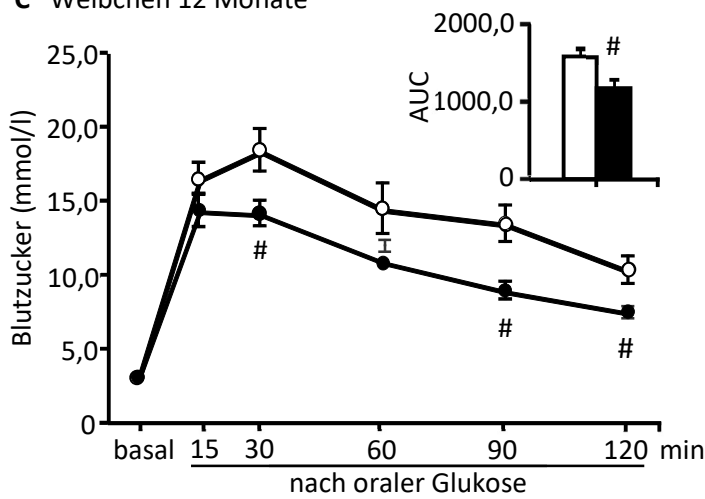
A Männchen 12 Monate



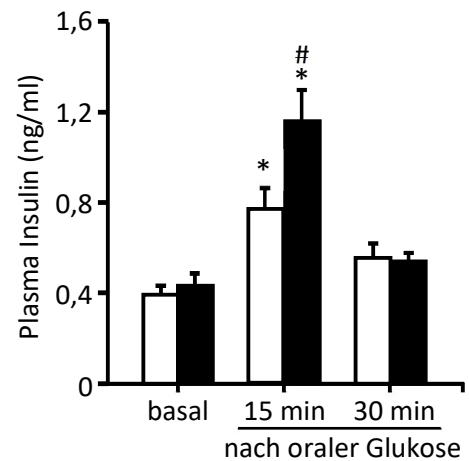
B Männchen 12 Monate



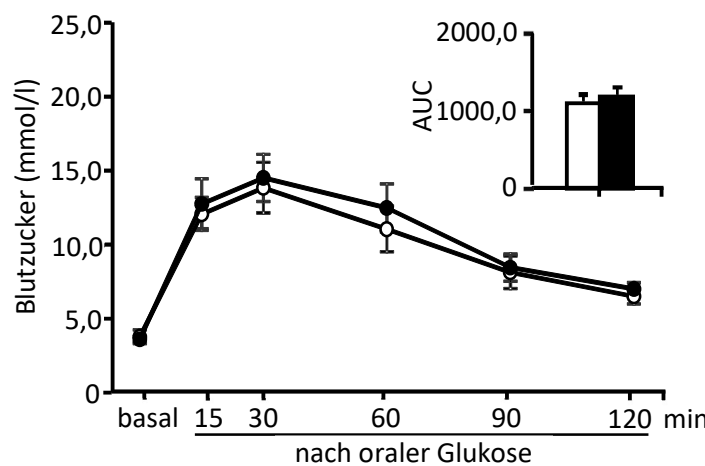
C Weibchen 12 Monate



D Weibchen 12 Monate



E Weibchen > 20 Monate



F Weibchen > 20 Monate

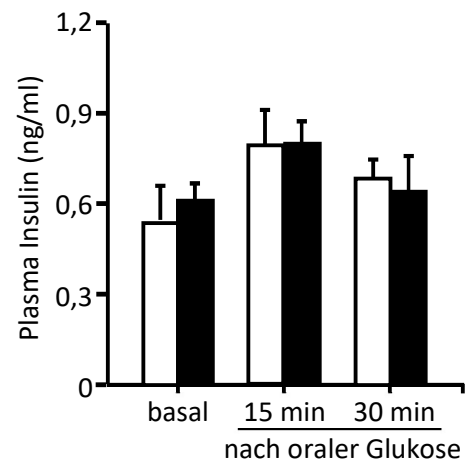


Abbildung 38: Orale Glukosetoleranz-Tests (mit korrespondierenden AUCs), basale Insulinspiegel sowie Glukose-stimulierte Insulinsekretion von (A,B) männlichen, (C,D) weiblichen und (E,F) über 20 Monate alten, weiblichen GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen (n=6-10 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. basal; # vs. Genotyp).

3.5.2 Geringere β -Zellfläche und weniger β -Zellen in den Inseln von weiblichen β GC-A KO-Tieren

Weiterhin wurde die Größe der Inseln und die Anzahl der β -Zellen in Pankreata von weiblichen Kontroll- und β GC-A KO-Tieren im Alter von 12 Wochen untersucht. Dazu wurden Insulin und die Zellkerne in Pankreasschnitten von beiden Genotypen immunhistochemisch angefärbt und morphometriert (Abb. 39C). Sowohl die β -Zellfläche pro Insel als auch die Anzahl der β -Zellen pro Insel waren in den β GC-A KO-Mäusen leicht verringert (Abb. 39A,B). Im Zusammenhang mit der verbesserten Glukosetoleranz und der erhöhten Glukose-stimulierten Insulinsekretion bei den β GC-A KO-Weibchen waren auch diese Ergebnisse unerwartet.

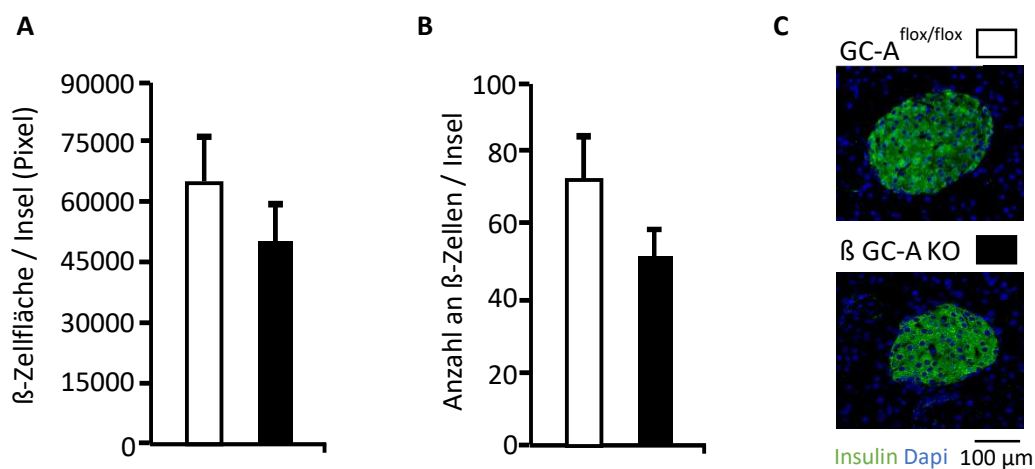


Abbildung 39: Morphometrische Auswertung der (A) β -Zellfläche pro Insel und der (B) Anzahl der β Zellen pro Insel sowie jeweils eine repräsentative immunhistochemische Färbung von Insulin und der Zellkerne (Dapi) anhand von Pankreas-Schnitten von weiblichen GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen (n=5 Mäuse pro Genotyp, 1 Schnitt pro Maus).

3.5.3 Östrogene stimulieren den intrazellulären cGMP-Gehalt in kultivierten Inseln von wildtypischen Mäusen

Als nächstes wurde der in Abschnitt 3.5.1 vermutete Zusammenhang zwischen dem Östrogenspiegel der Tiere und dem Unterschied der beiden Genotypen in der Glukosehomöostase näher untersucht. Um zu analysieren, ob Östrogene den GC-A-Rezeptor in kultivierten Inseln direkt aktivieren, wurden isolierte Inseln von wildtypischen Mäusen (GC-A +/+, AG M. Kuhn, Universität Würzburg) und Mäusen mit globaler Deletion des GC-A-Rezeptors (GC-A -/- (LOPEZ *et al.* 1995)) mit ANP oder 17 β -Östradiol (E2) inkubiert und der intrazelluläre cGMP-Gehalt bestimmt. Die ANP-Behandlung induzierte in den Inseln der GC-A +/+ Tiere eine konzentrationsabhängige Steigerung des cGMP-Gehalts (Abb. 40), welche in den Inseln der GC-A -/- Tiere ausblieb. Erstaunlicherweise führte auch die Inkubation mit 1 nM E2 zu

einer signifikanten Zunahme des cGMP-Gehalts der Inseln von GC-A +/+ Tieren. Dieser Effekt war in den Inseln der GC-A -/- Tiere aufgehoben. Die Effekte von 10 nM E2 waren zwar nicht signifikant, aber immerhin konnte der cGMP-Gehalt in den GC-A +/+ Inseln durch die Behandlung annähernd verdoppelt werden ($1,87 \pm 0,60$) und auch hier erfolgte keine cGMP-Antwort in den Inseln der globalen GC-A KO-Tiere. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass E2 den GC-A/cGMP-Signalweg stimuliert.

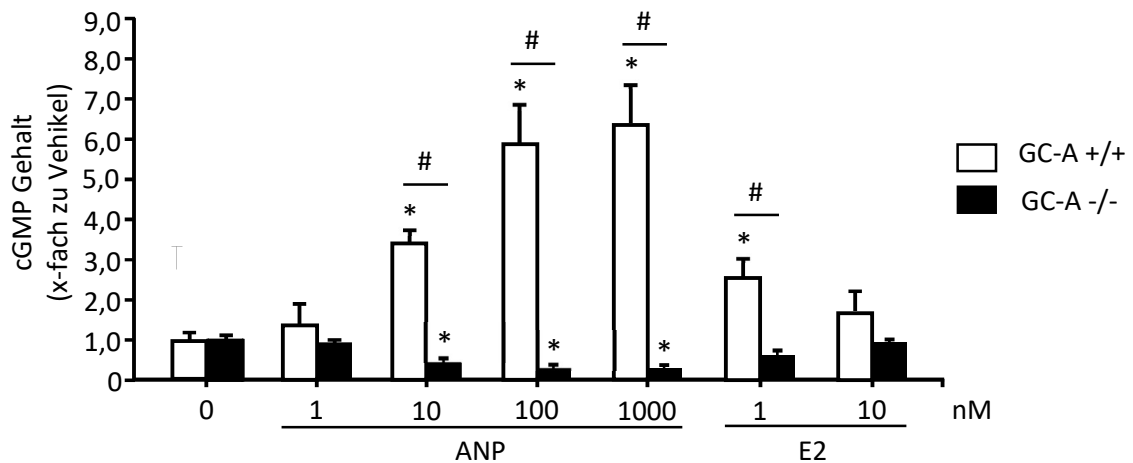


Abbildung 40: Effekte von ANP oder E2 auf den cGMP-Gehalt von isolierten Langerhans-Inseln aus GC-A +/+ und GC-A -/- Mäusen nach 15 Minuten Inkubation (n=2-4 Mäuse pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. Vehikel; # vs. Genotyp).

3.5.4 ANP und E2 induzieren die Ucp2 mRNA-Expression in kultivierten Inseln von Kontroll-Tieren

You and Laychock haben 2011 gezeigt, dass die chronische Inkubation isolierter Inseln mit ANP zu einer erhöhten Genexpression des Uncoupling Protein 2 (Ucp2) führt. Ucp2 ist ein mitochondriales Membranprotein, welches den Protonenfluss durch die innere mitochondriale Membran ohne Entstehung von ATP vermittelt und somit die Atmungskette entkoppelt (JABUREK *et al.* 1999). Während der physiologischen Glukose-stimulierten Insulinsekretion kommt es in β -Zellen durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel zum Abbau von Glukose und zur ATP-Produktion, welche wiederum über die Schließung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen die Insulinsekretion anregt. Einige Studien haben bereits nachgewiesen, dass Ucp2 in β -Zellen zu einem verminderten ATP/ADP Verhältnis und letzten Endes zu einer stark reduzierten Glukose-stimulierten Insulinsekretion führt (Abb. 41) (CHAN *et al.* 2001; ZHANG *et al.* 2001; AFFOURTIT AND BRAND 2008; GIRALT AND VILLARROYA 2017).

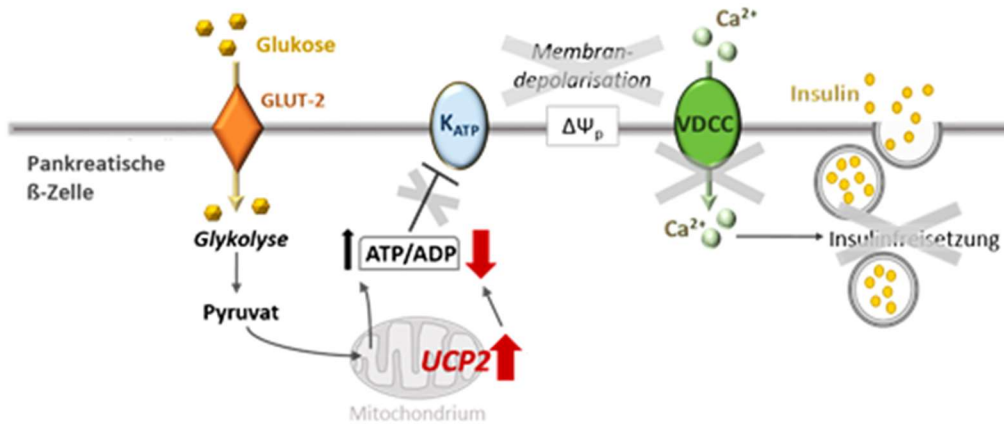


Abbildung 41: Erhöhte mitochondriale Ucp2-Expression führt in pankreatischen β -Zellen zu einem reduzierten ATP/ADP-Verhältnis und zu einer Abschwächung der GSIS (Mechanismus basierend auf publizierten Daten (CHAN *et al.* 2001)).

Auf Basis der genannten Studien und der Daten von You und Laychock wurde zunächst überprüft, ob die ANP-Inkubation isolierter Inseln von Kontroll-Tieren zu einer erhöhten Ucp2 mRNA-Expression führt. Abbildung 42 stellt dar, dass eine Behandlung über 24 h mit verschiedenen ANP-Konzentrationen die Ucp2-Expression etwa 1,5-fach erhöhte. In Inseln von β GC-A KO-Tieren blieb die Induktion durch ANP aus, was zeigte, dass diese über den GC-A-Rezeptor vermittelt wird.

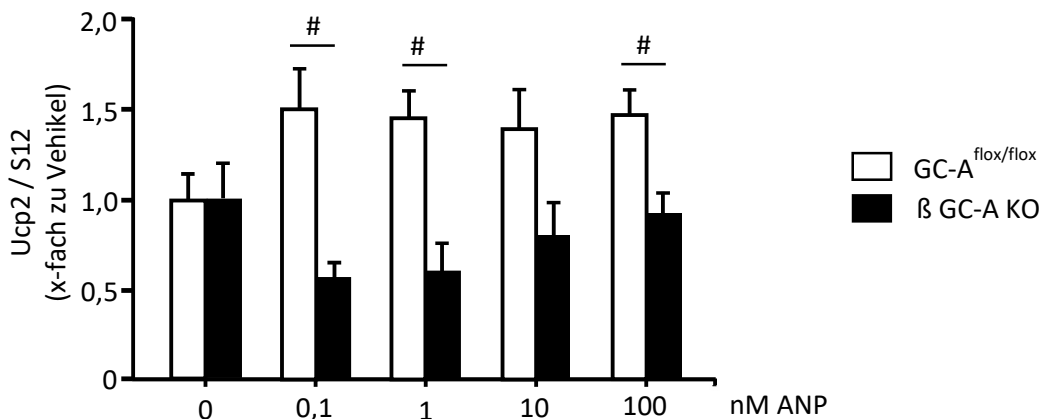


Abbildung 42: Ucp2 mRNA-Expression (normalisiert auf S12) in kultivierten Inseln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 24 h Inkubation ohne oder mit ANP (n=4-10 Ansätze á 50 Inseln pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; # vs. Genotyp).

Da E2 ebenfalls den GC-A/cGMP-Signalweg aktiviert (Abb. 40), untersuchten wir auch dessen Einfluss auf Ucp2. Eine 24-stündige Inkubation mit verschiedenen E2-Konzentrationen induzierte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Ucp2 mRNA-Expression (Abb. 43). Die Kombination von 10 nM E2 und 10 nM ANP verstärkte die Expression sogar auf das annähernd 10-fache im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Die Stimulation der Ucp2-Expression durch E2 alleine oder in Verbindung mit ANP wird durch den GC-A-Rezeptor vermittelt, da die Effekte in den Inseln der β GC-A KO-Tiere aufgehoben waren.

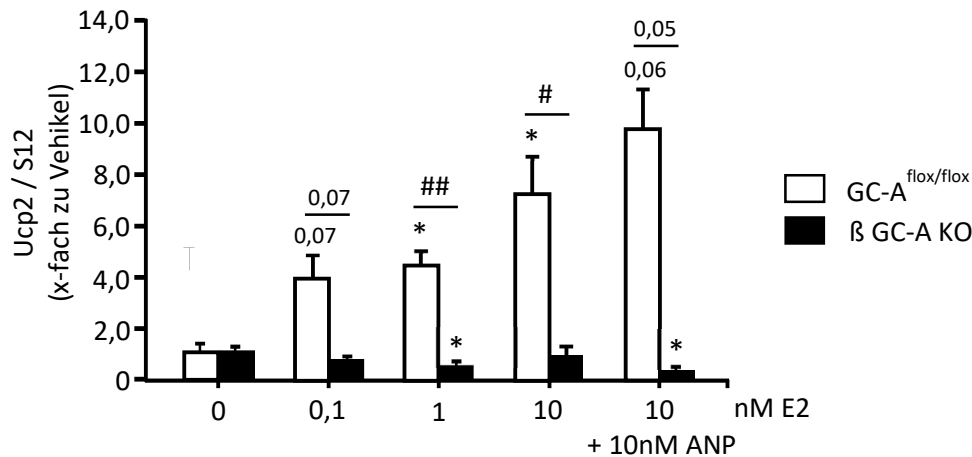


Abbildung 43: Ucp2 mRNA-Expression (normalisiert auf S12) in kultivierten Langerhans-Inseln von GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen nach 24 h Inkubation mit E2 ohne bzw. mit ANP (n=2-3 Ansätze à 50 Inseln pro Genotyp und Bedingung; p<0,05; * vs. Vehikel; # vs. Genotyp).

3.5.5 Verminderte Ucp2 mRNA-Expression in Inseln von weiblichen β GC-A KO-Tieren

Zuletzt wurde untersucht, ob sich die basale Ucp2 Genexpression in Inseln der beiden Genotypen unterscheidet. In Abbildung 44 ist zu erkennen, dass in den Inseln der β GC-A KO-Männchen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren die basale Expression von Ucp2 tendenziell erhöht war. Bei den Weibchen verhielt sich dies anders. Die Inseln der weiblichen β GC-A KO-Tiere hatten eine niedrigere basale Ucp2 Genexpression verglichen mit den Kontroll-Tieren. Diese Daten untermauern die in vitro beobachteten Effekte von ANP ± E2 auf die Ucp2 mRNA-Expression in isolierten Inseln und stellen eine Verbindung her zu den in vivo in weiblichen Tieren beobachteten Einflüssen der GC-A-Deletion auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion.

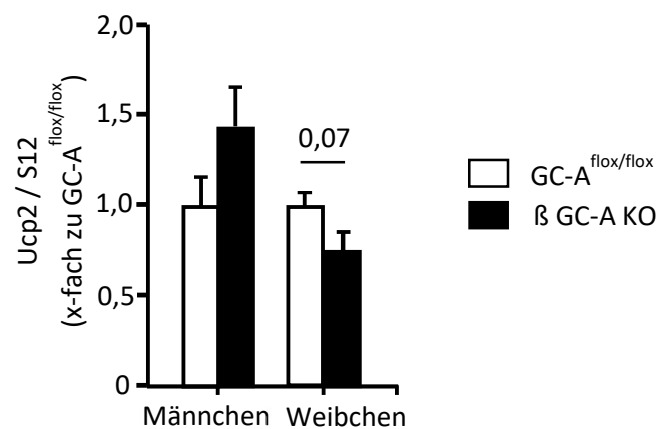


Abbildung 44: Ucp2 mRNA-Expression (normalisiert auf S12) in isolierten Inseln von männlichen sowie weiblichen GC-A^{flox/flox}- und β GC-A KO-Mäusen (n=6-12 Mäuse pro Genotyp und Geschlecht).

4 DISKUSSION

Die Natriuretischen Peptide ANP und BNP werden allgemein als kardiovaskulär und renal wirksame Hormone betrachtet (KUNN 2016). Weniger bekannt ist die Tatsache, dass sie den Fett- und Glukosestoffwechsel stark beeinflussen können. Über ihren gemeinsamen GC-A-Rezeptor verbessern sie unter anderem die Insulinsensitivität im Fettgewebe, Skelettmuskel und der Leber, wodurch sie eine Verbindung zwischen dem Herzen und dem Energiestoffwechsel herstellen können (JORDAN *et al.* 2018). Zudem ließen verschiedene epidemiologische, pharmakologische sowie in vitro-Studien vermuten, dass die kardialen Natriuretischen Peptide eine regulierende Rolle im endokrinen Pankreas, speziell für die insulinproduzierenden β -Zellen, ausüben (UEHLINGER *et al.* 1986; ROPERO *et al.* 2010; GRUDEN *et al.* 2014; SCHLUETER *et al.* 2014). Anhand dieser Studien entstand das Konzept, dass das sogenannte „Natriuretische Handicap“ bei Übergewichtigen nicht nur zu einer gestörten Insulinsensitivität führt, sondern vermutlich auch zu einer unzureichenden Insulinsekretion der β -Zellen (COUE AND MORO 2016; VERBOVEN *et al.* 2017). Die regulatorische Bedeutung dieser Herz hormone für die Insulinsekretion in vivo wurde allerdings nie eindeutig gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mittels eines neuen genetischen Mausmodells mit β -zellspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors untersucht, ob das endogene NP/GC-A-System die Funktion und/oder die Proliferation von β -Zellen unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen in vivo moduliert und ob es darin geschlechtsspezifische Unterschiede gibt.

4.1 Beeinflusst der endogene NP/GC-A-Signalweg in pankreatischen β -Zellen die Glukose-induzierte Insulin-Freisetzung unter physiologischen Bedingungen?

Zunächst lieferten in vitro-Versuche das Ergebnis, dass ANP die Glukose-stimulierte Insulinsekretion aus β -Zellen in isolierten Inseln von Kontroll-Mäusen steigert, was mit publizierten Daten übereinstimmt (ROPERO *et al.* 2010). Zudem wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Gisela Drews im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Dr. Sabrina Undank ein hemmender Effekt von ANP auf den K_{ATP} -Kanal nachgewiesen (UNDANK *et al.* 2017b), was ebenfalls die Ergebnisse von Ropero et al. (2010) untermauert. Diese akuten Effekte von ANP auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung sind an isolierten Inseln von β GC-A KO-Tieren aufgehoben, was belegt, dass die Wirkung des synthetischen, exogen zugeführten Peptids durch die Aktivierung des GC-A-Rezeptors auf β -Zellen vermittelt wird. Die Expression des GC-A-Rezeptors auf β -Zellen wurde bereits 1988 von Verspohl beschrieben und wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit mittels quantitativer RT-PCR sowie anhand immunhistochemischer Färbungen an Pankreas-Schnitten bestätigt. Weiterhin ist die Beteiligung des intrazellulären sekundären Botenstoffes cGMP an der ANP-stimulierten Insulinsekretion naheliegend.

Der steigernde Effekt von ANP auf den cGMP-Gehalt isolierter Inseln, welcher 1989 bereits an Inseln von Ratten nachgewiesen wurde (VERSPHOHL AND AMMON 1989), war an β GC-A KO-Tieren abgeschwächt. Ebenso wie die Rezeptor-Expression war auch dieser Effekt in den β GC-A KO-Mäusen nur vermindert, da der GC-A-Rezeptor durch die RIPCre-vermittelte Deletion einzig in den β -Zellen ausgeschaltet wird. In anderen Zelltypen innerhalb der Langerhans-Inseln der β GC-A KO-Mäuse, wie Endothelzellen (KUHNS 2009) und Glukagon-sezernierenden α -Zellen (s. Abb. 11, Abschnitt 3.1.2) blieb die GC-A-Expression erhalten. Die Beteiligung cGMP-abhängiger dritter Signalträger, wie cGKI (KUO 1974; ROPERO *et al.* 1999), PDE2A (ROSMAN *et al.* 1997; STEPHENSON *et al.* 2009) und PDE3B (ZHAO *et al.* 1997; HEIMANN *et al.* 2010), welche in pankreatischen Inseln und β -Zellen exprimiert sind, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ergebnisse der AG Kuhn aus einer Studie in Kooperation mit einer spanischen Arbeitsgruppe, welche zeigen, dass ANP über das GC-A/cGMP/cGKI-System die Effekte von Glukose auf die Insulinsekretion verbessert (ROPERO *et al.* 2010), wurden in einer kürzlichen Publikation bestätigt (UNDANK *et al.* 2017b). In vivo hatte die Ablation des GC-A-Rezeptors in β -Zellen allerdings keinen Einfluss auf physiologische und metabolische Parameter unter basalen Bedingungen. Im Gegensatz zu Mäusen mit konventioneller, globaler GC-A-Deletion, welche diverse systemische Veränderungen wie Bluthochdruck, Herzhypertrophie und erhöhten Sympathikustonus aufweisen (KUHNS 2009), hatten sowohl männliche als auch weibliche β GC-A KO-Tiere im Vergleich zu Kontroll-Tieren einen normalen arteriellen Blutdruck und unverändertes Körpergewicht. Ebenfalls unbeeinträchtigt war die basale Insulin- und Glukosehomöostase in den β GC-A KO-Tieren, da sie ähnliche Nüchtern-Blutzucker- und Insulinspiegel (nach Fasten über Nacht) zeigten wie die Kontroll-Mäuse. Die orale Glukosetoleranz und die GSIS hingegen waren nur in den männlichen Mäusen unverändert zwischen den Genotypen (Abschnitt 3.5.1). Auf den in den β GC-A KO-Weibchen beobachteten Phänotyp einer verbesserten oralen Glukosetoleranz und gesteigerten GSIS wird in Abschnitt 4.4 genauer eingegangen. Die ansonsten niedrigeren Blutdruckwerte, das geringere Körpergewicht sowie die niedrigeren basalen Blutzuckerspiegel der Kontroll- sowie β GC-A KO-Weibchen im Vergleich zu männlichen Geschwistertieren lassen sich vermutlich auf bekannte geschlechtsspezifische Unterschiede in einigen Mausstämmen zurückführen (NISHIKAWA *et al.* 2007; VENTURA-CLAPIER *et al.* 2017). Im Rahmen dieser Dissertation wurde zudem die Glukosetoleranz in vivo mittels eines intraperitonealen Glukosetoleranztests (ipGTT) untersucht, da eine in vitro-Studie an isolierten Inseln gezeigt hatte, dass ANP den insulinotropen Effekt des Inkretinhormons Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) verstärkt (UNDANK *et al.* 2017b). Oral oder intraperitoneal verabreichte Glukose hatte allerdings ähnliche Auswirkungen auf die Blutzuckerspiegel beider Genotypen, weshalb wir einen steigernden Effekt von endogenem ANP auf Inkretine in vivo ausschließen (TAUSCHER *et al.* 2018).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das endogene NP/GC-A-System in pankreatischen β -Zellen für die basale oder postprandiale Insulinsekretion unter physiologischen Bedingungen in vivo entbehrlich ist bzw. keinen regulierenden Einfluss hat.

4.2 Verbessert ein Anstieg der NP-Plasmaspiegel die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von pankreatischen β -Zellen?

Eigene Daten und in vitro-Studien anderer zeigten, dass ANP und/oder BNP über den GC-A-Rezeptor, die Stimulus-Sekretions-Kopplung von β -Zellen akut steigern können. Sie unterstützen dadurch das Konzept einer NP-vermittelten Achse zwischen dem Herzen und dem endokrinen Pankreas, durch welche die physiologische, postprandiale Insulinsekretion verstärkt wird (GRUDEN *et al.* 2014; UNDANK *et al.* 2017b; VERBOVEN *et al.* 2017). Allerdings waren die eingesetzten Konzentrationen an synthetischem ANP mit 10 nM mehr als hundertfach höher als die normalen, physiologischen ANP-Spiegel. Diese liegen bei gesunden Menschen zwischen 3 - 20 pM (RADEMAKER AND RICHARDS 2005) und bei Mäusen zwischen 100 - 200 pM (LOPEZ *et al.* 1997). Nach einer Mahlzeit beispielsweise steigen die Plasmakonzentrationen an ANP nur leicht um etwa 10 % an (SONNE *et al.* 2017). Im Gegensatz zu den akuten insulinotropen Effekten von 10 nM ANP in vitro (an isolierten Inseln oder kultivierten β -Zellen) führte die intraperitoneale Injektion einer hohen Dosis von synthetischem ANP an Mäusen sogar zu einer deutlich abgeschwächten GSIS. Dieser Effekt war ebenso in den β GC-A KO-Tieren zu beobachten und ist deshalb nicht auf eine direkte inhibitorische Wirkung von ANP auf die β -Zellen zurückzuführen. Akute Injektionen von NPs führen in der Tat zu zahlreichen systemischen Veränderungen (POLLACK *et al.* 1997; BRUNNER AND WOLKART 2001; HOLTWICK *et al.* 2002). Frühere Versuche aus der Arbeitsgruppe zeigten, dass i.p. injiziertes ANP in der hier verwendeten Konzentration bei Kontroll-Tieren zu einem sofortigen Abfall des systolischen und diastolischen Blutdrucks führt (HOLTWICK *et al.* 2002). Dieser akute Blutdruckabfall bewirkt vermutlich eine Aktivierung des Sympathikus (IZZO AND TAYLOR 1999), welche wiederum die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen hemmt (PORTE AND ROBERTSON 1973). Höhere akute Anstiege der ANP/BNP-Plasmaspiegel um das 2 - 10-fache sind bei Sport (MORO *et al.* 2008) oder Kälteexposition (BORDICCHIA *et al.* 2012) zu beobachten. Auch hier kommt es schnell zu einer durch den Sympathikus koordinierten, verminderten Insulinsekretion, um die Glukosehomöostase während des erhöhten Glukoseverbrauchs im Gewebe aufrecht zu erhalten (MORO *et al.* 2008; MORTON *et al.* 2017).

Im Gegensatz zu der akuten Injektion führte die chronische Applikation einer niedrigen BNP-Dosis bei den Kontroll-Tieren zu einer verbesserten Insulinsekretion, erhöhten basalen Plasma-Insulinspiegeln, einer gesteigerten GSIS sowie einer gesteigerten Glukosetoleranz. Zudem induzierte das infundierte BNP, vermutlich über die verstärkte Insulinfreisetzung, in den Kontroll-Mäusen eine erhöhte Translokation von GLUT-4 im Skelettmuskel, was zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Zellen führen kann. Diese stimulatorischen Effekte von BNP werden über die Aktivierung des GC-A-Rezeptors der β -Zellen vermittelt, da sie in den β GC-A KO-Tieren ausblieben.

Auffällig war weiterhin, dass das Körpergewicht der Kontroll-Tiere nach der BNP-Infusion signifikant reduziert war. Für diese Gewichtsreduktion sprechen die bekannten metabolischen Effekte der NPs. Dazu zählen eine verbesserte Insulinsensitivität (BIRKENFELD *et al.* 2012), gesteigerte Lipolyse (MORO *et*

al. 2004), eine erhöhte mitochondriale Biogenese sowie Fettoxidation im Skelettmuskel (MIYASHITA *et al.* 2009), ein erhöhter Energieverbrauch durch Thermogenese im braunen Fettgewebe (BORDICCHIA *et al.* 2012) und eine verringerte Nährstoff- und Nahrungsaufnahme (ADDISU *et al.* 2011; VILA *et al.* 2012). Es wird sogar diskutiert, dass die bei Herzinsuffizienz chronisch erhöhten Plasmaspiegel an BNP aufgrund der lipolytischen Eigenschaften und der Aktivierung des oxidativen Stoffwechsels zu Gewichtsverlust und kardialer Kachexie beitragen können (CHRISTENSEN *et al.* 2013; MARTINS *et al.* 2014; SCHLUETER *et al.* 2014). Warum der Effekt von BNP auf das Körpergewicht bei den β GC-A KO-Tieren ausblieb, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da der GC-A-Rezeptor in allen anderen Geweben erhalten ist, hätte das exogene BNP zu einer Gewichtsreduktion durch die genannten Effekte führen müssen. Inwiefern die NP/GC-A-vermittelte Stimulation der Insulin-Sekretion durch die pankreatischen β -Zellen eine direkte Rolle spielt, erfordert weitere Untersuchungen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser pharmakologischen Versuche in Übereinstimmung mit anderen Studien keine direkten Effekte von akuten Anstiegen der NP-Plasmaspiegel auf die Glukose- und Insulinhomöostase *in vivo* (HEINISCH *et al.* 2012; COUE *et al.* 2015). Solche rapiden Anstiege bringen immer zahlreiche systemische Veränderungen mit sich, welche, sei es direkt oder durch Aktivierung des sympathischen Systems, vermutlich jeglichen direkten stimulatorischen Effekt der NPs auf die β -Zellen kompensieren oder verhindern. Dass hingegen chronisch erhöhte NP-Plasmaspiegel die Glukosetoleranz *in vivo* verbessern, haben andere pharmakologische (PLANTE *et al.* 2014; COUE *et al.* 2015) sowie genetische (MIYASHITA *et al.* 2009) Studien bereits nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die stimulierenden Effekte von NPs auf die GSIS direkt über den GC-A-Rezeptor von pankreatischen β -Zellen vermittelt werden. Funktionell relevant könnten diese Beobachtungen bei (patho)physiologischen Zuständen mit erhöhter kardialer Freisetzung von ANP und/oder BNP sein.

4.3 Welche Bedeutung hat das endogene NP/GC-A-System für die Funktion und Vitalität pankreatischer β -Zellen unter pathologischen Bedingungen eines experimentell induzierten Diabetes Mellitus Typ 2?

Wie hier zuvor gezeigt und diskutiert, hat das endogene NP/GC-A-System für die Funktion von pankreatischen β -Zellen unter basalen, physiologischen Bedingungen keine kritische Bedeutung. Frühere Studien an Tieren mit zellspezifischer GC-A-Deletion in Kardiomyozyten, Endothelzellen oder renalen Podozyten zeigen allerdings, dass der jeweilige Knockout unter pathologischen Zuständen durchaus Auswirkung auf den Verlauf des kardialen Remodeling (HOLTWICK *et al.* 2003), der Angiogenese (KUHN *et al.* 2009) oder der Regeneration von Podozyten (STAFFEL *et al.* 2017) hat. Um zu untersuchen, ob ein gestörter NP/GC-A-Signalweg in β -Zellen deren Anfälligkeit für diabetogene Reize erhöht, wurde β GC-A KO- und Kontroll-Tieren über mehrere Wochen eine HFD gefüttert.

4.3.1 Einfluss der HFD auf physiologische Parameter, NP-Plasmaspiegel und -Genexpression

Es ist bekannt, dass Mäuse unter den Bedingungen einer HFD Fettleibigkeit (SPEAKMAN *et al.* 2007), arteriellen Bluthochdruck (CHAAR *et al.* 2016) sowie Insulinresistenzen (BARIBAULT 2010) entwickeln. Auch in der vorliegenden Arbeit führte die HFD bei beiden Genotypen zu einer gleichmäßigen, deutlichen Gewichtszunahme sowie einem erhöhten arteriellen Blutdruck. Ein Zusammenhang zwischen HFD und der Entstehung von Bluthochdruck wurde bereits beschrieben und wird erklärt durch eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems (CHAAR *et al.* 2016). Desweiteren ist in den hier untersuchten Tieren die kardiale mRNA-Expression von BNP unter HFD deutlich höher als unter ND. Die erhöhte Expression wurde vermutlich hervorgerufen durch den arteriellen Bluthochdruck und die Herzbelastung (SERGEEVA AND CHRISTOFFELS 2013). Eine erhöhte BNP-Expression in Herzen von Wildtypmäusen (C57BL/6) unter HFD wurde bereits gezeigt (LUCAS *et al.* 2016). Eine Erklärung dafür, dass nur die Genexpression von BNP (nicht von ANP) verändert ist, könnte sein, dass es durch das HFD-induzierte Übergewicht zur Entstehung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α kommt (DA COSTA *et al.* 2016). Von diesen ist bekannt, dass sie die Synthese und Sekretion von BNP, nicht aber von ANP stimulieren (KUHN 2016). Trotz der erhöhten mRNA-Expression waren die Plasmaspiegel von BNP unter HFD niedriger als unter ND. Diese Beobachtung stimmt überein mit vielen klinischen und experimentellen Studien, welche gezeigt haben, dass Übergewichtige und Typ 2 Diabetiker erniedrigte NP-Plasmaspiegel aufweisen (RAMOS *et al.* 2015). Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es für den als „Natriuretisches Handicap“ bezeichneten, systemischen Mangel an NPs bei Übergewicht, Insulinresistenz und T2D verschiedene Erklärungsansätze. Eine erhöhte Expression des NPR-C-Rezeptors in Skelettmuskel und Fettgewebe wurde sowohl bei Mäusen unter HFD als auch bei genetischen Mausmodellen für T2D nachgewiesen und erscheint hier am wahrscheinlichsten, wurde allerdings nicht näher untersucht (MIYASHITA *et al.* 2009; COUE *et al.* 2015). Während die systemischen Effekte der HFD auf den Bluthochdruck, die BNP-Expression und den BNP-Plasmaspiegel in beiden Genotypen ähnlich waren, zeigten die isolierten Inseln der β GC-A KO-Tiere nach HFD einen deutlich reduzierten Gehalt an cGMP. Begründet ist dies in der lokalen Deletion des GC-A-Rezeptors auf den β -Zellen der Inseln.

4.3.2 Rolle des endogenen NP/GC-A-Systems für die Glukose/Insulin-Homöostase bei Übergewicht-induzierter Insulinresistenz

Dass das endogene NP/GC-A-System eine Bedeutung für die pankreatischen β -Zellen unter pathologischen Bedingungen hat, zeigt das Ergebnis, dass die β GC-A KO-Tiere bereits nach 8 Wochen HFD eine stärkere Glukoseintoleranz im oGTT als die Kontroll-Geschwistertiere aufwiesen. Dieser genotypabhängige Unterschied verschwand nach 16 Wochen Diät, als sich die Glukosetoleranz der Kontroll-Tiere weiter auf ein ähnliches Niveau wie das der β GC-A KO-Tiere verschlechterte. Die

Insulintoleranz der Mäuse hingegen war während der Diät nicht verschieden zwischen den Genotypen. Dies war zu erwarten, da die GC-A-Deletion in den β -Zellen keinen Einfluss auf die periphere Insulinsensitivität der Tiere haben sollte. Anders als erwartet jedoch zeigten die HFD-gefütterten Tiere keine Insulinresistenzen in den durchgeführten ITTs. Lediglich die basalen Blutzuckerwerte, welche im Rahmen des ITT nach 4 h Fasten gemessen wurden, waren in den Genotypen unter HFD leicht erhöht, was auf Insulinresistenzen hinweist. Andere Studien haben gezeigt, dass die Fütterung einer HFD mit 60 % Energiegewinn aus Fett frühzeitiger zu einer deutlichen Ausprägung von Insulinresistenzen führt (SPEAKMAN *et al.* 2007; MOSSER *et al.* 2015). Dennoch ist zu berücksichtigen, dass Unterschiede im genetischen Hintergrund der Tiere oder in der Zusammensetzung des Futters zu Differenzen im Verlauf und/oder der Manifestation eines (Prä-)Diabetes beitragen können (HEYDEMANN 2016). Für eine kompensatorische Hyperinsulinämie, wie sie unter Insulinresistenzen auftritt, sprechen auch die nach 8 Wochen HFD deutlich erhöhten basalen C-Peptid- und Insulinspiegel. Allerdings zeigten sich hier, wie auch in der GSIS, keine genotypabhängigen Unterschiede unter HFD.

Die Diskrepanz zwischen der erhöhten Glukoseintoleranz der β GC-A KO-Tiere und der ähnlichen Insulinsekretion im Vergleich zu den Kontroll-Tieren führte zu der Annahme, dass die β -Zellen ohne den GC-A-Rezeptor den erhöhten Insulinbedarf unter der stärkeren Blutzuckerentgleisung nicht ausreichend kompensieren können. Die zudem deutlich verminderte GLUT-4-Translokation im Skelettmuskel der β GC-A KO-Tiere spricht ebenso für einen gestörten Insulinsignalweg. Da die Reaktion auf das exogene Insulin während des ITTs zwischen den Genotypen nicht verschieden war, vermuten wir, dass die β -Zellen der β GC-A KO-Mäuse vermehrt unprozessiertes, biologisch weniger aktives Proinsulin ausschütten. Allerdings können kommerzielle ELISA Kits für murines Insulin nicht zwischen den beiden Formen unterscheiden. Diese These wird unterstützt durch die kürzliche Beobachtung, dass der Verlust des Akt/mTORC1-Signalweges, welcher protektive Effekte von NP/GC-A in β -Zellen vermittelt (YOU AND LAYCHOCK 2009), nicht nur die β -Zellhomöostase, sondern auch die Prozessierung von Insulin beeinträchtigt (BLANDINO-ROSANO *et al.* 2017). In klinischen Studien weisen erhöhte Proinsulinspiegel während eines oGTTs auf eine fortschreitende β -Zelldysfunktion und die Entstehung von T2D hin (PFUTZNER *et al.* 2015). Auch unter ND zeigten die β GC-A KO-Tiere eine tendenziell verminderte Translokation von GLUT-4 in die Plasmamembran der Skelettmuskel. Da die Tiere unter den physiologischen Bedingungen der ND, anders als unter HFD, keinen erhöhten Insulinbedarf haben, zeigten sich bei ihnen keine Veränderungen in der Glukosetoleranz. Der beobachtete Zusammenhang zwischen der GC-A-Deletion in β -Zellen, der Insulinprozessierung sowie der verminderten GLUT-4-Translokation in peripherem Gewebe benötigt weitere Untersuchungen.

4.3.3 Effekte des NP/GC-A-Signalweges auf die adaptive β -Zellproliferation unter HFD

Abgesehen von den verschiedenen kardiovaskulären und metabolischen Effekten üben NPs auch Effekte auf das Wachstum und die Proliferation von Zellen aus. Einerseits hemmen sie die Hypertrophie von Kardiomyozyten (HOLTWICK *et al.* 2003) und die Zellteilung von Fibroblasten (TAMURA *et al.* 2000), andererseits stimulieren sie wiederum die Proliferation von Endothelzellen (KUHN 2012) oder renalen Podozyten (STAFFEL *et al.* 2017). Zudem ist bekannt, dass ANP die Proliferation von kultivierten β -Zellen aus pankreatischen Inseln von Ratten und Insulinom-Zellen (INS-1E) über die GC-A/cGMP-abhängige Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und des Akt/Foxo1a/Cyclin D2-Signalweges stimulieren kann (YOU AND LAYCHOCK 2009). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen erhöhte ANP die mRNA-Expression von Cyclin D2 in den β -Zellen isolierter, kultivierter Inseln von Kontroll-Tieren, nicht jedoch von β GC-A KO-Tieren. Unter physiologischen Bedingungen proliferieren β -Zellen aber kaum. Im Anfangsstadium eines klinischen oder experimentell induzierten T2D, z.B. unter Übergewicht, kompensiert der endokrine Pankreas die auftretenden Insulinresistenzen indem er die β -Zellmasse und die Insulinsekretion erhöht (LINGOHR *et al.* 2002; MEZZA *et al.* 2014). Im weiteren Verlauf kommt es aufgrund des Versagens der β -Zellen durch einen Zellverlust und verminderter Insulinsekretion der verbleibenden Zellen zur Manifestation des Diabetes (RHODES 2005). Ob das endogene NP/GC-A-System in solch einer Situation neben der Insulin-Sekretion ebenfalls die Proliferation der β -Zellen moduliert, wurde innerhalb der durchgeführten Diätinterventionen an Kontroll- und β GC-A KO-Tieren untersucht. Die Fütterung einer HFD führt bei Mäusen nachgewiesenermaßen neben Übergewicht, Bluthochdruck und Insulinresistenzen ebenso zu einer erhöhten β -Zellproliferation (AHREN *et al.* 2010; GOLSON *et al.* 2010; OLIVEIRA *et al.* 2015). In den Kontroll-Mäusen der vorliegenden Arbeit war sowohl die Größe der endokrinen Inseln, die Anzahl der β -Zellen pro Insel als auch die Expression von Cyclin D2 in isolierten Inseln bereits 2 Monate nach Beginn der HFD erhöht. Die Expression des Zellzyklusmarkers Ki-67 war allerdings im Vergleich zu den Kontroll-Tieren nach 8-wöchiger ND sowie HFD leicht verringert, was unerwartet war, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine HFD-induzierte β -Zellproliferation mit erhöhter Ki-67 mRNA-Expression einhergeht (STAMATERIS *et al.* 2013). Eine neuere Studie hat jedoch hervorgebracht, dass Ki-67 weniger für die Zellproliferation direkt verantwortlich ist, sondern vielmehr für die Organisation von Heterochromatin und der damit verbundenen Transkription Zellzyklus-relevanter Gene (SOBECKI *et al.* 2016). Demnach können auch Zellen mit einer verminderten Expression von Ki-67 effizient proliferieren. Auffallend war, dass die adaptiven morphologischen (Proliferation) sowie molekularen Veränderungen (gesteigerte Cyclin D2-Expression) in den β GC-A KO-Tieren nicht auftraten und das zu einem Zeitpunkt, an dem diese Tiere im oGTT bereits eine deutlichere Glukoseintoleranz als die entsprechenden Kontroll-Tiere aufwiesen. An dieser Stelle sei nochmals auf die bereits diskutierten, unveränderten Insulinspiegel zwischen den beiden Genotypen unter HFD hingewiesen. Frühere Studien haben bereits zeigen können, dass β -Zellen mit einer ähnlich gestörten

Zellproliferation wie in dieser Arbeit, Insulinresistenzen kompensieren können, indem sie die Insulinsekretion erhöhen (KIM *et al.* 2007). Welcher Mechanismus konkret im weiteren Verlauf letztendlich für die ausgeprägtere Glukoseintoleranz in den β GC-A KO-Tieren unter der HFD ausschlaggebend ist, bedarf, wie bereits erwähnt, weiterer Untersuchungen. Insgesamt gesehen scheint neben der sekretorischen Funktion ebenso die Vitalität der β -Zellen unter den pathologischen Bedingungen der HFD stärker und frühzeitiger beeinträchtigt zu sein wenn das NP/GC-A-System dieser Zellen fehlt.

4.3.4 Auswirkung des NP/GC-A-Systems auf die Expression Diabetes-bezogener Gene in pankreatischen Inseln

Zusätzliche Hinweise auf die Bedeutung des endogenen NP/GC-A-Systems für die β -Zellen in Zusammenhang mit einem experimentell induzierten T2D sollte die Validierung von ausgewählten Diabetes-bezogenen Genen liefern, deren Expression in einer vorgeschalteten Gene Array-Analyse besonders auffällig waren. Die erhöhte Expression von Gsk3b in den Inseln der HFD-gefütterten β GC-A KO-Tiere ist ein weiteres Anzeichen dafür, dass das endogene NP/GC-A-System eine Rolle bei der adaptiven Proliferation der β -Zellen spielt, da Gsk3b in β -Zellen nachgewiesenermaßen anti-proliferative und pro-apoptotische Eigenschaften besitzt (LIU *et al.* 2010). Ein direkter Effekt von ANP auf die Expression von Gsk3b konnte bisher nicht nachgewiesen werden, allerdings wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von Gsk3b und Natriuretischen Peptiden gezeigt. In der kardialen Myoblasten-Zelllinie H9c2 wird Gsk3b durch ANP sowohl über den cGMP/PKG- als auch den PIK3/Akt-Signalweg inaktiviert (HONG *et al.* 2012). Außerdem konnten Chaudhary *et al.* (2009) in isolierten Mausherzen beobachten, dass BNP Gsk3b über den GC-A-Rezeptor inhibiert.

Die Expression des β -zellspezifischen Transkriptionsfaktors Pdx1 in den Inseln der Mäuse nach der Diätintervention war erstaunlicherweise weitestgehend unverändert. Nachgewiesen ist, dass Pdx1 wichtig ist für das Überleben und die Insulinsekretion von β -Zellen und dass eine reduzierte Expression einhergeht mit verminderter β -Zellproliferation sowie dem Versagen der β -Zelle bei der Progression zum Typ 2 Diabetes (SACHDEVA *et al.* 2009). Der leichte Anstieg der mRNA-Expression in den Kontroll-Tieren deutet darauf hin, dass die HFD unter Beteiligung des ANP/GC-A-Systems zu diesem Zeitpunkt der Diät eine verbesserte β -Zellfunktion und/oder eine vermehrte Proliferation induziert. Dass ANP die Expression von Pdx1 stimuliert, wurde bereits an kultivierten Inseln und der β -Zelllinie INS-1E beobachtet (YOU AND LAYCHOCK 2009). Das vorläufige Ergebnis der Gene Array-Analyse, dass die Expression in den β GC-A KO-Tieren unter HFD sehr stark vermindert ist, konnte jedoch nicht reproduziert werden.

Auch die Validierung von Ucp2 stimmte nicht vollständig mit den Daten aus dem Gene Array überein. In den Inseln der Kontroll-Tiere unter HFD war die Expression deutlich höher als in denen der β GC-A KO-

Tiere. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von Ucp2 und der ANP-induzierten Produktion von cGMP in isolierten Inseln konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden (YOU AND LAYCHOCK 2011). Die Expression von Ucp2 ist in β -Zellen unter HFD aufgrund von glukolipotoxischen Bedingungen meist hochreguliert und ist begleitet von einer gestörten Glukose-stimulierten Insulinsekretion sowie der Entstehung von T2D (ZHANG *et al.* 2001; CHAN *et al.* 2004; AFFOURTIT AND BRAND 2008). Dies stimmt nicht überein mit dem hier beobachteten genotypabhängigen Unterschied unter HFD, da die β GC-A KO-Tiere nach 8 Wochen einen weitaus schlechteren oGTT bei unveränderter GSIS zeigten. Eine neuere Studie aus dem Jahr 2017 (LI *et al.*) hat allerdings belegt, dass eine erhöhte Expression von Ucp2 β -Zellen vor Glukotoxizität sowie oxidativem Stress schützt und dass die Apoptoserate dieser β -Zellen geringer ist. Mäuse mit einem β -zellspezifischen Knockout von Ucp2 zeigen zudem aufgrund einer erhöhten Glukagonsekretion aus pankreatischen alpha-Zellen eine gestörte Glukosetoleranz (ROBSON-DOUCETTE *et al.* 2011).

Leider sind die Ergebnisse aus der hier durchgeführten Gene Array-Analyse und der nachfolgenden Validierung der Genexpression in den Inseln nicht immer eindeutig. Es ist bekannt, dass die verschiedenen Schritte bei der Inselpräparation oder der Kultivierung der Inseln Einfluss auf die Genexpression haben können (DREJA *et al.* 2010; GILL *et al.* 2011). Die Reproduktion der Ergebnisse sowie die Validierung weiterer Gene aus der Array-Analyse mit einer unabhängigen Methode oder sogar anhand einzelner β -Zellen wäre sinnvoll. Nichtsdestotrotz zeigt die vorliegende Arbeit, dass das endogene NP/GC-A-System pankreatischer β -Zellen vor allem unter pathologischen Bedingungen die adaptive sekretorische Funktion und Vitalität dieses Zelltyps verbessert.

4.4 Welche Mechanismen sind beteiligt an den geschlechtsabhängigen Unterschieden im Einfluss der β -zellspezifischen GC-A-Deletion auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion?

Schon lange ist bekannt, dass durch die grundlegenden biologischen Unterschiede zwischen den Geschlechtern nahezu alle Aspekte des Stoffwechsels, einschließlich der Energiebilanz sowie des Glukose- und Lipidstoffwechsels, reguliert und die Pathogenese der meisten, wenn nicht gar aller Krankheiten, einschließlich Fettleibigkeit und Diabetes, beeinflusst werden (MAUVAIS-JARVIS 2015). T2D wird bei Männern häufiger in jüngeren Jahren und bei niedrigerem BMI diagnostiziert; bei Frauen hingegen wird häufiger der bedeutendste Risikofaktor, nämlich das Übergewicht, beobachtet (KAUTZKY-WILLER *et al.* 2016). Umso wichtiger ist es daher das Geschlecht als biologische Variable bereits in der präklinischen Forschung mit einzubeziehen und nicht nur, wie bisher meist üblich, männliche Tiere, sondern auch weibliche Tiere zu betrachten (ZUCKER AND BEERY 2010; CLAYTON AND COLLINS 2014; MAUVAIS-JARVIS *et al.* 2017a).

4.4.1 Gegensätzliche Effekte der β -zellspezifischen GC-A-Deletion auf die Insulin/Glukose-Homöostase bei männlichen und weiblichen Tieren

Das vielleicht auffälligste und konsistenteste Ergebnis der in vivo-Studien in dieser Arbeit ist der geschlechtsspezifische Unterschied in der Auswirkung der β -zellspezifischen GC-A-Deletion auf die GSIS. Während bei den männlichen β GC-A KO-Tieren die basalen und die Glukose-stimulierten Insulinspiegel nicht verändert waren, zeigten die weiblichen β GC-A KO-Tiere tendenziell höhere basale (Nüchtern-) Insulinspiegel sowie eine deutlich verstärkte GSIS. Dementsprechend war die Glukosetoleranz während den oGTTs der β GC-A KO-Männchen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren unverändert, bei den weiblichen β GC-A KO-Tieren hingegen erheblich verbessert. Ebenfalls eine verstärkte GSIS konnten Ropero et al. bereits 2010 an isolierten Inseln von Weibchen mit globaler GC-A-Deletion nachweisen. Als Ergänzung der hier geschilderten Beobachtungen in vivo wäre es sinnvoll diese in vitro-Versuche an Inseln mit β -zellspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors von Männchen und Weibchen zu reproduzieren. Interessanterweise hatten die globalen GC-A KO-Weibchen ebenfalls eine geringere β -Zellfläche und weniger β -Zellen verglichen mit den Kontroll-Tieren, ähnlich zu der vorliegenden Arbeit. Diese Tatsache ist wiederum erklärbar durch den hier beobachteten Zusammenhang zwischen dem ANP/GC-A-System und der Proliferation von β -Zellen. In der Studie mit dem Diät-induzierten Diabetes wiesen die Inseln der männlichen β GC-A KO-Tiere unter ND sogar eine tendenziell größere β -Zellfläche mit geringfügig mehr β -Zellen pro Insel auf. Für konkretere Aussagen zu diesen morphologischen Unterschieden wäre eine Wiederholung der morphometrischen Analysen mit Pankreata von gleichaltrigen männlichen und weiblichen Tieren beider Genotype wichtig.

4.4.2 Einfluss von Östrogenen auf das endogene NP/GC-A-System von pankreatischen β -Zellen

Aufgrund der Tatsache, dass die in den weiblichen β GC-A KO-Tieren verstärkte GSIS mit der einhergehenden, verbesserten Glukosetoleranz in über 20 Monate alten Weibchen nicht mehr zu beobachten war, vermuteten wir einen Zusammenhang mit dem Östrogenspiegel der Tiere. Ab einem Alter von 18 Monaten tritt bei Mäusen die Menopause mit einer zunehmend verringerten Östrogenproduktion ein (MOBBS *et al.* 1984). Dass Östrogene eine Bedeutung für den Glukose- und Energiestoffwechsel haben, ist lange bekannt (GODSLAND 1996; ROPERO *et al.* 2008; ALLAN 2014). Sie vermitteln diese Effekte aber nicht nur über periphere Gewebe wie Muskel, Leber und Fettgewebe, sondern auch über direkten Einfluss auf die Proliferation, das Wachstum und die Funktion pankreatischer β -Zellen (GODSLAND 2005; NADAL *et al.* 2009; LIU AND MAUVAIS-JARVIS 2010; MAUVAIS-JARVIS 2016), was die in dieser Arbeit erhobenen Daten erklären könnte. In vitro konnte bereits ein

Zusammenhang zwischen 17β -Östradiol (E2), dessen Rezeptor (Östrogen-Rezeptor β , ER β) und dem GC-A/cGMP-System auf β -Zellen gezeigt werden (ROPERO *et al.* 1999; SORIANO *et al.* 2009). Da diese Effekte an Inseln von globalen GC-A KO-Mäusen aufgehoben waren, wird eine Verbindung zwischen ER β und dem GC-A/cGMP/PKG-System vermutet (SORIANO *et al.* 2009). Übereinstimmend damit konnte nachgewiesen werden, dass Östrogene den intrazellulären Gehalt an cGMP von isolierten Inseln über den GC-A-Rezeptor stimulieren, da die cGMP-Antwort in den Inseln von globalen KO-Tieren ausblieb. Unsere Daten bestätigen somit außerdem die Ergebnisse einer Studie aus dem Jahr 2007, in welcher eine direkte Aktivierung des GC-A-Rezeptors mit nachfolgender cGMP-Antwort durch E2 in glatten Muskelzellen nachgewiesen wurde (EL-MOWAFY *et al.*). Desweiteren ist bekannt, dass E2 über ER β in isolierten Inseln den GC-A-Rezeptor stimuliert und so über den cGMP/PKG-Signalweg die Glukose-abhängigen Effekte auf die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen, intrazelluläre Ca^{+} -Signale sowie die Insulin-Sekretion verbessert (SORIANO *et al.* 2011). Würde genau dieser Signalweg in den β GC-A KO-Tieren wegfallen, ginge dies jedoch mit einer verminderten GSIS einher. Da die GSIS in den weiblichen β GC-A KO-Tieren in der vorliegenden Arbeit allerdings verstärkt war, muss eine alternative Signalkaskade involviert sein.

4.4.3 Interaktion von Östrogenen und dem NP/GC-A/cGMP-System bei der Stimulation der Ucp2-Expression

Eine Studie von You und Laychock hatte 2011 gezeigt, dass die chronische Inkubation isolierter Inseln mit ANP über ein vermindertes ATP/ADP Verhältnis zu einer stark reduzierten Insulinsekretion führt. Vermittelt wird dieser Effekt über eine verstärkte Expression des mitochondrialen Uncoupling Protein 2 (Ucp2), welche bereits häufiger mit einer verminderten Insulinsekretion und der Entstehung von T2D in Verbindung gebracht wurde (AFFOURTIT AND BRAND 2008; SOUZA *et al.* 2011). Eine β -zellspezifische Deletion von Ucp2 führt zudem zu einer gesteigerten GSIS in vitro (ROBSON-DOUCETTE *et al.* 2011). Außerdem wurde bereits nachgewiesen, dass die Behandlung von Adipozyten mit E2 zu einer verstärkten Ucp2-Expression führt (KIM *et al.* 2012). Unsere Ergebnisse, welche zeigen, dass ANP sowie E2 die Ucp2-Expression in kultivierten Inseln von Kontroll-Tieren induzierten, bestätigen diese Daten. Die simultane Inkubation mit beiden Substanzen erhöhte die Expression von Ucp2 in den Inseln noch mehr und zeigt damit, dass es sich um additive oder sogar synergistische Effekte von ANP und Östrogenen handeln muss, welche die Funktion der β -Zellen in den weiblichen Tieren modulieren. Da diese Beobachtungen in den Inseln von β GC-A KO-Tieren ausblieben, ist der GC-A-Rezeptor der β -Zellen an der Vermittlung dieser Effekte beteiligt. In vivo konnte dieser Zusammenhang bisher nicht gezeigt werden. Allerdings ist bekannt, dass Östrogene die mRNA-Expression von Ucp2 in Fettgewebe und Skelettmuskel von Ratten beeinflussen können (PEDERSEN *et al.* 2001). Unterschiede in der basalen

mRNA-Expression von Ucp2 zwischen Männchen und Weibchen wurden bisher jedoch nicht beschrieben. Einhergehend mit den *in vitro* gemachten Beobachtungen war die basale Expression von Ucp2 in den Inseln von männlichen Tieren leicht erhöht, in den Inseln der weiblichen β GC-A KO-Tiere hingegen deutlich niedriger als in denen der Kontroll-Tiere. Damit stellen diese Daten eine Verbindung her zu den *in vivo* beobachteten unterschiedlichen Einflüssen der GC-A-Deletion auf die GSIS beider Geschlechter. Letztendlich vermuten wir, dass die Effekte von endogenen Östrogenen und ANP in den Inseln von weiblichen β GC-A KO-Tieren aufgehoben oder vermindert sind und dadurch zu einer reduzierten Expression von Ucp2, einer verbesserten Verfügbarkeit von ATP und letztendlich zu einer erhöhten GSIS führen. Welche Bedeutung diese hier beobachtete Zusammenarbeit zwischen ANP und Östrogenen für die Physiologie der β -Zellen hat und inwiefern diese sogar nützlich sein kann, bleibt allerdings unklar. Die Expression und Aktivität von Ucp2 scheint wichtig zu sein, um die physiologische Antwort der β -Zellen auf die schwankende Nährstoffversorgung zu koordinieren und um Hypoglykämien zu vermeiden, wie sie unter einer exzessiven Insulinsekretion entstehen würden (AFFOURTIT AND BRAND 2008; SESHADRI *et al.* 2017). Interessanterweise ist bereits bekannt, dass die Ucp2 Expression in Inseln von gefasteten Mäusen ansteigt und so die GSIS drosselt (BORDONE *et al.* 2006). Außerdem ist die Expression von Ucp2 in Inseln von Mäusen in gefüttertem Zustand erniedrigt und sogar über den Tagesverlauf hinweg variabel, was erforderlich ist für eine zeitliche Kontrolle der Glukosetoleranz in Abhängigkeit von der Nährstoffverfügbarkeit (SESHADRI *et al.* 2017). In Einklang mit diesen und unseren Daten steht außerdem die Beobachtung, dass nach einer Nahrungsaufnahme sowohl die ANP- (GOETZE 2013; ARORA *et al.* 2016) als auch die Östradiol-Plasmaspiegel (RACZ *et al.* 2015) akut absinken. Ebenso induziert Fasten die Protein-Expression von ANP in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas von Ratten (NAJENSON *et al.* 2019).

Eine weitere Überlegung ist, dass die generell höheren Östrogen- und ANP-Plasmaspiegel bei Frauen (HAMADA *et al.* 2017) zu einer erhöhten Ucp2-Expression in β -Zellen führen und die dadurch abgeschwächte GSIS die β -Zellen schont für Zeiten in denen der Körper einen erhöhten Energiebedarf hat, wie beispielsweise während einer Schwangerschaft. Interessant wäre daher zu untersuchen, ob weibliche β GC-A KO-Mäuse trotz einer verbesserten GSIS in der Schwangerschaft frühzeitig eine Glukoseintoleranz entwickeln, da deren β -Zellen schneller erschöpfen. Generell könnte eine kontinuierliche Herausforderung einer „hyperaktiven“ β -Zelle mit hoher Nährstoffversorgung, z.B. durch erhöhte Blutzuckerspiegel, zu einem beschleunigten Versagen führen. Insgesamt gesehen benötigen die Mechanismen und die (patho)physiologische Bedeutung dieser geschlechtsabhängigen Auswirkung auf den GC-A/cGMP-Signalweg in pankreatischen β -Zellen - ob sie nun vorteilhaft oder nachteilig sind - weitere eingehende Untersuchungen.

4.5 Klinische Relevanz

Kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen sind eng miteinander verknüpft, was auf eine Verbindung zwischen Herz-Kreislauf- und Stoffwechsel-Organen hindeutet. Zahlreiche epidemiologische und physiologische Studien unterstützen das Konzept, dass sowohl Bluthochdruck und Herzinsuffizienz als auch Übergewicht und metabolisches Syndrom gekennzeichnet sind von einem systemischen Mangel an NPs. Wie bereits in der Einleitung vorgestellt, prädisponiert das sogenannte „Natriuretische Handicap“ für arteriellen Bluthochdruck und Insulinresistenzen, welche im weiteren Verlauf zu T2D führen können. Regelmäßige Bewegung und Gewichtsverlust durch reduzierte Kalorienaufnahme wurden bereits mit erhöhten NP-Spiegeln und einem verstärkten NP/GC-A-Signalweg in Verbindung gebracht, was dazu beiträgt, Bluthochdruck zu senken und die Blutzuckerkontrolle zu verbessern. Ebenso sind pharmakologische Interventionen im Einsatz, welche den GC-A-Rezeptor durch synthetische NPs aktivieren, den Abbau von NP durch Nephilysin hemmen oder den Abbau von cGMP durch PDE5 reduzieren. Diese allgemeinen und pharmakologischen Maßnahmen können die NP-Plasmaspiegel sowie das NP/GC-A-System verbessern und so das Risiko für das metabolische Syndrom und T2D verringern (s. Abschnitt 1.4 und Abb. 6).

Bisherige Studien beziehen sich allerdings einzig auf einen Einfluss des NP/GC-A/cGMP-Systems auf den Energiestoffwechsel sowie die Insulinsensitivität von peripheren Organen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmals ein direkter Zusammenhang der NPs und ihrem Rezeptor mit pankreatischen β -Zellen hergestellt werden. Unsere vergleichenden Untersuchungen zwischen β GC-A KO- und Kontroll-Tieren zeigen, dass das endogene NP/GC-A-System pankreatischer β -Zellen für die basale Insulin- und Glukosehomöostase zumindest unter physiologischen Bedingungen in vivo entbehrlich ist. Die akute bzw. chronische pharmakologische Applikation von NPs hingegen rief entgegengesetzte metabolische Effekte hervor. Während die einmalige Injektion einer hohen Dosis an ANP die GSIS als auch die Glukosetoleranz in beiden Genotypen verminderte, verstärkte die längerfristige Gabe einer geringeren Dosis an BNP die GSIS direkt über den GC-A-Rezeptor der β -Zellen und führte zu höheren Plasma-Insulinspiegeln sowie einer verbesserten Glukosetoleranz. Langzeit-Infusionen mit synthetischen NPs zur Behandlung von Patienten mit akut dekompensierter Herzinsuffizienz sind in Japan (ANP/Caperitide) bereits seit 1995 zugelassen (KONISHI *et al.* 2016). Eine Normalisierung der systemischen NP-Plasmaspiegel zur Prävention oder Behandlung von Stoffwechselstörungen bei übergewichtigen Patienten wären demnach ein Ansatz für die Entwicklung von neuen Therapieoptionen. Desweiteren zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass ein gestörter NP/GC-A-Signalweg in β -Zellen deren Anfälligkeit für diabetogene Reize erhöht. Neben der Insulinsekretion moduliert das endogene NP/GC-A-System ebenfalls die adaptive Proliferation der β -Zellen und kann so in Zeiten eines erhöhten Insulinbedarfes, zumindest zunächst, die Entstehung von Glukoseintoleranz hinauszögern. Die Wiederherstellung der systemischen NP-Plasmaspiegel und/oder

der NP-Signalisierung wäre eine Möglichkeit sowohl die Funktion als auch die Masse der β -Zellen aufrechtzuerhalten, um der Entstehung eines T2D entgegenzuwirken. Basierend auf bereits publizierten und unseren Daten vermuten wir, dass über das NP/GC-A/cGMP-System die cGKI stimuliert wird und weiter über den PI3K/pAKT die Zellkern-Translokation des Transkriptionsfaktors Foxo1a verhindert wird, was wiederum die Transkription von CyclinD2 verstärkt und somit die Proliferation der β -Zellen induziert (Abb. 45)(YOU AND LAYCHOCK 2009). Zudem ist in Abbildung 45 der vorgeschlagene Einfluss des NP/GC-A/cGMP-Systems auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung und der damit einhergehenden verstärkten Insulinfreisetzung dargestellt (ROPERO *et al.* 2010; UNDANK *et al.* 2017b).

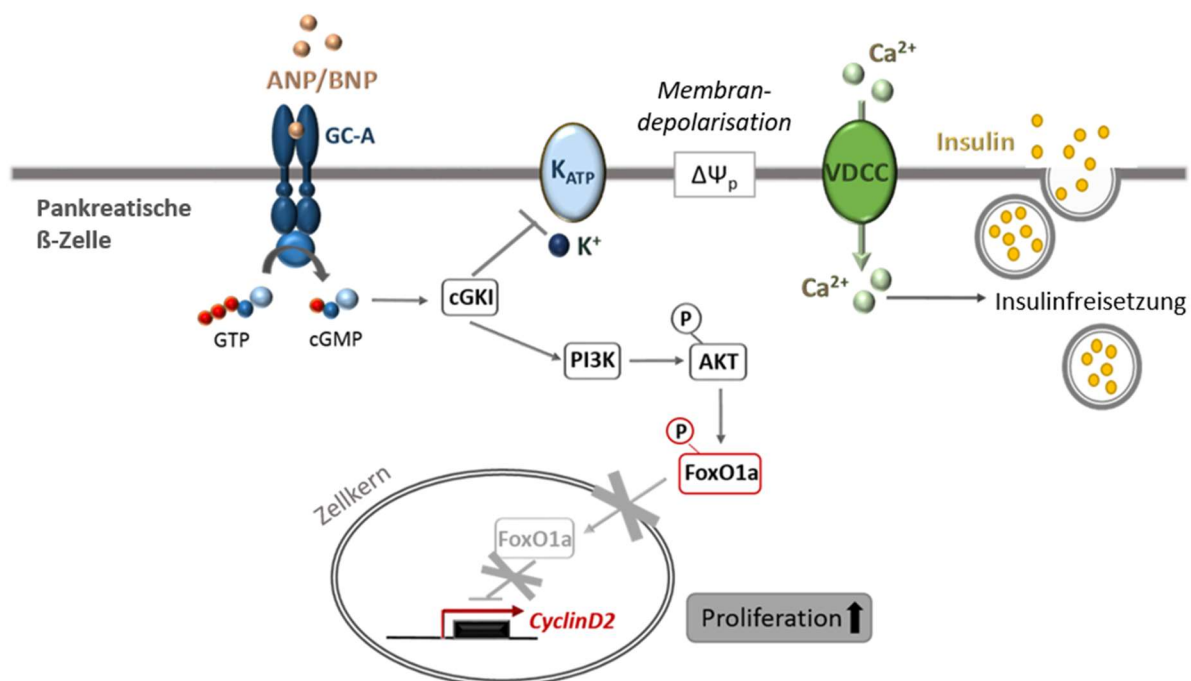


Abbildung 45: Einfluss des NP/GC-A/cGMP-Signalweges auf die Insulinfreisetzung und die Proliferation pankreatischer β -Zellen. (Vorgeschlagener Mechanismus, basierend auf eigenen und publizierten Daten (YOU AND LAYCHOCK 2009; ROPERO *et al.* 2010); (UNDANK *et al.* 2017b)).

Ebenfalls bedeutsam ist die Entdeckung des geschlechtsabhängigen Unterschiedes im Einfluss der GC-A Deletion auf die GSIS. Wir erweitern damit bisherige Daten um die Erkenntnis, dass es sich um additive oder sogar synergistische Effekte von ANP und Östrogenen handeln muss, welche die Funktion von β -Zellen über eine erhöhte Ucp2-Expression in weiblichen Tieren modulieren. Abbildung 46 zeigt den aufgrund eigener und publizierter Daten vermuteten Mechanismus der Interaktion von E2/ER β mit dem NP/GC-A/cGMP-System in β -Zellen und der daraus resultierenden verstärkten Expression von Ucp2, welche wiederum beteiligt ist an einer Hemmung der GSIS (SORIANO *et al.* 2009; YOU AND LAYCHOCK 2011; KIM *et al.* 2012).

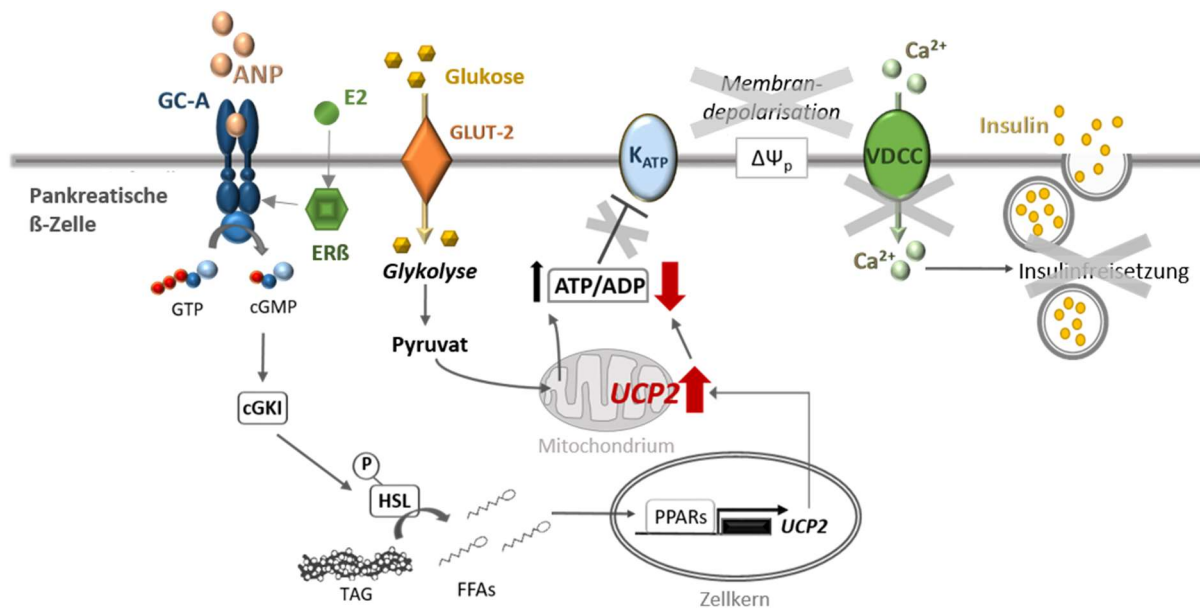


Abbildung 46: Interaktion von E2/ER β mit dem ANP/GC-A/cGMP-System in pankreatischen β -Zellen bei der Stimulation der Ucp2-Expression und der dadurch hervorgerufenen Hemmung der GSIS. (Vorgeschlagerener Mechanismus, basierend auf eigenen und publizierten Daten (SORIANO *et al.* 2009; YOU AND LAYCHOCK 2011; KIM *et al.* 2012)).

Zum einen ist bereits nachgewiesen, dass die Therapie mit Östrogenen in der Menopause die Plasmaspiegel von ANP und BNP bei Frauen erhöht (MAFFEI *et al.* 2001). Zum anderen ist bekannt, dass eine Hormonersatztherapie zu Beginn bzw. während der Menopause einen positiven Effekt auf die Glukosehomöostase bei Frauen ohne und mit T2D hat (PASCHOU AND PAPANAS 2019). Unsere Daten liefern somit einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für den zugrundeliegenden Mechanismus und eröffnen mögliche Therapieoptionen, da Östrogene aufgrund ihrer zahlreichen Nebenwirkungen nicht immer zum Einsatz kommen können (MAUVAIS-JARVIS *et al.* 2017b).

Insgesamt gesehen bestätigen und ergänzen die Daten dieser Dissertation den derzeitigen Wissenstand über die metabolischen Effekte des NP/GC-A-Systems und weisen auf eine protektive Funktion der kardialen Hormone im endokrinen Pankreas hin. Mit der Zulassung von Entresto[®], der Kombination aus Sacubitril, welches durch die Hemmung des Abbaus der NPs deren Plasmaspiegel erhöht, mit dem AT1-Blocker Valsartan für die Behandlung von Patienten mit Herzversagen, ist es umso wichtiger geworden, die vielfältigen Auswirkungen der NPs und deren möglichen Einsatz bei kardio-metabolischen Krankheiten zu verstehen. Aus dieser Perspektive haben die hier vorliegenden Daten nicht nur hohe pathophysiologische Relevanz, sondern ergeben auch mögliche therapeutische Implikationen, welche in zukünftigen experimentellen und/oder klinischen Studien Beachtung finden sollten.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamsson, N., B. E. Engstrom, M. Sundbom and F. A. Karlsson, 2013 Gastric bypass surgery elevates NT-ProBNP levels. *Obes Surg* 23: 1421-1426.
- Addisu, A., W. R. Gower, Jr., M. Serrano, D. Villarreal and J. R. Dietz, 2011 Heart failure mice exhibit decreased gastric emptying and intestinal absorption. *Exp Biol Med (Maywood)* 236: 1454-1460.
- Affourtit, C., and M. D. Brand, 2008 On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells. *Biochim Biophys Acta* 1777: 973-979.
- Ahren, B., 1988 ANF inhibits glucose-stimulated insulin secretion in mouse and rat. *Am J Physiol* 255: E579-582.
- Ahren, J., B. Ahren and N. Wierup, 2010 Increased beta-cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months. *Islets* 2: 353-356.
- Allan, C. A., 2014 Sex steroids and glucose metabolism. *Asian J Androl* 16: 232-238.
- Antunes-Rodrigues, J., S. M. McCann, L. C. Rogers and W. K. Samson, 1985 Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8720-8723.
- Arora, P., C. Wu, T. Hamid, G. Arora, O. Agha *et al.*, 2016 Acute Metabolic Influences on the Natriuretic Peptide System in Humans. *J Am Coll Cardiol* 67: 804-812.
- Asfari, M., D. Janjic, P. Meda, G. Li, P. A. Halban *et al.*, 1992 Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-178.
- Baribault, H., 2010 Mouse models of type II diabetes mellitus in drug discovery. *Methods Mol Biol* 602: 135-155.
- Barletta, G., L. Stefani, R. Del Bene, C. Fronzaroli, S. Vecchiarino *et al.*, 1998 Effects of exercise on natriuretic peptides and cardiac function in man. *Int J Cardiol* 65: 217-225.
- Beavo, J. A., 1995 Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75: 725-748.
- Bender, A. T., and J. A. Beavo, 2006 Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58: 488-520.
- Benedict, C. R., D. E. Johnstone, D. H. Weiner, M. G. Bourassa, V. Bittner *et al.*, 1994 Relation of neurohumoral activation to clinical variables and degree of ventricular dysfunction: a report from the Registry of Studies of Left Ventricular Dysfunction. SOLVD Investigators. *J Am Coll Cardiol* 23: 1410-1420.
- Bennett, B. D., G. L. Bennett, R. V. Vitangcol, J. R. Jewett, J. Burnier *et al.*, 1991 Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. *Hormone pharmacology*

- and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem* 266: 23060-23067.
- Biel, M., 2009 Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *J Biol Chem* 284: 9017-9021.
- Birkenfeld, A. L., M. Boschmann, S. Engeli, C. Moro, A. M. Arafat *et al.*, 2012 Atrial natriuretic peptide and adiponectin interactions in man. *PLoS One* 7: e43238.
- Birkenfeld, A. L., P. Budziarek, M. Boschmann, C. Moro, F. Adams *et al.*, 2008 Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans. *Diabetes* 57: 3199-3204.
- Blandino-Rosano, M., R. Barbaresso, M. Jimenez-Palomares, N. Bozadjieva, J. P. Werneck-de-Castro *et al.*, 2017 Loss of mTORC1 signalling impairs beta-cell homeostasis and insulin processing. *Nat Commun* 8: 16014.
- Bordicchia, M., D. Liu, E. Z. Amri, G. Ailhaud, P. Dessi-Fulgheri *et al.*, 2012 Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 122: 1022-1036.
- Bordone, L., M. C. Motta, F. Picard, A. Robinson, U. S. Jhala *et al.*, 2006 Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4: e31.
- Brachs, M., S. Wiegand, V. Leupelt, A. Ernert, U. Kintscher *et al.*, 2016 ANP system activity predicts variability of fat mass reduction and insulin sensitivity during weight loss. *Metabolism* 65: 935-943.
- Brooker, G., J. F. Harper, W. L. Terasaki and R. D. Moylan, 1979 Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 10: 1-33.
- Brunner, F., and G. Wolkart, 2001 Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation. *Microvasc Res* 61: 102-110.
- Buglioni, A., V. Cannone, A. Cataliotti, S. J. Sangaralingham, D. M. Heublein *et al.*, 2015 Circulating aldosterone and natriuretic peptides in the general community: relationship to cardiorenal and metabolic disease. *Hypertension* 65: 45-53.
- Cannone, V., G. Boerrigter, A. Cataliotti, L. C. Costello-Boerrigter, T. M. Olson *et al.*, 2011 A genetic variant of the atrial natriuretic peptide gene is associated with cardiometabolic protection in the general community. *J Am Coll Cardiol* 58: 629-636.
- Cataliotti, A., L. C. Costello-Boerrigter, H. H. Chen, S. C. Textor and J. C. Burnett, Jr., 2012 Sustained blood pressure-lowering actions of subcutaneous B-type natriuretic peptide (nesiritide) in a patient with uncontrolled hypertension. *Mayo Clin Proc* 87: 413-415.
- Chaar, L. J., A. Coelho, N. M. Silva, W. L. Festuccia and V. R. Antunes, 2016 High-fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance are associated with an upregulation of CART in the dorsomedial hypothalamus of mice. *Physiol Rep* 4.

- Chan, C. B., D. De Leo, J. W. Joseph, T. S. McQuaid, X. F. Ha *et al.*, 2001 Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50: 1302-1310.
- Chan, C. B., M. C. Saleh, V. Koshkin and M. B. Wheeler, 2004 Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes* 53 Suppl 1: S136-142.
- Chaudhary, K. R., S. N. Batchu, D. Das, M. R. Suresh, J. R. Falck *et al.*, 2009 Role of B-type natriuretic peptide in epoxyeicosatrienoic acid-mediated improved post-ischaemic recovery of heart contractile function. *Cardiovasc Res* 83: 362-370.
- Chen, S., J. A. McCormick, K. Prabaker, J. Wang, D. Pearce *et al.*, 2004 Sgk1 mediates osmotic induction of NPR-A gene in rat inner medullary collecting duct cells. *Hypertension* 43: 866-871.
- Chen, W., H. Oberwinkler, F. Werner, B. Gassner, H. Nakagawa *et al.*, 2013 Atrial natriuretic peptide-mediated inhibition of microcirculatory endothelial Ca²⁺ and permeability response to histamine involves cGMP-dependent protein kinase I and TRPC6 channels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2121-2129.
- Christensen, H. M., C. Kistorp, M. Schou, N. Keller, B. Zerahn *et al.*, 2013 Prevalence of cachexia in chronic heart failure and characteristics of body composition and metabolic status. *Endocrine* 43: 626-634.
- Clayton, J. A., and F. S. Collins, 2014 Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* 509: 282-283.
- Clerico, A., M. Fontana, S. Vittorini and M. Emdin, 2009 The search for a pathophysiological link between gender, cardiac endocrine function, body mass regulation and cardiac mortality: proposal for a working hypothesis. *Clin Chim Acta* 405: 1-7.
- Clerico, A., C. Passino and M. Emdin, 2011 When gonads talk to the heart sex hormones and cardiac endocrine function. *J Am Coll Cardiol* 58: 627-628.
- Cody, R. J., S. A. Atlas, J. H. Laragh, S. H. Kubo, A. B. Covit *et al.*, 1986 Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* 78: 1362-1374.
- Conti, M., and J. Beavo, 2007 Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 76: 481-511.
- Coue, M., P. M. Badin, I. K. Vila, C. Laurens, K. Louche *et al.*, 2015 Defective Natriuretic Peptide Receptor Signaling in Skeletal Muscle Links Obesity to Type 2 Diabetes. *Diabetes* 64: 4033-4045.
- Coue, M., and C. Moro, 2016 Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. *Biochimie* 124: 84-91.

- Curry, F. R., C. B. Rygh, T. Karlsen, H. Wiig, R. H. Adamson *et al.*, 2010 Atrial natriuretic peptide modulation of albumin clearance and contrast agent permeability in mouse skeletal muscle and skin: role in regulation of plasma volume. *J Physiol* 588: 325-339.
- da Costa, R. M., K. B. Neves, F. L. Mestriner, P. Louzada-Junior, T. Bruder-Nascimento *et al.*, 2016 TNF- α induces vascular insulin resistance via positive modulation of PTEN and decreased Akt/eNOS/NO signaling in high fat diet-fed mice. *Cardiovasc Diabetol* 15: 119.
- Das, S. R., M. H. Drazner, D. L. Dries, G. L. Vega, H. G. Stanek *et al.*, 2005 Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Circulation* 112: 2163-2168.
- de Bold, A. J., H. B. Borenstein, A. T. Veress and H. Sonnenberg, 1981 A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28: 89-94.
- de Bold, A. J., K. K. Ma, Y. Zhang, M. L. de Bold, M. Bensimon *et al.*, 2001 The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 79: 705-714.
- Dessi-Fulgheri, P., R. Sarzani, M. Serenelli, P. Tamburrini, D. Spagnolo *et al.*, 1999 Low calorie diet enhances renal, hemodynamic, and humoral effects of exogenous atrial natriuretic peptide in obese hypertensives. *Hypertension* 33: 658-662.
- Dessi-Fulgheri, P., R. Sarzani, P. Tamburrini, A. Moraca, E. Espinosa *et al.*, 1997 Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of normotensive and hypertensive obese patients. *J Hypertens* 15: 1695-1699.
- Dolensek, J., M. S. Rupnik and A. Stozer, 2015 Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7: e1024405.
- Dreja, T., Z. Jovanovic, A. Rasche, R. Kluge, R. Herwig *et al.*, 2010 Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 53: 309-320.
- Drexler, H., 1992 Skeletal muscle failure in heart failure. *Circulation* 85: 1621-1623.
- Eckardt, D., M. Theis, B. Doring, D. Speidel, K. Willecke *et al.*, 2004 Spontaneous ectopic recombination in cell-type-specific Cre mice removes loxP-flanked marker cassettes in vivo. *Genesis* 38: 159-165.
- Edwards, B. S., R. S. Zimmerman, T. R. Schwab, D. M. Heublein and J. C. Burnett, Jr., 1988 Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 62: 191-195.
- El-Mowafy, A. M., M. Alkhalaf and S. M. Jaffal, 2007 Nongenomic activation of the GC-A enzyme by resveratrol and estradiol downstream from membrane estrogen receptors in human coronary arterial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 508-516.

- Engeli, S., A. L. Birkenfeld, P. M. Badin, V. Bourlier, K. Louche *et al.*, 2012 Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J Clin Invest* 122: 4675-4679.
- Everett, B. M., N. R. Cook, D. I. Chasman, M. C. Magnone, M. Bobadilla *et al.*, 2013 Prospective evaluation of B-type natriuretic peptide concentrations and the risk of type 2 diabetes in women. *Clin Chem* 59: 557-565.
- Fehmann, H. C., B. Noll, R. Goke, B. Goke, M. E. Trautmann *et al.*, 1990 Atrial natriuretic factor has a weak insulinotropic action in the isolated perfused rat pancreas. *Res Exp Med (Berl)* 190: 253-258.
- Ferrari, P., S. Shaw, W. Riesen and P. Weidmann, 1992 Plasma insulin during physiological and pathophysiological changes in atrial natriuretic factor. *Eur J Clin Pharmacol* 42: 453-455.
- Fu, L., F. Li, A. Bruckbauer, Q. Cao, X. Cui *et al.*, 2015 Interaction between leucine and phosphodiesterase 5 inhibition in modulating insulin sensitivity and lipid metabolism. *Diabetes Metab Syndr Obes* 8: 227-239.
- Fu, S., P. Ping, F. Wang and L. Luo, 2018 Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *J Biol Eng* 12: 2.
- Fuller, F., J. G. Porter, A. E. Arfsten, J. Miller, J. W. Schilling *et al.*, 1988 Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem* 263: 9395-9401.
- Galitzky, J., C. Sengenès, C. Thalamas, M. A. Marques, J. M. Senard *et al.*, 2001 The lipid-mobilizing effect of atrial natriuretic peptide is unrelated to sympathetic nervous system activation or obesity in young men. *J Lipid Res* 42: 536-544.
- Gambaryan, S., C. Hausler, T. Markert, D. Pohler, T. Jarchau *et al.*, 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.
- Gambaryan, S., C. Wagner, A. Smolenski, U. Walter, W. Poller *et al.*, 1998 Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9003-9008.
- Gardner, D. G., S. Chen, D. J. Glenn and C. L. Grigsby, 2007 Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension* 49: 419-426.
- Gill, D., K. J. Brocklehurst, H. W. Brown and D. M. Smith, 2011 Upregulation of beta-cell genes and improved function in rodent islets following chronic glucokinase activation. *J Mol Endocrinol* 47: 59-67.
- Giralt, M., and F. Villarroya, 2017 Mitochondrial Uncoupling and the Regulation of Glucose Homeostasis. *Curr Diabetes Rev* 13: 386-394.

- Godsland, I. F., 1996 The influence of female sex steroids on glucose metabolism and insulin action. *J Intern Med Suppl* 738: 1-60.
- Godsland, I. F., 2005 Oestrogens and insulin secretion. *Diabetologia* 48: 2213-2220.
- Goetze, J. P., 2012 B-type natriuretic peptide: from posttranslational processing to clinical measurement. *Clin Chem* 58: 83-91.
- Goetze, J. P., 2013 Plasma proANP decreases after meal intake. *Clin Chem* 59: 1270-1271.
- Golson, M. L., A. A. Misfeldt, U. G. Kopsombut, C. P. Petersen and M. Gannon, 2010 High Fat Diet Regulation of beta-Cell Proliferation and beta-Cell Mass. *Open Endocrinol J* 4.
- Gruden, G., A. Landi and G. Bruno, 2014 Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research. *Diabetes Care* 37: 2899-2908.
- Halban, P. A., G. A. Praz and C. B. Wollheim, 1983 Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Biochem J* 212: 439-443.
- Hamada, M., Y. Shigematsu, M. Takezaki, S. Ikeda and A. Ogimoto, 2017 Plasma levels of atrial and brain natriuretic peptides in apparently healthy subjects: Effects of sex, age, and hemoglobin concentration. *Int J Cardiol* 228: 599-604.
- Hamra, F. K., L. R. Forte, S. L. Eber, N. V. Pidhorodeckyj, W. J. Krause *et al.*, 1993 Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10464-10468.
- Haufe, S., J. Kaminski, W. Utz, V. Haas, A. Mahler *et al.*, 2015 Differential response of the natriuretic peptide system to weight loss and exercise in overweight or obese patients. *J Hypertens* 33: 1458-1464.
- Heimann, E., H. A. Jones, S. Resjo, V. C. Manganiello, L. Stenson *et al.*, 2010 Expression and regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases in human and rat pancreatic islets. *PLoS One* 5: e14191.
- Hein, S., E. Arnon, S. Kostin, M. Schonburg, A. Elsasser *et al.*, 2003 Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107: 984-991.
- Heinisch, B. B., G. Vila, M. Resl, M. Riedl, B. Dieplinger *et al.*, 2012 B-type natriuretic peptide (BNP) affects the initial response to intravenous glucose: a randomised placebo-controlled cross-over study in healthy men. *Diabetologia* 55: 1400-1405.
- Herrera, P. L., 2000 Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127: 2317-2322.
- Heydemann, A., 2016 An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 2016: 2902351.

- Hofmann, F., and J. W. Wegener, 2013 cGMP-dependent protein kinases (cGK). *Methods Mol Biol* 1020: 17-50.
- Holtwick, R., M. Gotthardt, B. Skryabin, M. Steinmetz, R. Potthast *et al.*, 2002 Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7142-7147.
- Holtwick, R., M. van Eickels, B. V. Skryabin, H. A. Baba, A. Bubikat *et al.*, 2003 Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 111: 1399-1407.
- Hong, L., J. Xi, Y. Zhang, W. Tian, J. Xu *et al.*, 2012 Atrial natriuretic peptide prevents the mitochondrial permeability transition pore opening by inactivating glycogen synthase kinase 3beta via PKG and PI3K in cardiac H9c2 cells. *Eur J Pharmacol* 695: 13-19.
- Itoh, H., K. Nakao, G. Katsuura, N. Morii, S. Shiono *et al.*, 1986 Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 59: 342-347.
- Izzo, J. L., Jr., and A. A. Taylor, 1999 The sympathetic nervous system and baroreflexes in hypertension and hypotension. *Curr Hypertens Rep* 1: 254-263.
- Jaburek, M., M. Varecha, R. E. Gimeno, M. Dembski, P. Jezek *et al.*, 1999 Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* 274: 26003-26007.
- Jordan, J., and A. L. Birkenfeld, 2016 Cardiometabolic crosstalk in obesity-associated arterial hypertension. *Rev Endocr Metab Disord* 17: 19-28.
- Jordan, J., A. L. Birkenfeld, O. Melander and C. Moro, 2018 Natriuretic Peptides in Cardiovascular and Metabolic Crosstalk: Implications for Hypertension Management. *Hypertension* 72: 270-276.
- Jordan, J., R. Stinkens, T. Jax, S. Engeli, E. E. Blaak *et al.*, 2017 Improved Insulin Sensitivity With Angiotensin Receptor Nephilysin Inhibition in Individuals With Obesity and Hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 101: 254-263.
- Jujic, A., P. M. Nilsson, G. Engstrom, B. Hedblad, O. Melander *et al.*, 2014 Atrial natriuretic peptide and type 2 diabetes development--biomarker and genotype association study. *PLoS One* 9: e89201.
- Kangawa, K., A. Fukuda, I. Kubota, Y. Hayashi, Y. Minamitake *et al.*, 1984 Human atrial natriuretic polypeptides (hANP): purification, structure synthesis and biological activity. *J Hypertens Suppl* 2: S321-323.
- Kautzky-Willer, A., J. Harreiter and G. Pacini, 2016 Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev* 37: 278-316.
- Kemppainen, J., H. Tsuchida, K. Stolen, H. Karlsson, M. Bjornholm *et al.*, 2003 Insulin signalling and resistance in patients with chronic heart failure. *J Physiol* 550: 305-315.

- Kenny, A. J., A. Bourne and J. Ingram, 1993 Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 291 (Pt 1): 83-88.
- Kerkela, R., J. Ulvila and J. Magga, 2015 Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J Am Heart Assoc* 4: e002423.
- Khan, A. M., S. Cheng, M. Magnusson, M. G. Larson, C. Newton-Cheh *et al.*, 2011 Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 3242-3249.
- Kiemer, A. K., A. Baron, A. L. Gerbes, M. Bilzer and A. M. Vollmar, 2002 The atrial natriuretic peptide as a regulator of Kupffer cell functions. *Shock* 17: 365-371.
- Kilic, A., A. Bubikat, B. Gassner, H. A. Baba and M. Kuhn, 2007 Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling. *Endocrinology* 148: 4162-4169.
- Kim, J. J., Y. Kido, P. E. Scherer, M. F. White and D. Accili, 2007 Analysis of compensatory beta-cell response in mice with combined mutations of *Insr* and *Irs2*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1694-1701.
- Kim, J. Y., K. J. Jo, B. J. Kim, H. W. Baik and S. K. Lee, 2012 17beta-estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Mol Med* 30: 979-985.
- Kim, M., M. J. Platt, T. Shibasaki, S. E. Quaggin, P. H. Backx *et al.*, 2013 GLP-1 receptor activation and *Epac2* link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat Med* 19: 567-575.
- Kimura, H., T. Nagoshi, A. Yoshii, Y. Kashiwagi, Y. Tanaka *et al.*, 2017 The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe. *Sci Rep* 7: 12978.
- Kisch, B., 1956 [Electron microscopic examination of the heart]. *Z Wiss Mikrosk* 62: 510-520.
- Kishimoto, I., S. K. Dubois and D. L. Garbers, 1996 The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6215-6219.
- Kjaer, A., J. Appel, P. Hildebrandt and C. L. Petersen, 2004 Basal and exercise-induced neuroendocrine activation in patients with heart failure and in normal subjects. *Eur J Heart Fail* 6: 29-39.
- Klaiber, M., M. Kruse, K. Volker, J. Schroter, R. Feil *et al.*, 2010 Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Res Cardiol* 105: 583-595.
- Koch, K. W., T. Duda and R. K. Sharma, 2002 Photoreceptor specific guanylate cyclases in vertebrate phototransduction. *Mol Cell Biochem* 230: 97-106.

- Koller, K. J., D. G. Lowe, G. L. Bennett, N. Minamino, K. Kangawa *et al.*, 1991 Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252: 120-123.
- Konishi, M., J. Ishida, J. Springer, S. von Haehling, Y. J. Akashi *et al.*, 2016 Heart failure epidemiology and novel treatments in Japan: facts and numbers. *ESC Heart Fail* 3: 145-151.
- Kovacova, Z., W. G. Tharp, D. Liu, W. Wei, H. Xie *et al.*, 2016 Adipose tissue natriuretic peptide receptor expression is related to insulin sensitivity in obesity and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 24: 820-828.
- Kudo, T., and A. Baird, 1984 Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. *Nature* 312: 756-757.
- 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.
- Kuhn, M., 2009 Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handb Exp Pharmacol*: 47-69.
- Kuhn, M., 2012 Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides. *Br J Pharmacol* 166: 522-531.
- Kuhn, M., 2015 Cardiac actions of atrial natriuretic peptide: new visions of an old friend. *Circ Res* 116: 1278-1280.
- Kuhn, M., 2016 Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev* 96: 751-804.
- Kuhn, M., K. Volker, K. Schwarz, J. Carbajo-Lozoya, U. Flogel *et al.*, 2009 The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 119: 2019-2030.
- Kuo, J. F., 1974 Guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4037-4041.
- Kurtz, A., R. Della Bruna, J. Pfeilschifter, R. Taugner and C. Bauer, 1986 Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4769-4773.
- Lazo, M., J. H. Young, F. L. Brancati, J. Coresh, S. Whelton *et al.*, 2013 NH₂-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of diabetes. *Diabetes* 62: 3189-3193.
- Li, N., M. Karaca and P. Maechler, 2017 Upregulation of UCP2 in beta-cells confers partial protection against both oxidative stress and glucotoxicity. *Redox Biol* 13: 541-549.
- Lingohr, M. K., R. Buettner and C. J. Rhodes, 2002 Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med* 8: 375-384.
- Liu, S., and F. Mauvais-Jarvis, 2010 Minireview: Estrogenic protection of beta-cell failure in metabolic diseases. *Endocrinology* 151: 859-864.

- Lopez, M. J., D. L. Garbers and M. Kuhn, 1997 The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* 272: 23064-23068.
- Lopez, M. J., S. K. Wong, I. Kishimoto, S. Dubois, V. Mach *et al.*, 1995 Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378: 65-68.
- Lucas, E., R. Vila-Bedmar, A. C. Arcones, M. Cruces-Sande, V. Cachofeiro *et al.*, 2016 Obesity-induced cardiac lipid accumulation in adult mice is modulated by G protein-coupled receptor kinase 2 levels. *Cardiovasc Diabetol* 15: 155.
- Lumsden, N. G., R. S. Khambata and A. J. Hobbs, 2010 C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target. *Curr Pharm Des* 16: 4080-4088.
- Lutz, S. Z., A. M. Hennige, S. Feil, A. Peter, A. Gerling *et al.*, 2011 Genetic ablation of cGMP-dependent protein kinase type I causes liver inflammation and fasting hyperglycemia. *Diabetes* 60: 1566-1576.
- Maack, T., 1992 Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* 54: 11-27.
- Maack, T., 1996 Role of atrial natriuretic factor in volume control. *Kidney Int* 49: 1732-1737.
- Maack, T., M. Suzuki, F. A. Almeida, D. Nussenzveig, R. M. Scarborough *et al.*, 1987 Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238: 675-678.
- Maffei, S., S. Del Ry, C. Prontera and A. Clerico, 2001 Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Clin Sci (Lond)* 101: 447-453.
- Magnusson, M., A. Jujic, B. Hedblad, G. Engstrom, M. Persson *et al.*, 2012 Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 638-645.
- Mandosi, E., E. Giannetta, T. Filardi, M. Lococo, C. Bertolini *et al.*, 2015 Endothelial dysfunction markers as a therapeutic target for Sildenafil treatment and effects on metabolic control in type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 19: 1617-1622.
- Martel, G., P. Hamet and J. Tremblay, 2010 GREBP, a cGMP-response element-binding protein repressing the transcription of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1/GCA). *J Biol Chem* 285: 20926-20939.
- Martins, T., R. Vitorino, D. Moreira-Goncalves, F. Amado, J. A. Duarte *et al.*, 2014 Recent insights on the molecular mechanisms and therapeutic approaches for cardiac cachexia. *Clin Biochem* 47: 8-15.
- Matsukawa, N., W. J. Grzesik, N. Takahashi, K. N. Pandey, S. Pang *et al.*, 1999 The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7403-7408.

- Matsumura, T., K. Kugiyama, S. Sugiyama, M. Ohgushi, K. Amanaka *et al.*, 1996 Neutral endopeptidase 24.11 in neutrophils modulates protective effects of natriuretic peptides against neutrophil-induced endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest* 97: 2192-2203.
- Maurice, D. H., H. Ke, F. Ahmad, Y. Wang, J. Chung *et al.*, 2014 Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 13: 290-314.
- Mauvais-Jarvis, F., 2015 Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biol Sex Differ* 6: 14.
- Mauvais-Jarvis, F., 2016 Role of Sex Steroids in beta Cell Function, Growth, and Survival. *Trends Endocrinol Metab* 27: 844-855.
- Mauvais-Jarvis, F., A. P. Arnold and K. Reue, 2017a A Guide for the Design of Pre-clinical Studies on Sex Differences in Metabolism. *Cell Metab* 25: 1216-1230.
- Mauvais-Jarvis, F., J. E. Manson, J. C. Stevenson and V. A. Fonseca, 2017b Menopausal Hormone Therapy and Type 2 Diabetes Prevention: Evidence, Mechanisms, and Clinical Implications. *Endocr Rev* 38: 173-188.
- McCord, J., B. J. Mundy, M. P. Hudson, A. S. Maisel, J. E. Hollander *et al.*, 2004 Relationship between obesity and B-type natriuretic peptide levels. *Arch Intern Med* 164: 2247-2252.
- McMurray, J. J., M. Packer, A. S. Desai, J. Gong, M. P. Lefkowitz *et al.*, 2014 Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 371: 993-1004.
- Meems, L. M. G., and J. C. Burnett, Jr., 2016 Innovative Therapeutics: Designer Natriuretic Peptides. *JACC Basic Transl Sci* 1: 557-567.
- Meirhaeghe, A., M. S. Sandhu, M. I. McCarthy, P. de Groote, D. Cottel *et al.*, 2007 Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations. *Hum Mol Genet* 16: 1343-1350.
- Mezza, T., G. Muscogiuri, G. P. Sorice, G. Clemente, J. Hu *et al.*, 2014 Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans. *Diabetes* 63: 994-1007.
- Misono, K. S., H. Fukumi, R. T. Grammer and T. Inagami, 1984 Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 119: 524-529.
- Miyashita, K., H. Itoh, H. Tsujimoto, N. Tamura, Y. Fukunaga *et al.*, 2009 Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes* 58: 2880-2892.
- Mobbs, C. V., D. M. Gee and C. E. Finch, 1984 Reproductive senescence in female C57BL/6J mice: ovarian impairments and neuroendocrine impairments that are partially reversible and delayable by ovariectomy. *Endocrinology* 115: 1653-1662.
- Morita, Y., S. Kohsaka, K. Oshima, T. Yoshikawa and K. Fukuda, 2012 Use of carperitide infusion for acutely decompensated heart failure. *Crit Care* 16: 406.

- Moro, C., J. Galitzky, C. Sengenès, F. Crampes, M. Lafontan *et al.*, 2004 Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 984-992.
- Moro, C., E. Klimcakova, K. Lolmede, M. Berlan, M. Lafontan *et al.*, 2007 Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* 50: 1038-1047.
- Moro, C., F. Pillard, I. de Glisezinski, E. Klimcakova, F. Crampes *et al.*, 2008 Exercise-induced lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue is mainly related to natriuretic peptides in overweight men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E505-513.
- Morton, G. J., K. Muta, K. J. Kaiyala, J. M. Rojas, J. M. Scarlett *et al.*, 2017 Evidence That the Sympathetic Nervous System Elicits Rapid, Coordinated, and Reciprocal Adjustments of Insulin Secretion and Insulin Sensitivity During Cold Exposure. *Diabetes* 66: 823-834.
- Mosser, R. E., M. F. Maulis, V. S. Mouille, J. C. Dunn, B. A. Carboneau *et al.*, 2015 High-fat diet-induced beta-cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308: E573-582.
- Mukoyama, M., K. Nakao, K. Hosoda, S. Suga, Y. Saito *et al.*, 1991 Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 87: 1402-1412.
- Mukoyama, M., K. Nakao, Y. Saito, Y. Ogawa, K. Hosoda *et al.*, 1990 Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med* 323: 757-758.
- Murthy, K. S., and G. M. Makhoulouf, 1999 Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). *J Biol Chem* 274: 17587-17592.
- Murthy, K. S., B. Q. Teng, H. Zhou, J. G. Jin, J. R. Grider *et al.*, 2000 G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G974-980.
- Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, S. Soriano, I. Quesada and A. B. Ropero, 2009 The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 304: 63-68.
- Najenson, A. C., M. Bianchi, A. P. Courreges, M. R. Rodriguez, V. H. Casco *et al.*, 2019 The exocrine pancreas is an extracardiac source of atrial natriuretic peptide. *Pflugers Arch* 471: 915-924.
- Nakao, K., K. Osawa, A. Yasoda, S. Yamanaka, T. Fujii *et al.*, 2015 The Local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth. *Sci Rep* 5: 10554.
- Nakao, K., A. Sugawara, N. Morii, M. Sakamoto, T. Yamada *et al.*, 1986 The pharmacokinetics of alpha-human atrial natriuretic polypeptide in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 31: 101-103.

- Nishikawa, S., A. Yasoshima, K. Doi, H. Nakayama and K. Uetsuka, 2007 Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim* 56: 263-272.
- Nishiumi, S., and H. Ashida, 2007 Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2343-2346.
- Ogawa, T., and A. J. de Bold, 2012 Brain natriuretic Peptide production and secretion in inflammation. *J Transplant* 2012: 962347.
- Oliveira, R. B., D. A. Maschio, C. P. Carvalho and C. B. Collares-Buzato, 2015 Influence of gender and time diet exposure on endocrine pancreas remodeling in response to high fat diet-induced metabolic disturbances in mice. *Ann Anat* 200: 88-97.
- Olsen, M. H., T. W. Hansen, M. K. Christensen, F. Gustafsson, S. Rasmussen *et al.*, 2005 N-terminal pro brain natriuretic peptide is inversely related to metabolic cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome. *Hypertension* 46: 660-666.
- Pankow, K., Y. Wang, F. Gemhardt, E. Krause, X. Sun *et al.*, 2007 Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circ Res* 101: 875-882.
- Paschou, S. A., and N. Papanas, 2019 Type 2 Diabetes Mellitus and Menopausal Hormone Therapy: An Update. *Diabetes Ther.*
- Pedersen, S. B., J. M. Bruun, K. Kristensen and B. Richelsen, 2001 Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 191-197.
- Pfutzner, A., I. Hermanns, S. Ramljak, F. Demircik, A. H. Pfutzner *et al.*, 2015 Elevated Intact Proinsulin Levels During an Oral Glucose Challenge Indicate Progressive β -Cell Dysfunction and May Be Predictive for Development of Type 2 Diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 9: 1307-1312.
- Plante, E., A. Menaouar, B. A. Danalache, T. L. Broderick, M. Jankowski *et al.*, 2014 Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice. *Diabetologia* 57: 1257-1267.
- Pollack, J. A., J. P. Skvorak, S. J. Nazian, C. S. Landon and J. R. Dietz, 1997 Alterations in atrial natriuretic peptide (ANP) secretion and renal effects in aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52: B196-202.
- Porte, D., Jr., and R. P. Robertson, 1973 Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and the sympathetic nervous system. *Fed Proc* 32: 1792-1796.
- Potter, L. R., 2011 Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 23: 1921-1926.
- Potter, L. R., S. Abbey-Hosch and D. M. Dickey, 2006 Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27: 47-72.
- Racz, B., M. Duskova, K. Vondra, M. Sramkova, M. Hill *et al.*, 2015 Daily profiles of steroid hormones and their metabolites related to food intake. *Physiol Res* 64 Suppl 2: S219-225.

- Rademaker, M. T., and A. M. Richards, 2005 Cardiac natriuretic peptides for cardiac health. *Clin Sci (Lond)* 108: 23-36.
- Ramos, H. R., A. L. Birkenfeld and A. J. de Bold, 2015 INTERACTING DISCIPLINES: Cardiac natriuretic peptides and obesity: perspectives from an endocrinologist and a cardiologist. *Endocr Connect* 4: R25-36.
- Rhodes, C. J., 2005 Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307: 380-384.
- Robson-Doucette, C. A., S. Sultan, E. M. Allister, J. D. Wikstrom, V. Koshkin *et al.*, 2011 Beta-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion. *Diabetes* 60: 2710-2719.
- Ropero, A. B., P. Alonso-Magdalena, I. Quesada and A. Nadal, 2008 The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids* 73: 874-879.
- Ropero, A. B., E. Fuentes, J. M. Rovira, C. Ripoll, B. Soria *et al.*, 1999 Non-genomic actions of 17beta-oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol* 521 Pt 2: 397-407.
- Ropero, A. B., S. Soriano, E. Tuduri, L. Marroqui, N. Tellez *et al.*, 2010 The atrial natriuretic peptide and guanylyl cyclase-A system modulates pancreatic beta-cell function. *Endocrinology* 151: 3665-3674.
- Rosman, G. J., T. J. Martins, W. K. Sonnenburg, J. A. Beavo, K. Ferguson *et al.*, 1997 Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 191: 89-95.
- Ruskoaho, H., 1992 Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 44: 479-602.
- Ryden, M., J. Backdahl, P. Petrus, A. Thorell, H. Gao *et al.*, 2016 Impaired atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in obesity. *Int J Obes (Lond)* 40: 714-720.
- Sachdeva, M. M., K. C. Claiborn, C. Khoo, J. Yang, D. N. Groff *et al.*, 2009 Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19090-19095.
- Sarzani, R., P. Dessi-Fulgheri, V. M. Paci, E. Espinosa and A. Rappelli, 1996 Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *J Endocrinol Invest* 19: 581-585.
- Schlueter, N., A. de Sterke, D. M. Willmes, J. Spranger, J. Jordan *et al.*, 2014 Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther* 144: 12-27.
- Schreier, B., S. Borner, K. Volker, S. Gambaryan, S. C. Schafer *et al.*, 2008 The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology* 149: 4193-4199.

- Schroter, J., R. P. Zahedi, M. Hartmann, B. Gassner, A. Gazinski *et al.*, 2010 Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *FEBS J* 277: 2440-2453.
- Schultz, H. D., D. G. Gardner, C. F. Deschepper, H. M. Coleridge and J. C. Coleridge, 1988 Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* 255: R6-13.
- Schulz, S., S. Singh, R. A. Bellet, G. Singh, D. J. Tubb *et al.*, 1989 The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58: 1155-1162.
- Sengenès, C., A. Bouloumie, H. Hauner, M. Berlan, R. Busse *et al.*, 2003 Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278: 48617-48626.
- Sengenès, C., A. Zakaroff-Girard, A. Moulin, M. Berlan, A. Bouloumie *et al.*, 2002 Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R257-265.
- Sergeeva, I. A., and V. M. Christoffels, 2013 Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochim Biophys Acta* 1832: 2403-2413.
- Seshadri, N., M. E. Jonasson, K. L. Hunt, B. Xiang, S. Cooper *et al.*, 2017 Uncoupling protein 2 regulates daily rhythms of insulin secretion capacity in MIN6 cells and isolated islets from male mice. *Mol Metab* 6: 760-769.
- Shields, P. P., J. E. Dixon and C. C. Glembotski, 1988 The secretion of atrial natriuretic factor-(99-126) by cultured cardiac myocytes is regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem* 263: 12619-12628.
- Skelin, M., M. Rupnik and A. Cencic, 2010 Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX* 27: 105-113.
- Skryabin, B. V., R. Holtwick, L. Fabritz, M. N. Kruse, I. Veltrup *et al.*, 2004 Hypervolemic hypertension in mice with systemic inactivation of the (floxed) guanylyl cyclase-A gene by alphaMHC-Cre-mediated recombination. *Genesis* 39: 288-298.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner *et al.*, 1985 Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Sobecki, M., K. Mrouj, A. Camasses, N. Parisi, E. Nicolas *et al.*, 2016 The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife* 5: e13722.
- Sonne, D. P., D. Terzic, F. K. Knop and J. P. Goetze, 2017 Postprandial Plasma Concentrations of ProANP in Patients with Type 2 Diabetes and Healthy Controls. *Clin Chem* 63: 1040-1041.
- Soriano, S., C. Ripoll, E. Fuentes, A. Gonzalez, P. Alonso-Magdalena *et al.*, 2011 Regulation of K(ATP) channel by 17beta-estradiol in pancreatic beta-cells. *Steroids* 76: 856-860.

- Soriano, S., A. B. Ropero, P. Alonso-Magdalena, C. Ripoll, I. Quesada *et al.*, 2009 Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17 β -estradiol in pancreatic β -cells involves the estrogen receptor β and the atrial natriuretic peptide receptor. *Mol Endocrinol* 23: 1973-1982.
- Souza, B. M., T. S. Assmann, L. M. Kliemann, J. L. Gross, L. H. Canani *et al.*, 2011 The role of uncoupling protein 2 (UCP2) on the development of type 2 diabetes mellitus and its chronic complications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 55: 239-248.
- Speakman, J., C. Hambly, S. Mitchell and E. Krol, 2007 Animal models of obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1: 55-61.
- Spiessberger, B., D. Bernhard, S. Herrmann, S. Feil, C. Werner *et al.*, 2009 cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion. *FEBS J* 276: 1007-1013.
- Staffel, J., D. Valletta, A. Federlein, K. Ehm, R. Volkman *et al.*, 2017 Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A in Podocytes is Renoprotective but Dispensable for Physiologic Renal Function. *J Am Soc Nephrol* 28: 260-277.
- Stamateris, R. E., R. B. Sharma, D. A. Hollern and L. C. Alonso, 2013 Adaptive beta-cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E149-159.
- Standeven, K. F., K. Hess, A. M. Carter, G. I. Rice, P. A. Cordell *et al.*, 2011 Nephrylin, obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 35: 1031-1040.
- Stephenson, D. T., T. M. Coskran, M. B. Wilhelms, W. O. Adamowicz, M. M. O'Donnell *et al.*, 2009 Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem* 57: 933-949.
- Stephenson, S. L., and A. J. Kenny, 1987 The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 243: 183-187.
- Sudoh, T., K. Kangawa, N. Minamino and H. Matsuo, 1988 A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332: 78-81.
- Sudoh, T., N. Minamino, K. Kangawa and H. Matsuo, 1990 C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 863-870.
- Suga, S., K. Nakao, K. Hosoda, M. Mukoyama, Y. Ogawa *et al.*, 1992 Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130: 229-239.
- Sugisawa, T., I. Kishimoto, Y. Kokubo, A. Nagumo, H. Makino *et al.*, 2010 Visceral fat is negatively associated with B-type natriuretic peptide levels in patients with advanced type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 89: 174-180.
- Tamura, N., Y. Ogawa, H. Chusho, K. Nakamura, K. Nakao *et al.*, 2000 Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4239-4244.

- Tauscher, S., H. Nakagawa, K. Volker, F. Werner, L. Krebs *et al.*, 2018 beta Cell-specific deletion of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, accelerates obesity-induced glucose intolerance in mice. *Cardiovasc Diabetol* 17: 103.
- Theilig, F., and Q. Wu, 2015 ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F1047-1055.
- Thibault, G., F. Amiri and R. Garcia, 1999 Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart. *Annu Rev Physiol* 61: 193-217.
- Uehlinger, D. E., P. Weidmann, M. P. Gnadinger, L. Hasler, C. Bachmann *et al.*, 1986 Increase in circulating insulin induced by atrial natriuretic peptide in normal humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 8: 1122-1129.
- Undank, S., J. Kaiser, J. Sikimic, M. Dufer, P. Krippeit-Drews *et al.*, 2017a Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Affects Stimulus-Secretion Coupling of Pancreatic beta-Cells. *Diabetes*.
- Undank, S., J. Kaiser, J. Sikimic, M. Dufer, P. Krippeit-Drews *et al.*, 2017b Atrial Natriuretic Peptide Affects Stimulus-Secretion Coupling of Pancreatic beta-Cells. *Diabetes* 66: 2840-2848.
- van den Akker, F., 2001 Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J Mol Biol* 311: 923-937.
- van Deursen, V. M., A. F. Hernandez, A. Stebbins, V. Hasselblad, J. A. Ezekowitz *et al.*, 2014 Nesiritide, renal function, and associated outcomes during hospitalization for acute decompensated heart failure: results from the Acute Study of Clinical Effectiveness of Nesiritide and Decompensated Heart Failure (ASCEND-HF). *Circulation* 130: 958-965.
- Ventura-Clapier, R., E. Dworatzek, U. Seeland, G. Kararigas, J. F. Arnal *et al.*, 2017 Sex in basic research: concepts in the cardiovascular field. *Cardiovasc Res* 113: 711-724.
- Verboven, K., D. Hansen, J. W. E. Jocken and E. E. Blaak, 2017 Natriuretic peptides in the control of lipid metabolism and insulin sensitivity. *Obes Rev* 18: 1243-1259.
- Verboven, K., D. Hansen, C. Moro, B. O. Eijnde, N. Hoebbers *et al.*, 2016 Attenuated atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in subcutaneous adipocytes of obese type 2 diabetic men. *Clin Sci (Lond)* 130: 1105-1114.
- Verspohl, E. J., and H. P. Ammon, 1989 Atrial natriuretic peptide (ANP) acts via specific binding sites on cGMP system of rat pancreatic islets without affecting insulin release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 339: 348-353.
- Verspohl, E. J., M. Kuhn and H. P. Ammon, 1988 RIN m5F (rat insulinoma) cells possess receptors for atrial natriuretic peptide (ANP) and a functioning cGMP system. *Horm Metab Res* 20: 700-701.
- Vila, G., G. Grimm, M. Resl, B. Heinisch, E. Einwallner *et al.*, 2012 B-type natriuretic peptide modulates ghrelin, hunger, and satiety in healthy men. *Diabetes* 61: 2592-2596.
- Vollmar, A. M., 1990 Atrial natriuretic peptide in peripheral organs other than the heart. *Klin Wochenschr* 68: 699-708.

- Volpe, M., M. Carnovali and V. Mastromarino, 2016 The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clin Sci (Lond)* 130: 57-77.
- Wang, T. J., M. G. Larson, D. Levy, E. J. Benjamin, E. P. Leip *et al.*, 2004 Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 109: 594-600.
- Weidemann, A., B. Klanke, M. Wagner, T. Volk, C. Willam *et al.*, 2008 Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha, is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. *Biochem J* 409: 233-242.
- Weinfeld, M. S., G. M. Chertow and L. W. Stevenson, 1999 Aggravated renal dysfunction during intensive therapy for advanced chronic heart failure. *Am Heart J* 138: 285-290.
- You, H., and S. G. Laychock, 2009 Atrial natriuretic peptide promotes pancreatic islet beta-cell growth and Akt/Foxo1a/cyclin D2 signaling. *Endocrinology* 150: 5455-5465.
- You, H., and S. G. Laychock, 2011 Long-term treatment with atrial natriuretic peptide inhibits ATP production and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E435-444.
- Zhang, C. Y., G. Baffy, P. Perret, S. Krauss, O. Peroni *et al.*, 2001 Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105: 745-755.
- Zhao, A. Z., H. Zhao, J. Teague, W. Fujimoto and J. A. Beavo, 1997 Attenuation of insulin secretion by insulin-like growth factor 1 is mediated through activation of phosphodiesterase 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3223-3228.
- Zhou, Y., and Q. Wu, 2014 Corin in natriuretic peptide processing and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 16: 415.
- Zucker, I., and A. K. Beery, 2010 Males still dominate animal studies. *Nature* 465: 690.
- Zufall, F., and S. D. Munger, 2010 Receptor guanylyl cyclases in mammalian olfactory function. *Mol Cell Biochem* 334: 191-197.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase I
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cre	<i>causes recombination / cyclization recombination</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
E2	17 β -Östradiol
ER β	Östrogenrezeptor β
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FKS	fötales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GC-A	Guanylylcyclase A
GLUT-2/4	Glukosetransporter Typ 2 bzw. 4
GSIS	Glukose-stimulierte Insulinsekretion
GTP	Guanosinmonophosphat
h	Stunde
HFD	Hochfettdiät

HI	hitzeinaktiviert
i.p.	intraperitoneal
ITT	Insulintoleranz-Test
IU	internationale Einheit
K	Kalium
KGW	Körpergewicht
KO	Knockout
Konz.	Konzentration
l	Liter
loxP	<i>locus of X-over P1</i>
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ng	Nanogramm
ND	Normaldiät
NGS	Normal Goat Serum
NP(s)	Natriuretische(s) Peptid(e)
OD	optische Dichte
oGTT	oraler Glukosetoleranz-Test
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKG	Proteinkinase G

(P)PM	(Post-) Plasmamembran
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RIA	Radioimmunoassay
RIP	<i>rat insulin promotor</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Temp.	Temperatur
T2D	Diabetes Mellitus Typ 2
Ucp2	Uncoupling Protein 2
UPL	Universal Probe Library
V	Volt

7 ANHANG

7.1 Puffer und Lösungen

A + AB - Lösung:	135 mM NaCl 5,6 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ , wasserfrei 1,28 mM CaCl ₂ 3 mM Glucose 10 mM Hepes 0,1 % BSA 1 % (v/v) Pen/Strep (final: 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) pH 7,4
Laemmli-Puffer, 3x:	200 mM Tris-HCl (pH 6,8) 6 % (w/v) SDS 15 % (v/v) Glycerol 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau pH 6,7
Lauf-Puffer:	25 mM Tris 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
PBS, 1x:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Ponceau S-Lösung:	0,2 % (m/v) Ponceau S 10 % Trichloressigsäure

Puffer A:	50 mM Tris, pH 8 0,5 mM DTT (Dithiothreitol) 0,1 % (v/v) NP-40 (Nonidet-P40) 50x Protease-Inhibitoren 10x Phosphatase-Inhibitoren ddH ₂ O
Sammelgel, 4 %:	6,8 ml ddH ₂ O 1,7 ml Acrylamid (30 %) 1,25 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) 100 µl SDS (10 %) 100 µl APS (10 %) 10 µl TEMED
TAE-Puffer, 50x:	2 M Tris 0,25 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH 8,0
TBS-T-Puffer:	19,8 mM Tris 94,6 mM NaCl pH 7,4 0,1 % (v/v) Tween®20
Transfer-Puffer:	25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol 192 mM Glycin
Trenngel, 10 %:	7,9 ml ddH ₂ O 6,7 ml Acrylamid (30 %) 5,0 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (10 %) 8 µl TEMED

Verdau-Puffer:
 100 mM Tris
 5 mM EDTA
 200 mM NaCl
 0,2 % (w/v) SDS
 PCR-H₂O

7.2 Substanzen

Firma:

AppliChem GmbH, Darmstadt
 Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
 Bio&Sell GmbH, Feucht
 Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
 ChinaPeptides Co Ltd, Shanghai, China
 Dianova GmbH, Hamburg
 GE Healthcare GmbH, Freiburg
 Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
 Gerbu Biotechnik GmbH, Heidelberg
 Merck KGaA, Darmstadt
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
 Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
 Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

Name:

Formaldehyd-Lösung 4 %, Hepes
 BNP-45 (mouse) trifluoroacetate salt
 Agarose
 Acrylamid, Isopropanol, Natriumacetat, Milchpulver, Phenol
 ANP (1-28) (rat)
 Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI
 Penicillin/Streptomycin 100x, Transfermembran Amersham Protran 0,2 µm
 RedMastermix (2X) Taq PCR Mastermix
 BSA (TYPE-H1)
 Chloroform, Ethanol, Glucose, Glycin, Methanol, MgCl₂ (wasserfrei), NaCl, Trichloressigsäure
 Collagenase P, cOmplete Protease EASYpack, cOmplete Phosphatase EASYpack, FastStart Essential DNA Probes Master, Laminin
 APS, β-Estradiol, β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, CaCl₂, D-(+)-Glukose, Dithiothreitol, EDTA, Glycerol, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, Nancy-520, Nonidet P-40, PCR-Wasser, Ponceau S, Proteinase K, REDTaq® PCR Reaction Mix, SDS, TEMED, Tris, Tween®20
 GeneRuler 100bp DNA Ladder,
 Gibco® RPMI-1640 Medium Glutamaxx-Supplement, Gibco® RPMI-1640 no Glucose, Normal Goat Serum 10 %, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa), Pierce® BCA Protein Assay Reagent A, Pierce® ECL Western Blotting Substrate, RNALater®, Trizol®

7.3 Standardtierfutter und Experimentaldiäten

Produkt	% kcal aus Fett	Hersteller	Bestellnummer
Alleinfuttermittel Maus-Haltung	9	ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest	V15340
DIO Low Fat Control Diet	10	Research Diets Inc., New Brunswick, USA	D 12450B
DIO High Fat Diet	60		D 12492

8 PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE

Publikationen

Tauscher S, Nakagawa H, Völker K, Werner F, Krebs L, Potapenko T, Baba HA, Birkenfeld AL, Kuhn M
β Cell-specific deletion of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, accelerates obesity-induced glucose intolerance in mice. *Cardiovasc Diabetol* (2018) 17:103

Tauscher S, Nakagawa H, Völker K, Kuhn M
Conditional, cell-restricted deletion of Guanylyl Cyclase A in pancreatic beta cells reveals protective ANP effects in experimental diabetes. *Endocr Rev* (2016) Volume 37, Issue Suppl

Tauscher S, Nakagawa H, Völker K, Gaßner B, Pröhl S, Kuhn M
Role of atrial natriuretic peptide (ANP) in the regulation of insulin secretion and vitality of pancreatic β cells. *BMC Pharmacol Toxicol* (2015) 16(Suppl 1):A92

Konferenzbeiträge

Sabine Tauscher, Katharina Völker, Lisa Krebs, Michaela Kuhn
Cardiac natriuretic peptides improve pancreatic beta-cell function (Vortrag/Poster)
8th International Conference on cGMP, Bamberg, Juni 2017

Sabine Tauscher, Katharina Völker, Lisa Krebs, Michaela Kuhn
Cardiac natriuretic peptides exert protective effects on pancreatic beta-cells (Vortrag/Poster)
60. Deutscher Kongress für Endokrinologie, Würzburg, März 2017

Sabine Tauscher, Hitoshi Nakagawa, Katharina Völker, Michaela Kuhn
Conditional, cell-restricted deletion of Guanylyl Cyclase A in pancreatic beta cells reveals protective ANP effects in experimental diabetes (Poster)
98th Annual Meeting of the American Endocrine Society, Boston, USA, April 2016

Sabine Tauscher, Hitoshi Nakagawa, Katharina Völker, Michaela Kuhn
Beyond blood pressure: Cardiac atrial natriuretic peptide regulates pancreatic β-cell proliferation in experimental diabetes (Poster)
95. Jährliches Treffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Lübeck, März 2016

Sabine Tauscher, Hitoshi Nakagawa, Katharina Völker, Birgit Gaßner, Saskia Pröhl, Michaela Kuhn
Role of atrial natriuretic peptide (ANP) in the regulation of insulin secretion and vitality of pancreatic β cells (Poster)
7th International Conference on cGMP, Trier, Juni 2015

9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Durchführung und der Vollendung dieser Dissertation unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn für die fachliche Betreuung und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit zu diesem spannenden Thema innerhalb ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Liebe Frau Kuhn, ich danke Ihnen sehr für ihre wertvolle Unterstützung, sei es durch konstruktive Diskussionen, hilfreiche Ratschläge oder motivierende Worte gewesen. Zudem bin ich Ihnen dankbar, dass ich meine Ergebnisse auf verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen vorstellen durfte. Ich werde mich immer gerne an meine Promotionszeit in Würzburg erinnern!

Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens sowie seine Ratschläge und Zeit bei gemeinsamen Besprechungen.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Hideo A. Baba und seiner Mitarbeiterin Frau Dorothe Möllmann danken für die Gewebeeinbettung und Herstellung der Paraffinschnitte. Herrn Dr. Hitoshi Nakagawa danke ich für die Durchführung und Auswertung eines Teils der Inselelasmorphometrie. Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Gisela Drews für die Möglichkeit und Frau Dr. Sabrina Undank für die Hilfsbereitschaft beim Erlernen der Pankreaspräparation und Inselisolation.

Meinen Kollegen Konstanze Michel, Dr. Franziska Werner, Dr. Wen Chen, Dr. Katarina Spiranec, Dr. Erick Miranda-Laferte und Dr. Simone Pickel danke ich für den wissenschaftlichen Austausch, die fachliche Unterstützung aber auch die schöne Zeit am Institut!

Weiterhin möchte ich mich bei den technischen Angestellten der Arbeitsgruppe Lisa Krebs und Tamara Potapenko sowie den Tierpflegerinnen des Institutes für ihren Einsatz, ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch der leider verstorbenen Birgit Gaßner für ihre unkomplizierte, herzliche Art mit der sie allen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein Dankeschön geht auch an alle Kollegen der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Kai Schuh und Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe für die angenehme Arbeitsatmosphäre aber auch die unterhaltsamen Pausen. Unserer Sekretärin Bärbel Zumkeller danke ich für ihre Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Angelegenheiten, das Korrekturlesen (nicht nur) der Doktorarbeit und ihr stets offenes Ohr.

Ein sehr herzliches Dankeschön geht an meine „Labor-Mama“ Frau Katharina Völker. Liebe Katharina, ich danke dir wirklich von Herzen für deine tatkräftige Unterstützung im Labor und während der unzähligen Stunden zusammen im Tierstall. Danke für deine humorvolle Art, deine Ratschläge und deine Freundschaft im und auch außerhalb des Laboralltags!

Nirina Sivakumar, Anne Aue und Saskia Fischer bin ich dankbar für die vielen lustigen Momente und die schöne, freundschaftliche Zeit in Würzburg!

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken:

Meinen lieben Eltern danke ich für ihre immerwährende Unterstützung und ihren Rückhalt! Ihr habt mir das Studium ermöglicht und ohne euer Vertrauen hätte ich die anschließende Promotion nicht gewagt. Genauso bin ich euch und Sylvia dankbar, dass ihr immer für mich da seid und für die schöne Zeit, die ihr mir bei Telefonaten oder Besuchen in der Heimat schenkt.

Meinem Freund Johannes danke ich für seine unermüdliche und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen. Auch wenn wir uns erst nach meiner Zeit am Institut kennengelernt haben, so hast du doch durch deine motivierende Art und deine Begeisterungsfähigkeit meinen Ehrgeiz zur Fertigstellung der Diss bis zum Ende aufrechterhalten!