

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl I, Vegetative Physiologie**

Vorstand: Professor Dr. med. Michaela Kuhn



**Bedeutung der cGMP-abhängigen Protein Kinase I für die kardialen
Effekte des atrialen natriuretischen Peptids**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Biologischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Michael Klaiber
aus Löchgau**

Würzburg, Oktober 2011

Referentin:

Professor Dr. med. Michaela Kuhn

Korreferent:

Professor Dr. rer. nat. Thomas Brand

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Diplom-Biologe

Vorwort

Die vorliegende kumulative Dissertationsarbeit besteht aus den Ergebnissen der folgenden veröffentlichten oder zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte:

Publikation 1:

Klaiber M, Kruse M, Völker K, Schröter J, Feil R, Freichel M, Gerling A, Feil S, Dietrich A, Londoño JE, Baba HA, Abramowitz J, Birnbaumer L, Penninger JM, Pongs O, Kuhn M. 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.* 2010;105:583-95.

Publikation 2:

Frantz S*, **Klaiber M***, Baba HA*, Oberwinkler H, Völker K, Gaßner B, Bayer B, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M. Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Eur H J.* 2011; in press.

*Equally contributed

Publikation 3:

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang RB, Völker K, Gaßner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 18500-5.

*Equally contributed

Diese drei Manuskripte sind im Anhang beigelegt. In einer Einleitung (Kapitel 1) wird auf das Thema der Arbeit (Kapitel 2) hingeführt. Die genutzten Methoden und Chemikalien sind in Kapitel 3 dargestellt. Es werden ausschließlich die Methoden beschrieben, welche im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eigenständig oder in Zusammenarbeit angewandt wurden. Die Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse (Kapitel 4 und 5) stellt die Bedeutung der Ergebnisse übergreifend dar.

Eigene Beteiligung

Die in den drei Publikationen geschilderten sehr komplexen Untersuchungen wurden zusammen mit vielen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Professor Michaela Kuhn und mit kooperierenden Arbeitsgruppen durchgeführt. Die folgenden Experimente wurden selbständig und vollständig von mir durchgeführt:

- Fluorometrische Messungen der Calcium-Transienten an isolierten adulten murinen Kardiomyozyten mittels Indo-1AM
- Messungen der Kontraktilität isolierter adulter muriner Kardiomyozyten mittels „*edge-detection*“
- Nicht-invasive Blutdruckmessungen an wachen Mäusen mittels „*tail-cuff*“ Plethysmographie
- Nekropsie und Morphometrische Analysen der Herzhypertrophie und kardialen Fibrose
- Western Blot-Analysen
- Transfektions- und Ko-Immunopräzipitationsexperimente zur Interaktion von GC-A und TRPC3/C6 Kanälen in HEK293-Zellen

Würzburg, den

Michael Klaiber

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
2.	Ziele der vorliegenden Dissertationsarbeit	12
3.	Materialien und Methoden	13
3.1	Genetische Mausmodelle	13
3.1.1	Tierhaltung	13
3.1.2	Genotypisierungen	13
3.1.2.1	DNA Extraktion	14
3.1.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	14
3.2	Untersuchungen an isolierten murinen adulten Kardiomyozyten	15
3.2.1	Isolierung der Myozyten	15
3.2.2	Fluorometrische Messungen der intrazellulären Calcium-Transienten	17
3.2.3	Aufzeichnung der Kontraktionen einzelner Myozyten	19
3.3	Tierexperimentelle Untersuchungen	20
3.3.1	Implantation von osmotischen Minipumpen	20
3.3.1.1	Befüllung der Pumpen mit Angiotensin II oder Isoproterenol	21
3.3.1.2	Chirurgische Implantation der osmotischen Minipumpen	21
3.3.2	Plethysmographische Messungen des arteriellen Blutdrucks	22
3.3.3	Nekropsie	23
3.3.4	Histologische und morphometrische Analysen	23
3.3.4.1	Messung des linksventrikulären Myozytendurchmessers	24
3.3.4.2	Bestimmung des Kollagenfasergehalts in den linken Ventrikeln	24
3.3.5	Western Blot-Analysen der Expression und Phosphorylierung kardialer Proteine	24
3.3.5.1	Homogenisierung des linksventrikulären Gewebes	25
3.3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Gewebeextrakte	25
3.3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Protein-Transfer	26
3.3.5.4	Immundetektion von Proteinen und Auswertung der immunreaktiven Signale	27

3.4	Untersuchungen an HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen	29
3.4.1	Transfektion	29
3.4.2	Extraktion der membranständigen Proteine	30
3.4.3	Immunpräzipitation des FLAG-tagged GC-A-Rezeptors	31
3.4.4	Western Blot-Analysen	31
3.5	Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung	32
4.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	33
	Projektteil A: Charakterisierung der lokalen, kardialen antihypertrophen Effekte des ANP/GC-A Signalwegs.	33
	Projektteil B: Charakterisierung eines neuen genetischen Mausmodells mit konditionaler Deletion der cGMP-abhängigen Protein Kinase I in Kardiomyozyten.	35
	Projektteil C: Entdeckung einer bislang unbekanntem, cGMP-unabhängigen Signalfunktion des kardialen GC-A-Rezeptors.	37
5.	Summary	39
6.	Literaturverzeichnis	42
7.	Lebenslauf	47
8.	Eidesstattliche Erklärung	48
9.	Anhang	

Publikation 1:

Klaiber M, Kruse M, Völker K, Schröter J, Feil R, Freichel M, Gerling A, Feil S, Dietrich A, Londoño JE, Baba HA, Abramowitz J, Birnbaumer L, Penninger JM, Pongs O, Kuhn M. 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.* 2010;105:583-95.

Publikation 2:

Frantz S*, **Klaiber M***, Baba HA*, Oberwinkler H, Völker K, Gaßner B, Bayer B, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M. Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. Eur H J. 2011; in press.

*Equally contributed

Publikation 3:

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang RB, Völker K, Gaßner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:18500-5.

*Equally contributed

1. Einleitung

Die essentielle Hypertonie ist mit ihren kardialen Komplikationen (Herzhypertrophie, Herzinsuffizienz, plötzlicher Herztod) weltweit die häufigste kardiovaskuläre Erkrankung. Die beteiligten Mechanismen sind multifaktoriell und zu einem großen Teil ungeklärt. Ein früher und pathognomonischer Marker dieser Erkrankungen ist die erhöhte kardiale Bildung und Sekretion der beiden natriuretischen Peptide atriales (ANP) und B-Typ natriuretisches Peptid (BNP). So belegen viele Studien die diagnostische und auch prognostische Bedeutung erhöhter ANP- und BNP-Plasmakonzentrationen (Ambrosi et al., 2002; Baughman et al., 2002; Berger et al., 2002; Bulut et al., 2002; Vasan et al., 2002). Weiterhin hat die intravenöse Behandlung mit synthetischen ANP/BNP-Analoga in einigen Ländern einen hohen Stellenwert zur Therapie der akuten Herzinsuffizienz. Synthetisches ANP (Anaritide^R) und BNP (Natreacor^R) sind in Japan bzw. in den USA bereits seit vielen Jahren für die Behandlung der akuten Herzinsuffizienz zugelassen (Poole-Wilson, 2002; Silver et al. 2002). Die Arbeitsgruppe von John C. Burnett an der Mayo Klinik in Rochester entwickelt und prüft seit vielen Jahren die Effekte von ANP-Analoga und Peptid-Chimeren (welche Teilsequenzen von ANP/BNP oder ANP und C-typ natriuretischem Peptid, CNP, enthalten) bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Die schützenden Effekte dieser Peptide an einem Hundemodell der Herzinsuffizienz scheinen sich in ersten klinischen Studien zu bestätigen (Boerrigter et al., 2009; McKie et al., 2010; Zakeri & Burnett 2011).

Im gesunden Herzen wird ANP ausschließlich in den Atria und BNP in Atria und Ventrikeln gebildet (Tremblay et al., 2002). Der spezifische Rezeptor für diese beiden Peptide ist die membranständige Guanylyl Cyclase-A (GC-A), welche vor allem in Blutgefäßen, zentralem Nervensystem, Niere und Nebenniere exprimiert wird. Aktivierung der GC-A durch Bindung von ANP oder BNP führt zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP und darüber zu Vasodilatation, Abnahme des Sympathikustonus, Diurese/Natriurese sowie Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und letztlich zu Blutdrucksenkung (Übersicht von Tremblay et al., 2002; Kuhn 2003; Kuhn 2009). Folgende experimentelle Beobachtungen deuten darauf hin, dass ANP und BNP auch lokale Effekte im Herzen selbst haben und Zellwachstum im Herzen und auch die Kontraktilität und Relaxation der Kardiomyozyten modulieren: Der GC-A-Rezeptor wird in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten exprimiert, und die Bindung der natriuretischen Peptide an diesen Rezeptor führt zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration und Abnahme der intrazellulären Calcium-Konzentration (Rugg et al., 1989; Nunez et al., 1992; Lin et al., 1995; Yoshizumi et al., 1997). Diese molekularen Effekte beeinflussen sowohl das Wachstum als auch die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten. So hemmt ANP die Proliferation von neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten und stimuliert ihre Apoptose (Ito et al., 1993; Fujisaki et al., 1995; Cao 1995; Wu et al., 1997). In transgenen Mäusen führt die

Überexpression des GC-A-Rezeptors in Kardiomyozyten zu leichter Hypotrophie und weiterhin zu Hemmung der reaktiven Hypertrophie bei gesteigerter Nachlast des Herzens (Kishimoto et al., 2001). Sehr widersprüchliche Befunde wurden zu den Effekten von ANP auf die mechanischen Herzfunktionen publiziert: An isolierten adulten Kardiomyozyten und isolierten Papillarmuskeln der Ratte führt ANP zu beschleunigter Relaxation (Meulemans et al., 1988; Hempel et al., 1997; Takimoto et al., 2007). An isoliert perfundierten Maus-Herzen wurden keine direkten Effekte, stattdessen aber indirekte ANP-Effekte auf andere regulierende Systeme beobachtet (Pierkes et al., 2002). Auch in klinisch-pharmakologischen Studien am Menschen wurden teilweise hemmende oder auch stimulierende Effekte des ANP auf die Herzinotropie und Lusitropie beobachtet (Semigran et al., 1994; Clarkson et al., 1995; Nakajima et al., 2005). Diese Problematik steht sicher in Zusammenhang mit den endokrinen, blutdrucksenkenden Effekten des Peptids, welche natürlich indirekterweise die Herzfunktion beeinflussen und die Beurteilung direkter kardialer Effekte in vivo erschweren.

Bei Patienten mit Herzhypertrophie/Herzinsuffizienz und auch bei plötzlichem Herztod sind die kardiale Bildung und Blutplasmakonzentrationen von ANP und BNP um ein Vielfaches erhöht, wobei die funktionelle Bedeutung gänzlich unklar ist (Ambrosi et al., 2002; Baughman et al., 2002; Berger et al., 2002; Bulut et al., 2002; Vasan et al., 2002). In Anbetracht der diuretischen und vasodilatierenden Effekte dieser Peptide könnte die gesteigerte ANP/BNP-Sekretion einen "protektiven" kompensatorischen Mechanismus zur Senkung der Vor- und Nachlast des Herzens darstellen. Viele Studien zeigten jedoch, dass die renale und vaskuläre Wirksamkeit von intravenös appliziertem, synthetischem ANP oder BNP bei herzinsuffizienten Patienten stark vermindert ist, was auf eine Hemmung der Funktion der ANP-Rezeptoren (verminderte Expression oder Sensitivität der GC-A) zurückgeführt wird (Schiffrin 1988; Hirooka et al., 1990; Tsutamoto et al., 1993; Nakamura et al., 1994; Yamamoto et al., 1997). Untersuchungen an Patienten mit essentieller Hypertonie zeigten, dass bereits bei dieser Erkrankung die ANP-Plasmakonzentrationen signifikant erhöht, die vasodilatierenden Effekte des Peptids dagegen sehr stark abgeschwächt sind (Bulut et al., 2002). Zusammengenommen deuten diese Befunde auf einen Rezeptor- oder Postrezeptor-Defekt des ANP/GC-A-Systems bei bestimmten Formen der essentiellen Hypertonie und vor allem bei Herzhypertrophie/Herzinsuffizienz hin. Tatsächlich zeigen molekularbiologische und biochemische Analysen an humanen Myokardproben, dass die mRNA-Expression und ANP-Stimulierbarkeit des GC-A-Rezeptors sowohl bei ischämischer als auch bei dilatativer Kardiomyopathie signifikant vermindert ist (Kuhn et al., 2004). Eine Assoziation mit einer funktionell relevanten Mutation des humanen GC-A-Gens wurde in Japan beschrieben (Nakayama et al., 2000), konnte durch Analysen an über 200 deutschen Patienten bislang aber nicht bestätigt werden (Bulut et al., 2002). Der genaue molekulare Mechanismus des GC-A-Rezeptordefekts bleibt somit unklar. Biochemische Arbeiten von Lincoln R. Potter an

³²P-markierten, GC-A- überexprimierenden HEK293-Zellen zeigten, dass der GC-A-Rezeptor unter "basalen" Bedingungen phosphoryliert ist (Potter 2011). Homologe (durch hohe ANP-Konzentrationen) oder heterologe Desensibilisierung des Rezeptors (z. B. durch Angiotensin II) korrelierte mit Dephosphorylierung des Rezeptors (Potter 2011). Die spezifischen Phosphorylierungsstellen wurden in der AG Kuhn mittels massenspektrometrischen (MS) Analysen identifiziert. Hiermit wurden sieben Phosphorylierungsstellen innerhalb der intrazellulären Domäne des GC-A-Rezeptors nachgewiesen: an Ser₄₉₇, Thr₅₀₀, Ser₅₀₂, Ser₅₀₅, Ser₅₁₀, Thr₅₁₃ und Ser₄₈₇ (Schröter et al., 2010). Semiquantitative Analysen mittels „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) zeigten, dass die homologe (ANP-induzierte) Desensibilisierung mit einem komplexen Phosphorylierungsmuster einhergeht. Die GC-A-Rezeptorpopulation mit Phosphorylierung von Ser₄₉₇, Thr₅₀₀, Ser₅₀₂, Ser₅₀₅, Ser₅₁₀ und Thr₅₁₃ war vermindert. Interessanterweise war die Phosphorylierung an Ser₄₈₇ aber gesteigert (Schröter et al., 2010). Möglicherweise tragen solche posttranslationalen Veränderungen auch zu dem zuvor beschriebenen Defekt des ANP/GC-A-Systems bei essentieller Hypertonie oder Herzhypertrophie/Herzinsuffizienz im Menschen bei.

Der verminderte Effekt von exogenem synthetischem ANP deutet darauf hin, dass auch die Wirkungen des endogenen ANP und BNP in Patienten mit arterieller Hypertonie bzw. bei Herzhypertrophie/Herzinsuffizienz vermindert sind, was in Anbetracht der endokrinen und möglichen kardialen Wirkungen dieser Peptide die Progression dieser kardiovaskulären Erkrankungen beschleunigen könnte. Die ANP-Produktion könnte somit ein Schutzmechanismus sein, dessen funktionelle Bedeutung durch einen Rezeptor- oder Postrezeptor-Defekt insbesondere bei Herzinsuffizienz mehr und mehr abgeschwächt ist. In der Arbeitsgruppe von Frau Professor Michaela Kuhn stehen verschiedene monogenetische Maus-Modelle zur Verfügung, welche diesen putativen Rezeptordefekt bei der dekompensierten menschlichen Herzinsuffizienz, aber auch die monogenetisch bedingte Hypertonie mit konsekutiver Herzinsuffizienz nachahmen können.

Zum einen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. D.L. Garbers am Howard Hughes Medical Institute in Dallas/Texas Gen-knockout Mäuse mit einer globalen, systemischen Deletion des ANP-Rezeptors (GC-A ^{-/-}) generiert. Der Phänotyp ist charakterisiert durch chronische arterielle Hypertonie, Herzhypertrophie und erhöhte spontane Letalität (Lopez et al., 1995). Die Herzen von GC-A ^{-/-} Mäusen zeigen eine Reihe von histologischen, funktionellen, elektrophysiologischen und biochemischen Veränderungen, die sich wie folgt zusammenfassen lassen: 1. stabile arterielle Hypertonie, frühzeitige progressive Herzhypertrophie und, in späteren Stadien, interstitielle Fibrose (Lopez et al., 1997; Kuhn et al., 2002); 2. bereits in jungen Tieren Relaxationsstörungen mit Verlängerung der Diastole; in alten Tieren auch systolische Dysfunktion (Kuhn et al., 2002); 3. verlängerte Aktionspotentiale und erhöhte Tendenz zu polymorphen ventrikulären Arrhythmien (Kirchhof

et al., 2003), ein Befund, der vermuten lässt, dass ein plötzlicher Herztod, ausgelöst durch das Auftreten von Rhythmusstörungen, teilweise für den spontanen Tod der GC-A $-/-$ Tiere verantwortlich sein könnte.

Ein wesentlicher Nachteil des Modells der GC-A $-/-$ Maus ist, dass in diesem Modell einer "globalen" Gen-Deletion nicht unterschieden werden kann, ob diese funktionellen und molekularen kardialen Veränderungen in direktem Zusammenhang stehen mit der Aufhebung lokaler kardialer ANP-Effekte oder indirekt bzw. "unspezifisch" durch die chronische arterielle Hypertonie der Tiere provoziert werden. Um dies zu untersuchen, wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Kuhn ein Maus-Modell mit konditioneller zellspezifischer Deletion der GC-A in Kardiomyozyten (CM) etabliert (LoxP / Cre-System; CM GC-A KO Mäuse). Dieses Maus-Modell hat den wichtigen Vorteil, dass die systemischen hypotensiven Effekte von ANP völlig erhalten bleiben und die Tiere entsprechend keine arterielle Hypertonie haben (Holtwick et al., 2003). Interessanterweise belegen histologische morphometrische Untersuchungen, dass die arterielle Normotonie der CM GC-A KO Mäuse mit einer milden aber signifikanten Herzhypertrophie einhergeht, die aber viel weniger ausgeprägt ist als in den hypertensiven GC-A $-/-$ Mäusen (Kuhn et al., 2002 vs Holtwick et al., 2003). Damit ist es erstmals gelungen, die lokalen wachstumshemmenden Effekte von ANP *in vivo* im Gesamtorganismus darzustellen. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde nun dieses neue Mausmodell genutzt, um die lokalen, autokrinen/parakrinen Effekte des ANP/GC-A-Systems auf das Wachstum der Kardiomyozyten, deren intrazelluläre Calcium-Homöostase und auf die Expression und Aktivität Calcium-regulierender Proteine zu untersuchen. Insbesondere wurde untersucht, wie das ANP/GC-A-System die pathologischen herzhypertrophierenden Effekte von Stresshormonen (Angiotensin II, Katecholamine wie Isoproterenol) beeinflusst und weiterhin, welche "Postrezeptor-Signalwege" die kardialen Effekte des ANP/GC-A/cGMP-Systems vermitteln. Hier konzentrierte sich diese Dissertationsarbeit auf die funktionelle Bedeutung der cGMP-stimulierten Protein Kinase I (cGKI) im Herzen. Für diese Fragestellung wurden Untersuchungen *ex vivo/in vivo* an einem neuen genetischen Mausmodell mit konditionaler Deletion der cGKI in Kardiomyozyten geplant.

2. Ziele der vorliegenden Dissertationsarbeit

Die beiden "Herzhormone" atriales (ANP) und B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) und ihr gemeinsamer Guanylyl Cyklase-A (GC-A)-Rezeptor haben wichtige endokrine Funktionen zur Regulation des arteriellen Blutdrucks und Blutvolumens. Der cGMP-bildende GC-A-Rezeptor wird auch im Herzen auf Kardiomyozyten und benachbarten Fibroblasten exprimiert und vermittelt *in vitro* wachstumsmodulierende Effekte. Tatsächlich zeigten Beobachtungen an Mäusen mit konditionaler, Kardiomyozyten-spezifischer Deletion der GC-A, dass ANP und BNP neben den endokrinen, auch lokale, parakrine Effekte ausüben, welche der Entwicklung von Herzhypertrophie und Fibrose nach neuroendokriner (Angiotensin II) oder hämodynamischer Belastung entgegenwirken.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden die intrazellulären Signalkaskaden charakterisiert, welche dem GC-A-Rezeptor im Herzen nachgeschaltet sind und die lokalen, antihypertrophen Effekte von ANP und BNP vermitteln. Basis dieses Projekts waren zwei monogenetische Maus-Modelle mit konditioneller, zellspezifischer Inaktivierung der GC-A oder der nachgeschalteten GC-A/cGMP-stimulierten Protein Kinase I (cGKI) in Kardiomyozyten.

Bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz im Menschen ist die kardiale Bildung der beiden natriuretischen Peptide ANP und BNP stark erhöht, die endokrinen und lokalen Effekte der Peptide sind aber aufgrund einer Desensibilisierung des Rezeptors (mit verminderter cGMP-Bildung bzw. verringerter cGMP-Aktivierung der cGKI) deutlich abgeschwächt. Die vorliegende Dissertationsarbeit sollte daher weiterhin die Bedeutung einer Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors oder einer Hemmung der cGKI für die kardialen Effekte von ANP untersuchen.

Im Einzelnen wurden die folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Charakterisierung der lokalen, kardialen antihypertrophen Effekte des ANP/GC-A-Signalwegs. Hier wurde insbesondere der Einfluss dieses Herzhormons auf Calcium- und Herzwachstum-stimulierende Effekte von Angiotensin II und Katecholaminen verglichen.
2. Bedeutung der cGMP-anhängigen Protein Kinase I (cGKI) als distaler Mediator der Effekte von ANP/GC-A im Herzen. Hierzu wurde der kardiale Phänotyp eines neuen genetischen Mausmodells mit konditionaler, herzspezifischer Deletion der cGKI untersucht.
3. Einfluss einer Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors oder einer Hemmung des cGMP/cGKI-Signalwegs auf die kardialen Effekte von ANP.

3. Materialien und Methoden

3.1 Genetische Mausmodelle

Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden an zwei genetischen Mausmodellen durchgeführt: 1) Mäuse mit konditionaler, zellspezifischer Deletion (KO) des Guanylyl Cyclase A (GC-A)-Rezeptors in Kardiomyozyten (CM) (CM GC-A KO Mäuse); und 2) Mäuse mit konditionaler, zellspezifischer Deletion der cGMP-abhängigen Protein Kinase I (cGKI) in Kardiomyozyten (CM cGKI KO Mäuse). Innerhalb jedes Experiments wurden entsprechende Kontrolltiere zu den jeweiligen KO Tieren benutzt. Die Mäuse waren beiderlei Geschlechts und im Alter zwischen 3 - 5 Monaten.

Die Generierung dieser transgenen Mauslinien durch andere Wissenschaftler wurde detailliert beschrieben (Holtwick et al., 2003; Klaiber et al., 2011) und soll hier daher nur kurz skizziert werden. Für beide Linien wurde die *lox-P/Cre* Strategie der zellspezifischen Gen-Rekombination verwendet. Dazu wurden zunächst sogenannte *Lox-P* Sequenzen in die murinen Gene für GC-A (Holtwick et al., 2003) und cGKI (Wegener et al., 2002) mittels homologer Rekombination inseriert. Für die vorliegende Dissertationsarbeit wurden diese „floxed GC-A“ und „floxed cGKI“ Mäuse mit transgenen Mäusen gekreuzt, welche unter der Kontrolle des α MHC-Promoters das Enzym Cre-Rekombinase in Kardiomyozyten exprimieren. Die Cre-Rekombinase erkennt die *lox-P*-Sequenzen und führt zu deren Rekombination. Dadurch kommt es zu einer Deletion der dazwischen liegenden Sequenzen des *floxed GC-A* bzw. des *floxed cGKI* Gens. Letztlich kommt es zu einer Inaktivierung dieser Gene in den Kardiomyozyten. Die Gen-Translation/Transkription in allen anderen Zellen bleibt erhalten.

3.1.1 Tierhaltung

Die Tiere waren während der gesamten Studiendauer im Tierstall des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg untergebracht. Die Tierhaltung erfolgte bei einer Temperatur von 22 - 26°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden, wobei die Lichtphase von 06:00 bis 18:00 Uhr andauerte. Die Tiere hatten ständig freien Zugang zu Wasser und Futter.

3.1.2 Genotypisierungen

In allen nachfolgend vorgestellten Untersuchungen wurden gefloxed Kontrollmäuse (GC-A^{flox/flox}; cGKI^{flox/flox}) und deren Geschwistertiere mit Kardiomyozyten-spezifischer Deletion der

GC-A (GC-A^{flx/flx}; α MHC-Cre: CM GC-A KO) oder der cGKI (cGKI^{flx/flx}; α MHC-Cre: CM cGKI KO) benutzt. Entsprechend dem Zuchtschema waren die Tiere immer homozygot für das gefloxe Zielgen (GC-A^{flx/flx}; cGKI^{flx/flx}). Zur Identifikation der Gen-knockout Tiere reichte also die Detektion des α MHC-Cre-Transgens.

3.1.2.1 DNA Extraktion

Um das α MHC-Cre-Transgen zu detektieren wurde an genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) eine konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR, engl.: polymerase chain reaction) mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Für die Extraktion der genomischen DNA wurde ein kleines Stück Schwanzspitze der Maus unter Zugabe von 700 μ l TE/SDS (tris-EDTA-Puffer + SDS, engl.: Sodiumdodecylsulfate) und 25 μ l Proteinase K (Stammlösung: 10 mg/ml) über 12 Stunden in einem Thermomixer bei 55°C inkubiert. Nach Durchmischen mit 700 μ l Phenol und anschließender Zentrifugation (1000 g, 3 min) wurde die obere Phase abgenommen und mit 350 μ l Phenol und 350 μ l Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1, Vol/Vol) versetzt. Nach Zentrifugation (1000 g, 2 min) und Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml-Gefäß erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 70 μ l Natriumacetat-Puffer (3 M, pH 6,0) und 700 μ l 100%igem Ethanol. Nach der Präzipitation erfolgte die Sedimentation der DNA durch Zentrifugation (1000 g, 20 min). Das Ethanol wurde vorsichtig dekantiert und das DNA-Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol (Vol/Vol) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1000 g, 2 min) wurde das Ethanol dekantiert und die gefällte DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dieses Prozedere wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde das DNA-Sediment in 50 μ l DNase freiem Wasser aufgenommen und zur Resuspension der DNA 30 min bei 37°C im Thermomixer geschüttelt.

3.1.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methodik der PCR erlaubt den Nachweis spezifischer Gensequenzen innerhalb der genomischen DNA. Die PCR-Reaktionen zur Detektion des α MHC-Transgens wurden in einem Thermocycler mit Hilfe der *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase durchgeführt. Folgende Programme und Oligonukleotidsequenzen wurden verwendet.

Oligonukleotidsequenzen: Cre 800: 5'- GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG -3'
 Cre 1200: 5'- GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC-3'

Erwartete Fragmentgröße: Cre 800 + Cre1200 = 400 bp

PCR-Programm:

94°C, 2 min: Denaturierung

35 Zyklen

94°C, 30 sec: Denaturierung

63°C, 30 sec: Annealing

72°C, 60 sec: Extension

Abschließend 72°C, 3 min: Extension

3.2 Untersuchungen an isolierten murinen adulten Kardiomyozyten

Ziel dieser Untersuchungen war die Charakterisierung der Effekte von ANP auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase und die Kontraktilität isolierter Myozyten sowie der beteiligten intrazellulären Signalwege. Die nachfolgend geschilderten Methoden zur Messung von Ca^{2+}_i -Transienten und Kontraktilität einzelner isolierter Kardiomyozyten wurde in den drei publizierten Studien angewendet. In Studie 1 (Klaiber et al., 2010) wurde untersucht, ob und wie ANP die stimulierenden Effekte von Angiotensin II (Ang II) und Isoproterenol (ISO) auf die Ca^{2+}_i -Homöostase und Kontraktion der Myozyten beeinflusst. Diese Untersuchungen wurden an Myozyten aus CM GC-A KO und respektiven Kontrolltieren durchgeführt. In Studie 2 (Klaiber*, Frantz*, Baba* et al., 2011) wurden die Effekte von ANP und C-Typ natriuretischem Peptid (CNP) verglichen und die funktionelle Bedeutung der cGMP-abhängigen Protein Kinase I (cGKI) charakterisiert. Diese Untersuchungen wurden an Kardiomyozyten aus CM cGKI KO und respektiven Kontrolltieren durchgeführt. In Studie 3 (Klaiber*, Dankworth* et al., 2011) wurde untersucht, wie sich eine Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors auf die Calcium-regulierenden Effekte von ANP auswirkt. Die Zugabe der Substanzen (ANP, CNP, ISO, Ang II und selektive Inhibitoren zur Charakterisierung spezifischer intrazellulärer Signalwege) erfolgte durch Superfusion.

3.2.1 Isolierung der Myozyten

16 - 20 Wochen alten und 25 - 30 g schweren Mäusen wurden 30 min vor der Preparation 50 IE/g Körpergewicht Heparin (Heparin-Natrium-25000®, Ratiopharm) intraperitoneal injiziert. Hierdurch wurde die Blutgerinnung während der Präparation verhindert. Die Tiere wurden durch die intraperitoneale Gabe von 3,33 mg/g Körpergewicht Urethan (Urethan 99 %, Sigma) gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung narkotisiert. Das Herz wurde rasch entnommen und durch eine in die Aorta eingeführte, modifizierte Kanüle für 5 min mit Ca^{2+} -freier Perfusionslösung (siehe Tab. 1) bei 37°C mit 2,5 ml/min retrograd perfundiert. Danach wurde das Herz 8 min mit Verdauungslösung (siehe Tab. 1) perfundiert, wobei das Herz sich milchglasartig verfärbt und etwas auftreibt. Durch Schnitt auf Vorhofebene wurden die Vorhöfe von den Ventrikeln getrennt. Der Ventrikel wurde in 2,5 ml Verdauungslösung zuerst für

30 sec grob mit einer Schere zerkleinert, und anschließend wurden die Herzstücke für 30 sec mit einer Tuberkulinspritze dispergiert. Dann wurden 2,5 ml Stop I-Lösung (siehe Tab. 1) zugegeben und weitere 3 min dispergiert und anschließend durch Nylongaze in ein 50 ml Falconröhrchen filtriert. Die Zellen ließ man für 10 min sedimentieren bis sich ein Pellet gebildet hat und Überstand wurde abgenommen. Zum Zellpellet wurde 10 ml Stop II-Lösung (siehe Tab. 1) gegeben und anschließend die Ca^{2+} -Konzentration der Lösung schrittweise erhöht. Zwischen den CaCl_2 -Zugaben ließ man die Zellen jeweils 4 min adaptieren. Die finalen Ca^{2+} -Konzentrationen der einzelnen Schritte betragen 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM . Schließlich ließ man die Zellen 30 min für die Calcium-Messungen absetzen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Isolierung der Kardiomyozyten

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -freie Perfusionslösung	113 mM NaCl 4,7 mM KCl 0,6 mM KH ₂ PO ₄ 0,6 mM Na ₂ HPO ₄ 1,2 mM MgSO ₄ 12 mM NaHCO ₃ 10 mM KHCO ₃ 10 mM HEPES 30 mM Taurin
Verdaulösung	Ca ²⁺ -freie Perfusionslösung 0,25 mg/ml Liberase 0,14 mg/ml Trypsin 12,5 μM CaCl ₂
Stop I	Ca ²⁺ -freie Perfusionslösung 10 % Bovines Kälberserum 12,5 μM CaCl ₂
Stop II	Ca ²⁺ -freie Perfusionslösung 5 % Bovines Kälberserum 12,5 μM CaCl ₂

3.2.2 Fluorometrische Messungen der intrazellulären Calcium-Transienten

Prinzip der Messmethode: Die Konzentration der im Intrazellulärraum befindlichen freien Ca^{2+} -Ionen kann mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Indo-1/AM (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA) bestimmt werden. Vom dem hier verwendeten lipophilen und daher membranpermeablen Indo-1/AM werden nach Eintritt in die Zelle die Esthergruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten. Dadurch wird der Farbstoff in seine Ca^{2+} -sensitive, Membranimpermeable Form überführt. Der Farbstoff wird durch eine Xenon-Lampe mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und die anteilige Emission des vom Indikator ausgesandten Lichts längerer Wellenlänge bei 405 nm und 495 nm durch zwei Photomultiplier registriert (PTI, Princeton, USA). Indo-1 besitzt die Eigenschaft, sein Emissionsmaximum nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen von 495 nm nach 405 nm zu verschieben (siehe Abb. 1). Deshalb kann aus dem Quotienten der Emission bei 405/495 nm die relative intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration abgeleitet werden. Alle Experimente werden bei 25°C durchgeführt, um einen Verlust von Indo-1 aus dem Intrazellulärraum, der bei höheren Temperaturen leicht auftritt, während der Messungen zu vermeiden (Di Virgilio et al., 1988; Gomez et al., 1996; Kirchhefer et al., 2007).

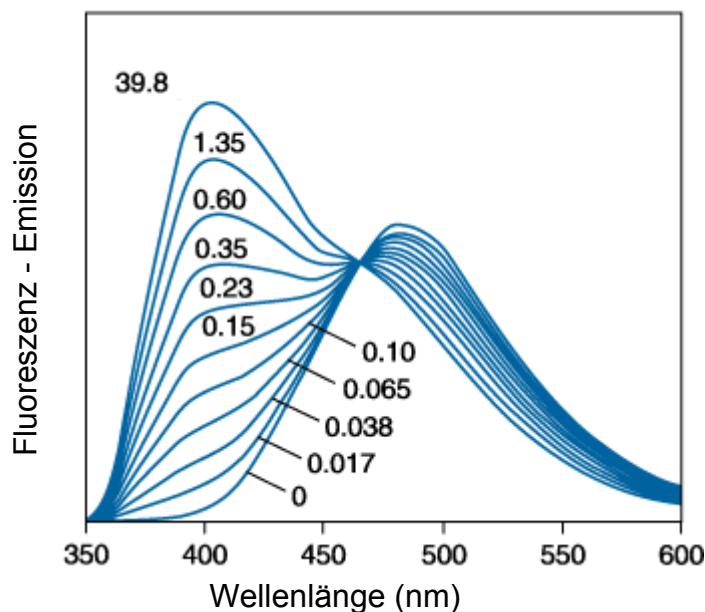


Abb. 1: Fluoreszenzspektrum von Indo-1 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen. Dargestellt ist die Verschiebung des Fluoreszenz-Emissions-Maximums von Indo-1 durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen an das Farbstoffmolekül. Bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm wird das Maximum der Fluoreszenz-Emission von 495 nm (Ca^{2+} -freie Form) auf 405 nm (Ca^{2+} -gebundene Form) verschoben, was eine ratiometrische Ca^{2+} -Messung ermöglicht. Die Zahlen an den Kurven geben die Konzentration an freien Ca^{2+} in μM an (Molecular Probes Product Information 2005).

Konkrete experimentelle Vorgehensweise: Isolierte Maus-Ventrikel-Kardiomyozyten wurden in der Perfusionskammer eines inversen Mikroskops (IX 71, Olympus, Tokio, Japan) für 10 min im Messpuffer (siehe Tab. 2) mit 25 μM Indo-1/AM und 5 % Pluronic F-127 (Molecular Probes, Eugene, USA) bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Messpuffer für 10 min superfundiert (0,5 ml/min), um überschüssigen Farbstoff aus dem Perfusionsbad zu entfernen. Die Zellen wurden durch Platin-Elektroden mit einer Frequenz von 0,5 Hz und einer Spannung von 16 V in einem elektrischen Feld stimuliert. Das Ca^{2+} -Signal der einzelnen Zellen, welches im Folgenden als Ca^{2+} -Transient bezeichnet wird, wurde ratiometrisch gemessen. Die Messdaten wurden mit einem handelsüblichen Computersystem erfasst und ausgewertet (siehe Abb. 2).

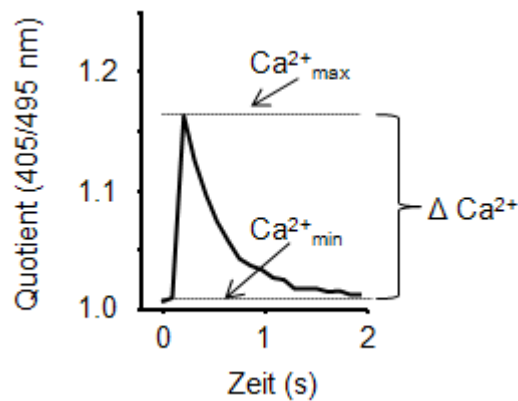


Abb. 2: Graphische Darstellung eines einzelnen Ca^{2+} -Transients. Einzelner Ca^{2+} -Transient, gemessen in einer isolierten Kardiomyozyte der Maus, welche mit einer Spannung von 16 V und einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert wurde. Bei den Transienten wurde jeweils die diastolische ($\text{Ca}^{2+}_{\text{min}}$) und systolische ($\text{Ca}^{2+}_{\text{max}}$) Ca^{2+} -Konzentration, sowie die Amplitude des Ca^{2+} -Signals (ΔCa^{2+}) ermittelt. Die relative Ca^{2+} -Konzentration ist als Quotient der gemessenen Wellenlängen 405/495 nm dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Lösungen für die Ca^{2+} - Messung

Lösungen	Zusammensetzung
Messpuffer 5x	140 mM NaCl 5,8 mM KCl 0,5 mM KH_2PO_4 0,4 mM Na_2HPO_4 0,9 mM MgSO_4 10 mM HEPES
Messpuffer 1x	11,1 mM Glucose 1 mM CaCl_2 7,3 pH

3.2.3 Aufzeichnung der Kontraktionen einzelner Myozyten

Die Kontraktion der Zellen wurde mit einem Video-Edge-Detection-System (Crescent Electronics, South East, Utah, USA) durchgeführt. Das System bestand aus einer CCD-Kamera, einem Video-Edge-Detektor, der Kontrastunterschiede registrierte und einem Monitor, auf dem die untersuchte Zelle dargestellt wurde. Der Video-Edge-Detektor erzeugte zwei Messpunkte, die auf einer Zelle des Monitorbildes eingeblendet wurden und die es ermöglichten, den starken Hell/Dunkel-Kontrastunterschied am rechten bzw. linken Rand der Kardiomyozyte zu erfassen. Bei Kontraktion der Zelle wanderten die Messpunkte mit dem Zellenrand, und die horizontale Verschiebung der Messpunkt-Position auf der Monitorzelle wurde als Spannungssignal registriert. Nach vorheriger Kalibrierung des Systems mit einem Mikrometermaßstab konnten die erfassten Spannungswerte in Mikrometer Zelllänge umgerechnet werden (Abb. 3). Durch den Einsatz eines geeigneten Bandpass-Filters war es möglich, die Kontraktion und die Ca^{2+} -Messung simultan an der gleichen Zelle durchzuführen, ohne die im UV-Bereich stattfindende Ca^{2+} -Transientenmessung durch die Mikroskopierbeleuchtung zu beeinträchtigen. Die gemessenen Kontraktionen wurden erfasst und ausgewertet. Die prozentualen Veränderungen der diastolischen Zelllängen wurden berechnet (% Verkürzung).

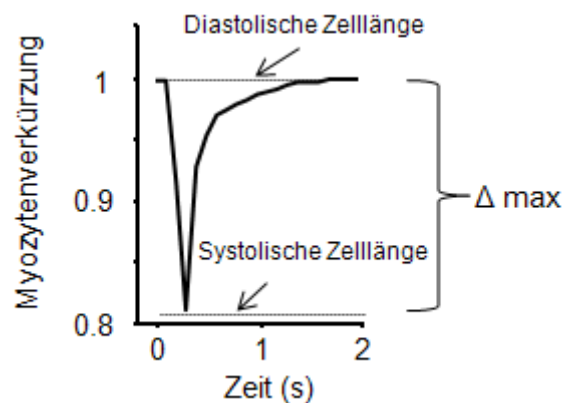


Abb. 3: Graphische Darstellung einer Zell-Einzelkontraktion. Einzelkontraktion einer Kardiomyozyte der Maus, die mit einer Spannung von 16 V und einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert wurde. Bei der Kontraktion wurde die maximale Zellverkürzung (Δ_{\max}) erfasst.

3.3 Tierexperimentelle Untersuchungen

Ziel dieser Studien war die Charakterisierung der kardialen Effekte und intrazellulären Signalwege von ANP *in vivo*. Hierzu wurden CM GC-A KO Mäuse (Studie 1: Klaiber et al., 2010), CM cGKI KO Mäuse (Studie 2: Frantz, Klaiber, Baba et al., 2011) und respektive Kontrolltiere chronisch mit Angiotensin II oder Isoproterenol behandelt. Die Substanzen wurden mittels osmotischen Minipumpen subkutan appliziert (über 14 bzw. 7 Tage). Der arterielle Blutdruck wurde mittels „tail cuff“ Plethysmographie vor und während der Substanzapplikation gemessen. Herzmorphologie und Herzfunktion wurden mittels Echokardiographie (AG Prof. S. Frantz, Abteilung für Kardiologie des Universitätsklinikums Würzburg) und invasiver Hämodynamik (AG Prof. K. Schuh, Institut für Physiologie der Universität Würzburg) beurteilt. Abschließend wurden nach Nekropsie die Herzgewichte (und Herz-zu-Körpergewichtsverhältnisse) bestimmt und die Herzen histologisch/morphometrisch analysiert. Mittels Western Blot-Analysen wurde letztlich die kardiale Expression und Phosphorylierung relevanter Zielproteine bestimmt.

Diese Versuche wurden von der Regierung von Unterfranken nach dem Tierschutzgesetz genehmigt (AZ: 55.2-2531.01-72/09).

3.3.1 Implantation von osmotischen Minipumpen

Es wurden osmotische Minipumpen für Kleintiere (siehe Abbildung 4) mit einem Füllvolumen von 200 μl und einer Lebensdauer von 14 Tagen (Studie mit Angiotensin II; Alzet Pumpen, Modell 2002, Charles River, Sulzfeld) bzw. 7 Tagen (Studie mit Isoproterenol) verwendet.

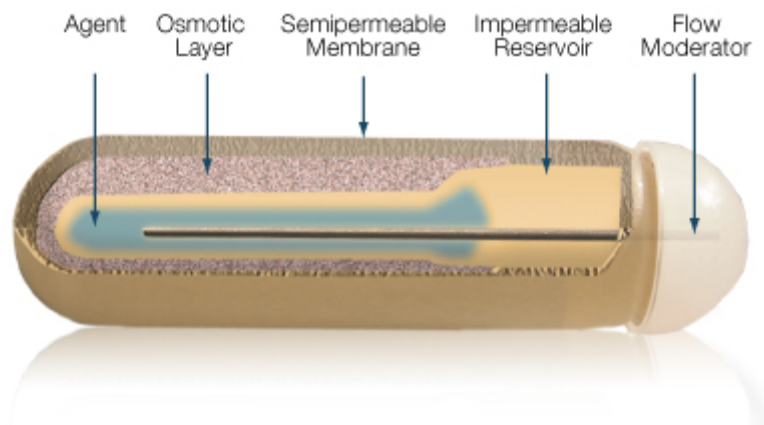


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Alzet-Minipumpe für Kleintiere, Modell 2002

Zuerst wurde eine „Aktivierungslösung“ (0,01 M Essigsäure in 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung) für die Pumpen angesetzt und autoklaviert. In dieser Lösung wurde auch die vorher berechnete Menge an Angiotensin II oder Isoproterenol (unter der Sterilbank) gelöst. Die Berechnung der Mengen ist dabei zum einen abhängig vom Abgabevolumen der Minipumpen und zum anderen vom individuellen Körpergewicht der Mäuse. Dazu mussten die Tiere vorher gewogen werden. Als Dosierungen wurden in diesen Studien eine Angiotensin II-Dosis von 1 µg/kg KG/min (Gabe über 14 Tage) und eine Isoproterenol-Dosis von 40 mg/kg KG/Tag (Gabe über 7 Tage) gewählt.

3.3.1.1 Befüllung der Pumpen mit Angiotensin II oder Isoproterenol

Zunächst wurden die Pumpen im leeren Zustand gewogen, um die Füllmenge anhand des Gewichts genau bestimmen zu können. Danach wurde die Lösung mithilfe des mitgelieferten Adapters in die Pumpen eingefüllt und der Pumpenkörper mittels der Verschlusskappe verschlossen und erneut gewogen. Für den Einsatz von Vehikel-Lösung (Pumpen ohne Hormon) wurden die Pumpen nur mit 0,01 M Essigsäurelösung befüllt. Jede befüllte Pumpe wurde dann einem Versuchstier zugeordnet, und über Nacht in einem 50 ml Falcongefäß mit 0,9 % NaCl-Lösung bei 37°C gelagert. Dadurch drang die NaCl-Lösung osmotisch durch die äußere Pumpenmembran und drückte die innenliegende Lösung nach außen. Die so gestarteten Pumpen setzten am nächsten Tag somit die vorherberechnete Menge Hormon frei.

3.3.1.2 Chirurgische Implantation der osmotischen Pumpen

Dieser chirurgische Eingriff wurde von Frau Katharina Völker (technische Assistentin am Institut für Physiologie) durchgeführt. Zur subkutanen Implantation der Pumpen wurden die Mäuse zunächst mit 2 % Isofluran betäubt. Das hat den Vorteil einer kurzen, effektiven Narkose. Die betäubte Maus lag mit dem Bauch auf dem Wärmetisch (37°C) und wurde mit dem Kurzhaartrimmer und Enthaarungscreme am Beckengürtel enthaart. Das enthaarte Gebiet wurde kurz mit 70 % Ethanol gereinigt und abgetupft. Hiernach wurde vorsichtig ein Schnitt medial über die Hüfte durchgeführt. Dieser sollte nur die Hautschicht durchdringen. Dann wurde mit dem Nadelhalter ein Kanal unter der Haut eröffnet. In diesen Kanal wurde nun die Minipumpe subkutan eingesetzt. Notwendig war darauf zu achten, den Kanal möglichst zentral zur Wirbelsäule zu setzen, damit die Pumpe später nicht seitlich verrutscht. Die offene Wunde wurde nun mit einem Prolenefaden (Fadenstärke: USP 6) und 2 - 3 Stichen genäht. Nach Abschluss der Operation wurde das Tier in ein Tuch gehüllt und konnte in einem Einzelkäfig unter einer Wärmelampe aufwachen. Bei der Wundkontrolle am nächsten Tag wurde die Wunde, falls nötig, mit Bepanthen-Creme versorgt. Wichtig war darüber hinaus die tägliche Kontrolle der Tiere und der Sitz der Pumpe.

3.3.2 Plethysmographische Messungen des arteriellen Blutdrucks

Die plethysmographische Messung des Blutdruckes erfolgte an der Schwanzarterie. Die Messungen wurden an wachen Mäusen an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils zwischen acht und zwölf Uhr durchgeführt. Die Blutdruckmessungen fanden vor und während der Behandlung mit Angiotensin II, Isoproterenol oder Vehikel statt. Zuvor erfolgte jeweils eine einwöchige Gewöhnungsphase der Mäuse an den Versuchsablauf bzw. die Blutdruckmessung. Die Messungen erfolgten mit dem „Softron Indirect Blood Pressure Meter BP-98 A“ (Firma Softron, Tokio, Japan). Der Versuchsaufbau ist in Abb. 5 skizziert.

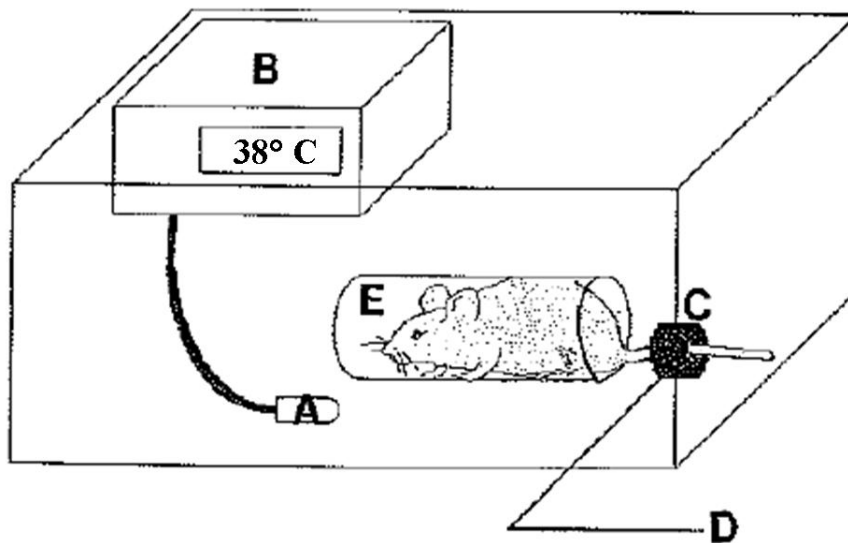


Abb. 5: Versuchsaufbau zur indirekten Blutdruckmessung (Kuwahara et al., 1991). A: Temperatursensor. B: Heizelement. C: Schwanzmanschette. D: Verbindung zu Verstärker und Computer. E: Stofftasche. Im Versuchsaufbau dieser Dissertationsarbeit war der Temperatursensor in eine Kunststoffröhre integriert, in der sich die Maus in der Stofftasche befindet. Die Kunststoffröhre ist hier nicht abgebildet, da sie die Maus komplett verdeckt.

Die wache Maus wurde in einer Stofftasche in eine auf 37°C vorgewärmte Kunststoffröhre gesetzt. Die Wärme fördert eine bessere Durchblutung in den distalen Extremitäten. Nach einer Gewöhnungsphase von 2 min wurde der Maus eine Blutdruckmanschette um den Schwanz gelegt und innerhalb von 10 min wurden jeweils 10 Blutdruckmessungen vorgenommen. Die Manschette pumpte sich auf manuellen Befehl hin auf 180 mm Hg auf und unterband somit den Blutfluss. Der Druck in der Manschette nahm kontinuierlich ab, so dass analog zur Methode von Riva-Rocci der systolische und diastolische Blutdruck mittels einer in der Manschette befindlichen Licht-emittierenden Diode und einer Photodiode gemessen werden konnte (Kuwahara et al., 1991).

3.3.3 Nekropsie

Nach Abschluss des jeweiligen Behandlungsintervalls (Angiotensin II über 2 Wochen, Isoproterenol über 7 Tage, Vehikel über 14 bzw. 7 Tage) erfolgte im Anschluss an die plethysmographischen Blutdruckmessungen in den jeweiligen Studien in allen Kollektiven eine Nekropsie mit Organentnahme. Zu Beginn wurde das Körpergewicht (KGW) des Tieres bestimmt. Danach wurde eine Inhalationsnarkose mittels Einleitung von zweiprozentigem Isofluran in eine Kunststoffkammer begonnen. Eine Incisur distal des Processus Xiphoideus eröffnete die Haut und wurde beidseits nach lateral entlang des Rippenbogens vergrößert. Nach Eröffnung des Zwerchfells wurde das Herz durch Durchtrennung von V. cava superior und Aorta zügig exstirpiert und in Krebs-Henseleit-Lösung überführt. Die nachfolgenden Präparationen erfolgten in dieser Lösung unter ständiger Carbogen-Begasung auf Eis.

Das Gesamt-Herzgewicht (HG) sowie die Gewichte von linkem (LV) und rechtem Ventrikel (RV) wurden nach vorausgegangener Präparation auf der Feinwaage (Sartorius Instruments) bestimmt. Gewebeproben von LV und RV wurden für histologische und morphometrische Analysen in 4%igem Formalin fixiert. Der Rest des Herzgewebes wurde bei -80°C gelagert und später für Western Blot-Analysen relevanter Zielproteine genutzt. Zuletzt wurde die linke Tibia der Maus von dorsal präpariert. Dazu wurde im Kniegelenk unterhalb der Patella ein exartikulierender Schnitt mittels Skalpell durchgeführt und das obere Sprunggelenk am Ansatz der Tibia exartikuliert. Nachfolgende Längenmessung der Tibia diente der Abschätzung des Wachstums und Entwicklungsstandes der Tiere. Die Normalisierung von HG, LVG und RVG auf die Tibialänge lieferte somit besser vergleichbare Daten als eine Normalisierung dieser Daten auf das KGW. Ein alleiniger Bezug dieser Parameter auf das KGW könnte in unserer Studie die Ergebnisse verfälschen, da die Funktionalität des Herz-Kreislauf-Systems auch Einfluss nimmt auf das Körpergewicht der Tiere, so dass dieses bei einer Herzinsuffizienz mit generalisierten kardialen Ödemen zunehmen würde. Eine Dekompensation der Herzinsuffizienz als Folge der hämodynamischen und/oder humoralen Belastung durch Angiotensin II oder Isoproterenol könnte zu Körpergewichtsschwankungen führen. Daher wurden in den Studien die gewichtsabhängigen Parameter alle sowohl auf das KGW als auch auf die Tibialänge bezogen.

3.3.4 Histologische und morphometrische Analysen

Die histologische Analyse von Kardiomyozytendurchmesser und Kollagenfasergehalt lieferte das zellmorphologische Korrelat der bei Nekropsie und Organentnahme beobachteten möglichen Differenzen der Herzgewichte zwischen den Gruppen. Die in Formalin fixierten Herzproben wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hideo A. Baba

am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen in Essen in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt. Die Schnitte wurden mit Picro-Siriusrot zur Bestimmung des Kollagenfasergehalts, mit der Perjodsäure-Schiff-Methode (PAS) zur Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers gefärbt (Holtwick et al., 2003).

3.3.4.1 Messung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers

Zur Messung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers im Rahmen der Dissertationsarbeit wurde die Cell M-Software (Olympus) verwendet. Hierzu wurden mithilfe eines Farbkameraaufsatzes mit dem Mikroskop (Olympus, BX 41) bei 20facher Vergrößerung Bilder von den PAS-gefärbten Schnitten gemacht. In dieser Färbung sind die lipidreiche Zellmembran und der Zellkern gut zu erkennen. Der Durchmesser von etwa 100 Kardiomyozyten pro linkem Ventrikel wurde auf Höhe des Zellkerns bestimmt (Holtwick et al., 2003).

3.3.4.2 Bestimmung des Kollagenfasergehalts in den linken Ventrikeln

Der Kollagenfasergehalt der linken Ventrikel wurde an den Picro-Siriusrot-gefärbten Präparaten bestimmt. Dabei wird zunächst ein zu vermessender Bereich bei 20facher Vergrößerung im Hellfeld ausgewählt, der frei von Gefäßen oder Randbereichen des Präparats ist. Anschließend wird das Gesichtsfeld unter einem Polarisationsfilter abglichtet, und mittels der KS 300 Software kann aus dem Kontrast beider aufgenommenen Bilder prozentual die Fläche der nun fluoreszierenden Kollagenfasern berechnet werden (Holtwick et al., 2003).

3.3.5 Western Blot-Analysen der Expression und Phosphorylierung kardialer Proteine

Die Western Blot-Methode wurde zur Detektion der Expression und Phosphorylierung relevanter Zielproteine des ANP/GC-A/cGMP-Signalwegs im Herzen angewendet. Die Calcium-Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) ist einer der zahlreichen Signalmediatoren, der Calcium-abhängig das Kardiomyozytenwachstum stimuliert (Maier 2009). Die autophosphorylierte Form (pCaMKII) ist ein Indikator der CaMKII Aktivität (Maier 2009). Des Weiteren wurde das Calcium-regulierende Protein des Sarkoplasmatischen Retikulums, Phospholamban (PLB) und seine phosphorylierte Form P-PLB_{Ser16} nachgewiesen. Dieses Protein ist an der Kontraktion und Relaxation der Herzmuskelzelle beteiligt. PLB wird sowohl von der cAMP-aktivierten Proteinkinase A als auch von der cGMP-aktivierten cGKI an der Aminosäure Ser-16 phosphoryliert (Simmernan & Jones 1998).

Weiterhin wurde die kardiale Expression der cGKI untersucht. Die Expression von CaMKII, PLB und cGKI wurde auf die Expression von GAPDH (als Referenzgen) normiert.

3.3.5.1 Homogenisierung des linksventrikulären Gewebes

Zur Homogenisierung wurde das Gewebe zunächst in einem in flüssigem Stickstoff auf -80°C gekühlten Zylinder gebrochen. Drei Spatelspitzen dieses Material wurden mit $200\ \mu\text{l}$ auf 4°C gekühlten Puffer (siehe Tab. 3) 90 sec im Mikro-Dismembrator pulverisiert. Im Mikro-Dismembrator gefriert der Puffer, da die Gefäße des Dismembrators zunächst auch auf -80°C gekühlt wurden. Das entstandene Pulver wurde in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt, in das $600\ \mu\text{l}$ Puffer vorgelegt wurden. Anschließend wurden Pulver und Puffer gut gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert, wobei das pulverisierte Gewebe darin gelöst wurde. Während dieser Inkubationszeit wurde das Homogenat alle 5 min durchgemischt. Nach Zentrifugation ($9.600\ \text{G}$, 3 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und mehrmals durch eine Spritzenkanüle geschert.

Die solubilisierten Proteine wurden nach erneutem Zentrifugieren aus dem Überstand gewonnen, aliquotiert und für das weitere Procedere bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Extraktionspuffers

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lysepuffer	3,2 mM NaHCO_3 12,5 % SDS

3.3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Gewebeextrakte

Der Proteingehalt dieses Lysats wurde mittels des Bichinchoninic Acid Assays (BCA, Uptima powered by Interchim, Montluçon, Frankreich) bestimmt. Diese Methode beruht auf einer Farbreaktion der zu bestimmenden Proteine mit dem BCA-Reagenz (BCA-Reagent A und 4 % Kupfersulfatlösung, im Verhältnis 50:1 gemischt). Die Farbreaktion liefert Absorptionsmaxima bei 562 nm, die im Photometer (Victor² Multi-Label Counter, Wallac) gemessen werden. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels einer Eichkurve berechnet, die für jede Proteinbestimmung mit definierten Konzentrationen Rinderserumalbumin (BSA) in Puffer erstellt wird.

3.3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Protein-Transfer

Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von dreifachem Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 4) für 10 min bei 72°C. Die Analyse von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher und denaturierender SDS-PAGE. Das Gelsystem bestand aus einem 5%igem (w/v Acrylamid/ N,N'Methylenbisacrylamid) Sammelgel und einem 8%igem (w/v Acrylamid/ N,N'Methylenbisacrylamid) Trenngel (Tabelle 4). Die Proben und ein Proteinmarker wurden aufgetragen und die Elektrophorese mit 50 V gestartet. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 200 V erhöht.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Lösungen für SDS-PAGE

Lösungen	Zusammensetzung
Trenngel (8 %)	27 % (v/v) Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 25 % (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 8.8) 0,1 % (w/v) SDS 0,06 % (v/v) TEMED 0,1 % (w/v) APS
Sammelgel (5 %)	16,5 % Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 12,5 % 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 0,1 % SDS 0,05 % TEMED 0,1 % APS
Laufpuffer	25 mM Trizma Base 0,2 % SDS 192 mM Glycin
3x Lämmli	200 mM Tris-HCl, pH 6,8 6 % SDS 30 % (v/v) Glycerol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

3.3.5.4 Immundetektion von Proteinen und Auswertung der immunreaktiven Signale

Um Proteine aus den jeweiligen Herzproben mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen, wurden die Proteine aus dem Gel mittels Semi-Dry-Methode auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde ein Sandwich aus zwei Whatman-Papieren, Nitrocellulosemembran, Gel und noch einmal zum Schluss zwei Whatman-Papieren aufgebaut und in die Blotkammer gelegt. Alle Bestandteile wurden gut in Transferpuffer getränkt (Tabelle 5) und vorhandene Luftblasen zwischen den Schichten entfernt. Die Blotkammer wurde geschlossen und die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² Gel und einer Laufzeit von 1 h elektrophoretisch auf die Membran übertragen.

Der Transfer wurde anschließend mit einer Ponceau-S-Färbung überprüft. Nach Entfärben der Membran in TBS-T wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer BSA- oder Milch-Lösung für mindestens 30 min geblockt (Tabelle 5). Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit Primärantikörper (Tabelle 6) bei 4°C über Nacht unter leichtem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T zum Entfernen ungebundener Primärantikörper erfolgte die Inkubation der Membran mit Sekundärantikörper für ca. 2 h bei RT unter leichtem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels Chemilumineszenz. Dabei wurde das Substrat ECL durch die Meerrettich-Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, umgesetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen für das Western Blot-Verfahren

Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	25 mM Trizma Base 20 % (v/v) Methanol 192 mM Glycin
Ponceau-S-Färbung	5 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Ponceau S
10x TBS	198 mM Trizma Base 946 mM NaCl pH 7.4
TBS-T	0,1 % Tween® 20 (v/v) in TBS
BSA-Lösung	5 % (w/v) BSA in TBS-T
Milch-Lösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

Tabelle 6: Primärantikörper

Zielprotein	Größe in kDa	Verdünnung des Antikörpers	Spezies	Firma
GAPDH	30 - 40	1:2000	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
pCaMKII	52	1:500	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
CaMKII	52	1:1000	Kaninchen	BD Transduction Laboratories
cGK I	76	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverley, MA
pPLB _{Ser16}	6	1:1000	Kaninchen	Badrilla, Leeds, UK
PLB	6	1:1000	Kaninchen	Badrilla, Leeds, UK

Die densitometrische Auswertung der immunreaktiven Proteinbanden erfolgte mit der ImageJ Software (National Institutes of Health). Hierfür wurden die Röntgenfilme mit einem herkömmlichen Scanner eingescannt und die Bandenschwärzung quantitativ nach Abzug des Hintergrunds berechnet.

3.4 Untersuchungen an HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen

Ziel dieser Versuche war die Darstellung einer möglichen Protein-Protein-Interaktion zwischen dem GC-A-Rezeptor und Kationen-Kanälen aus der Familie der *transient receptor potential canonical* (TRPC) Kanäle, TRPC3 und TRPC6 (siehe Studie 3; Klaiber, Dankworth et al., 2011).

3.4.1 Transfektion

Für diese Experimente wurde eine HEK293-Zelllinie benutzt, welche einen FLAG-tagged GC-A-Rezeptor stabil exprimiert. Diese Zelllinie wurde mir von Prof. Michael Chinkers (Department of Pharmacology, University of South Alabama, Mobile, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden für die transiente Koexpression von TRPC3 oder TRPC6 Proteinen benutzt. Die Plasmide für die heterologe Expression dieser Proteine wurden von Herrn Prof. V. Flockerzi (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes in Homburg) zur Verfügung gestellt.

Für die Transfektion wurden FLAG-GC-A exprimierende HEK293-Zellen in 10 cm-Schalen kultiviert, in DMEM-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS). Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen ca. 30 – 50 % konfluent. Das FuGene®-Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) wurde nach Angaben des Herstellers 15 min auf Raumtemperatur erwärmt und vor Gebrauch gut gemischt. In DMEM/minus wurden Plasmid-DNA und FuGene im Verhältnis 1:3 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) zugegeben und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 7). Währenddessen wurde das Medium von den Zellen gesaugt und 10 ml frisches DMEM mit 10 % FCS auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung auf die Zellen pipettiert. Zwei Tage nach der Transfektion konnten die Zellen lysiert oder für andere Versuche genutzt werden.

Tabelle 7: Transfektionsansatz für eine 10 cm-Zellkulturschale

Reagenz	Menge
DMEM/minus	90 μL
Plasmid-DNA	5 μg
FuGene® Transfektionsreagenz	15 μL

3.4.2 Extraktion der membranständigen Proteine

Die Zellmembran der HEK293-Zellen wurde von Zytosol- und Kernfraktion getrennt, um eine bessere Aufreinigung der membranständigen GC-A zu erzielen. Hierzu wurde das Medium von den Zellen gesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers (NanoTools, Teningen) mit 1 mL CF-Cyt-Puffer (Tabelle 8) pro 10 cm-Schale bei RT inkubiert und die Lyse unter dem Mikroskop beobachtet. Das Zelllysat wurde abgenommen und bei 1000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt die Zytosolfraktion und wurde abgenommen. Das Pellet wurde in 1 mL Lysepuffer (mit 1 % Triton X-100) pro Schale gelöst und die Suspension 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Anschließend folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 2000 g für 10 min bei 4°C, um Zelltrümmer und Zellkerne zu entfernen. Der Überstand enthielt nun die Zellmembranfraktion, mit welcher die Immunpräzipitation durchgeführt wurde. Zuletzt wurde das Pellet zur Kontrolle der Membranpräparation in PBS aufgenommen, um die Kernfraktion zu erhalten.

Von den einzelnen Schritten wurden jeweils Aliquots für eine Überprüfung der Methode mittels Westen Blot aufbewahrt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen der Membranpräparation

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
CF-Cyt-Puffer	käuflicher Puffer mit unbekannter Zusammensetzung der Firma NanoTools (Teningen) zur Extraktion der zytosolischen Fraktion Zugabe von: Protease-Inhibitoren Complete Mini® (Roche Applied Sciences), 1 Tablette/10 mL Phosphatase-Inhibitoren PhosStop® (Roche Applied Sciences), 1 Tablette/10 mL
Membran-Lysepuffer (mit 1 % Triton X-100)	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM Na ₂ EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton X-100 (v/v) 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM Na ₃ VO ₄ Protease-Inhibitoren Complete Mini® (Roche), 1 Tablette/10 mL Phosphatase-Inhibitoren PhosStop® (Roche), 1 Tablette/10 mL

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl pH 7,4

3.4.3 Immunpräzipitation des FLAG-tagged GC-A-Rezeptors

Für die Immunpräzipitation (IP) von FLAG-GC-A aus transfizierten HEK293-Zellen wurden für eine 10 cm-Zellkulturschale 50 µL Agarose-Suspension mit gebundenem anti-FLAG-Antikörper benutzt (M2-Agarose, Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Agarose wurde dreimal mit PBS gewaschen und danach jeweils bei 2000 g für 30 sec bei 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die Inkubation der Agarose in einer Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA; 10 mg/mL in PBS) für 15 min unter leichter Rotation. Danach wurde die Agarose wiederum zentrifugiert und zur Membranfraktion der FLAG-GC-A exprimierenden HEK293-Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit über Nacht bei 4°C unter leichter Rotation wurden die an die Agarose gebundenen Immunkomplexe auf Chromatographie Säulen (Micro Bio-Spin Chromatography Columns, Bio-Rad Laboratories) gegeben und dreimal mit Lysepuffer (mit 1 % Triton X-100, Tabelle 8) gewaschen. Die Elution erfolgte 5 min mit 95°C vorgewärmtem 3x Lämmli-Puffer. Das Eluat wurde mit 10000 g für 30 sec abzentrifugiert, in 30 µl aliquotiert und für Western Blot-Analysen genutzt. Von den einzelnen Schritten wurden jeweils Aliquots für eine Überprüfung der Methode mittels Western Blot aufbewahrt.

3.4.4 Western Blot-Analysen

Zur Detektion des immunpräzipitierten FLAG-tagged GC-A-Rezeptors und möglichem gebundenen TRPC3 oder TRPC6 Protein wurde die in Abschnitt 3.3.5.3 beschriebene Methodik der SDS-PAGE und des Protein-Transfers benutzt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 beschrieben.

Tabelle 9: Primärantikörper

Zielprotein	Größe in kDa	Verdünnung des Antikörpers	Spezies	Firma
FLAG	-	1:1000	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
GC-A	130	1:1000	Kaninchen	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
TRPC3	96	1:200	Kaninchen	Alomone Labs., Jerusalem, Israel
TRPC6	107	1:200	Kaninchen	Alomone Labs., Jerusalem, Israel

Die densitometrische Auswertung der immunreaktiven Proteinbanden erfolgte mit der ImageJ Software (National Institutes of Health). Hierfür wurden die Röntgenfilme mit einem herkömmlichen Scanner eingescannt und die Bandenschwärzung quantitativ nach Abzug des Hintergrunds berechnet.

3.5 Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel™ verwendet. Dabei wurden die Mittelwerte (MW), sowie Standardabweichungen (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) in Excel berechnet. Die Ergebnisse der Versuche an isolierten Kardiomyozyten wurden mittels T-Test (in Microsoft Excel™) evaluiert. Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden mittels *2-way ANOVA* (mit Genotypen und Behandlungen als „Kategorien“) und *multiple comparison Bonferroni test* evaluiert, um die Signifikanz möglicher Unterschiede zwischen den Gruppen zu testen. Dazu wurde das StatView statistics program (version 5.01, Abacus Concepts, Inc., Berkley, CA, USA) benutzt. Für alle Ergebnisse wurde ein P-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

4. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Projektteil A: Charakterisierung der lokalen, kardialen antihypertrophen Effekte des ANP/GC-A Signalwegs.

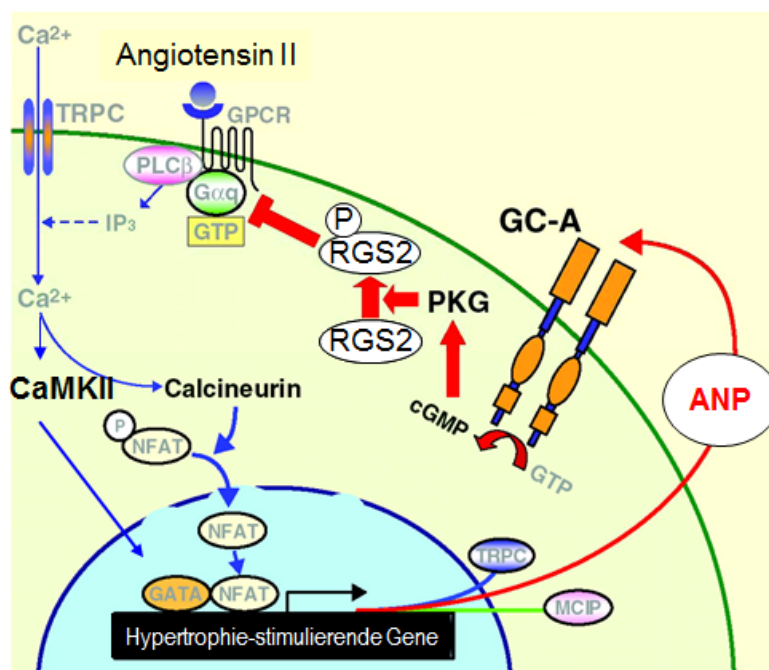
In diesem Projektteil charakterisierten wir mittels vergleichenden Analysen an Mäusen mit konditioneller, herzspezifischer Deletion der GC-A (CM GC-A KO; (Holtwick et al., 2003; Kilic et al., 2005 und 2007)) und Kontrolltieren die zellulären Mechanismen, welche bei Dysfunktion des ANP/GC-A-Systems die Entwicklung von Herzhypertrophie begünstigen. Wir untersuchten, ob/wie ANP die kardialen Effekte von β -adrenerger versus Ang II/AT₁ (G_s versus G_{α_q} -mediierter) Stimulation beeinflusst. Zunächst kombinierten wir an isolierten adulten murinen Kardiomyozyten elektrophysiologische Messungen der L-Typ Ca^{2+} Ströme (LTCS, mittels voltage-clamp Messungen in Kooperation mit Herrn Dr. M. Kruse und Herrn Prof. O. Pongs am Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg), fluorometrische Messungen der intrazellulären Calcium-Transienten (mittels Indo-1 AM) und Messungen der Kontraktilität (Zellverkürzung, mittels edge detection). Diese *ex vivo* Untersuchungen zeigten, dass Isoproterenol (ISO) und Ang II die LTCS, $[Ca^{2+}]_i$ und Kontraktilität isolierter adulter Myozyten stimulieren. Interessanterweise hemmt ANP/GC-A die Effekte von Ang II, nicht aber die Effekte von ISO. Um der Bedeutung dieser Interaktion zwischen ANP und Ang II für die Entwicklung einer pathologischen Herzhypertrophie nachzugehen, behandelten wir CM GC-A KO Mäuse und Kontrolltiere mit ISO oder Ang II (chronische Gabe über osmotische Minipumpen). Wir verglichen die Auswirkungen auf den arteriellen Blutdruck, das kardiale Remodelling und die Expression/Aktivität von Ca^{2+}_i -stimulierten Signalwegen der Herzhypertrophie (z. B. Calcium/Calmodulin Kinase II, CaMKII). Die Effekte von ISO (Normotonie) und Ang II (Hypertonie) auf den arteriellen Blutdruck waren in beiden Genotypen ähnlich. Beide neurohumorale Stressoren führten zu Herzhypertrophie, mit Aktivierung der CaMKII. Während die Effekte von ISO an CM GC-A KO Mäusen unverändert waren, führte Ang II hier zu einer wesentlich ausgeprägteren Herzypertrophie und kardialer Aktivierung der CaMKII. Wir schließen daraus, dass der ANP/GC-A/cGMP-Signalweg selektiv G_{α_q} -stimulierte Signalwege in Kardiomyozyten hemmen kann. Unsere weiteren biochemischen und pharmakologischen *in vitro* Experimente zeigten, dass ANP die cGMP-abhängige Protein Kinase I (cGKI) in Kardiomyozyten stimuliert und darüber die Expression/Aktivität des Regulator of G-Protein Signalling 2 (RGS2) Proteins, welches selektiv die Aktivität G_{α_q} -gekoppelter Rezeptoren hemmen kann (Tang et al., 2003). Weiterhin ist bekannt, dass cGKI die Kationen-Kanäle der TRPC-Familie (transient receptor potential canonical channels, TRPC3 und TRPC6) phosphoryliert und hemmt (Kwan et al., 2004). Untersuchungen an neonatalen Kardiomyozyten zeigten, dass die Aktivierung dieser Kanäle an den hypertrophierenden

Effekten von Ang II beteiligt ist (Onohara et al., 2006). Tatsächlich belegen unsere eigenen Experimente an adulten Myozyten, dass stimulierende Effekte von Ang II auf LTCS, $[Ca^{2+}]_i$ und Kontraktilität nach pharmakologischer (BTP-2) oder genetischer Hemmung (TRPC3/TRPC6^{-/-}) dieser Kanäle aufgehoben sind.

Zusammen mit publizierten Befunden an Mäusen mit globaler GC-A-Deletion (Kinoshita et al., 2010) zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit also, dass der lokale, kardiale antihypertrophe Effekt von ANP durch den GC-A/cGMP/cGKI-Signalweg und modulierende Phosphorylierungen von regulatorischen Membranproteinen (RGS2, TRPC3/C6) mediiert wird (siehe nachfolgende Abbildung). Da RGS2 und TRPC3/C6 keine Bedeutung für die β -adrenerge Signaltransduktion im Herzen haben, erklären diese Zusammenhänge sehr gut den Mechanismus der selektiven Hemmung kardialer Effekte von Ang II (und nicht ISO) durch ANP. Die Aufklärung dieser molekularen Vorgänge hat auch eine große klinisch-pharmakologische Relevanz, da derzeit in klinischen Studien (RELAX) die mögliche protektive Bedeutung von Sildenafil (Viagra^R) zur Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz geprüft wird (Kuhn 2009). Sildenafil, ein selektiver Hemmstoff der cGMP-degradierenden Phosphodiesterase 5 (PDE5), verstärkt möglicherweise die hier beschriebenen endokrinen und kardialen Effekte von ANP.

Zitat:

Klaiber M, Kruse M, Völker K, Schröter J, Feil R, Freichel M, Gerling A, Feil S, Dietrich A, Londoño JE, Baba HA, Abramowitz J, Birnbaumer L, Penninger JM, Pongs O, Kuhn M. (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.* 105:583-95.



Projektteil B: Charakterisierung eines neuen genetischen Mausmodells mit konditionaler Deletion der cGMP-abhängigen Protein Kinase I in Kardiomyozyten.

Die zuvor geschilderten Untersuchungen zur Bedeutung der cGKI wurden ausschließlich *in vitro*, an isolierten adulten murinen Kardiomyozyten durchgeführt (Projektteil A). Die kardiale Bedeutung dieser Kinase *in vivo* wird aber zum Teil kontrovers diskutiert. Für Untersuchungen *in vivo* stehen zwar Mäuse mit globaler, systemischer Deletion der cGKI zur Verfügung, jedoch haben diese Tiere schwere gastrointestinale- und Knochen-Defekte (Pfeifer et al., 1998). Um die Bedeutung der cGKI für die kardialen Effekte des ANP/GC-A-Systems *in vivo* zu charakterisieren, wurden daher mittels Cre/loxP-Strategie Mäuse mit konditioneller Deletion der cGKI in Kardiomyozyten generiert. Mäuse mit floxed cGKI-Gen (cGKI^{fllox/fllox}; Wegener et al., 2002) wurden uns von Prof. Robert Feil (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) und Prof. Franz Hofmann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München) zur Verfügung gestellt und mit transgenen Mäusen gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase in Kardiomyozyten exprimieren (α MHC-Cre^{tg}). Die Effizienz und Zellspezifität der cGKI-Deletion wurde mittels Western Blot-Analysen an frisch isolierten adulten Kardiomyozyten (und, vergleichend, an anderen Geweben) geprüft und bestätigt.

Um der Bedeutung der kardialen cGKI für die Entwicklung einer pathologischen Herzhypertrophie nachzugehen, behandelten wir CM cGKI KO Mäuse und Kontrolltiere mit ISO oder Ang II (chronische Gabe über osmotische Minipumpen). Weiterhin untersuchten wir die Auswirkungen einer pathologischen Steigerung der kardialen Nachlast durch operative transverse Aortenkonstriktion (TAC). Wir verglichen die Auswirkungen dieser "Stressoren" auf den arteriellen Blutdruck, das kardiale Remodelling, die Herzfunktion und die Expression/Aktivität von Ca²⁺_i-regulierenden Signalwegen (z. B. Phospholamban, SERCA, Troponin I). Die Effekte von ISO (Normotonie) und Ang II (Hypertonie) auf den arteriellen Blutdruck waren in beiden Genotypen ähnlich. Beide neurohumorale Stressoren sowie die TAC führten zu Herzhypertrophie, deren Ausprägung nicht verschieden war zwischen CM cGKI KO Mäusen und Kontrollen. Dies war für uns sehr überraschend, da CM GC-A KO Mäuse mit gesteigerter Herzhypertrophie reagierten und die cGKI zumindest *in vitro* (an isolierten Myozyten) die Calcium-hemmenden Effekte von ANP vermittelt (siehe Projektteil A). Noch erstaunlicher war, dass Ang II und TAC (aber nicht ISO) an CM cGKI KO Mäusen zu einer ausgeprägten dilatativen Kardiomyopathie (sichtbar mittels Echokardiographie) und Herzinsuffizienz (erwiesen mittels invasiven hämodynamischen Untersuchungen) führten. Fluorometrische Messungen der intrazellulären Ca²⁺-Transienten zeigten, dass die Amplituden der Transienten in Myozyten aus Ang II-behandelten CM cGKI KO Mäusen signifikant verringert waren. Western Blot-Analysen zeigten eine deutliche Abnahme der Expression/Phosphorylierung Calcium-regulierender Proteine (Phospholamban, SERCA) sowie des Proteins Troponin I.

Um den direkten Effekten der natriuretischen Peptide auf die Calcium-Homöostase und Phospholamban-Phosphorylierung und der Bedeutung der cGKI nachzugehen, untersuchten wir den Einfluss von ANP und C-Typ natriuretischem Peptid (CNP, Ligand der Guanylyl Cyclase B/GC-B) an isolierten Myozyten von Kontrollmäusen (floxed cGKI) und CM cGKI KO Mäusen. Während ANP keine direkten Effekte auf die intrazellulären freien Ca_i^{2+} -Transienten oder die Phospholamban-Phosphorylierung hatte, hatte CNP deutliche stimulierende Effekte. Diese Effekte waren an cGKI-defizienten Myozyten aufgehoben. Diese Effekte des CNP sind wahrscheinlich sequentiell auf die cGMP-medierte Aktivierung der cGKI, Phosphorylierung von Phospholamban an Ser₁₆, und dadurch beschleunigte Ca_i^{2+} -Aufnahme und gesteigerte Ca_i^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zurückzuführen (siehe auch Pierkes et al., 2002). Die Aufhebung dieser molekularen und funktionellen Effekte von CNP an CM CGKI KO Herzen könnte die Stress-abhängige Entwicklung einer Herzinsuffizienz erklären.

Zusammengenommen belegen diese Beobachtungen in vitro/in vivo die Rolle der cGKI als distaler Mediator des ANP/GC-A/cGMP und des CNP/GC-B/cGMP-Systems im Herzen und die wichtige Rolle dieser Kinase zur Regulation der kardialen Ca^{2+}_i -Homöostase und Pumpfunktion.

Zitat:

Frantz S*, **Klaiber M***, Baba HA*, Völker K, Gaßner B, Oberwinkler H, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M. (2011a) Stress-dependent dilatative cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted deletion of cGMP-dependent protein kinase I. Eur Heart J.

*Equal contribution

Projektteil C: Entdeckung einer bislang unbekanntem, cGMP-unabhängigen Signalfunktion des kardialen GC-A-Rezeptors.

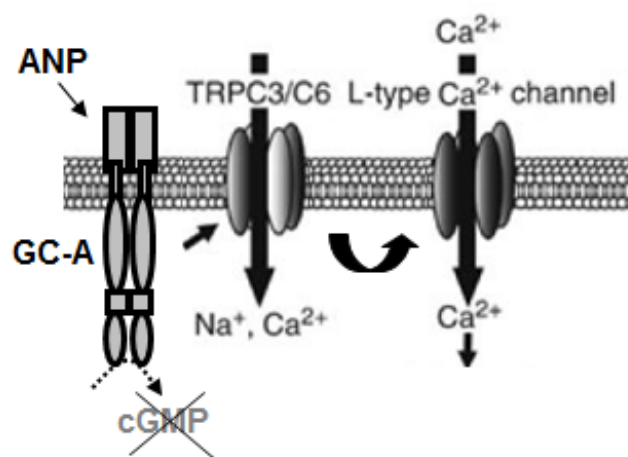
Die im Folgenden geschilderten Ergebnisse basieren auf den Beobachtungen in den Projektteilen A und B und führten zu der Entdeckung einer bislang unbekanntem Signalfunktion des GC-A-Rezeptors. Wie zuvor geschildert, kann ANP, über den GC-A-Rezeptor, physiologischerweise die Entwicklung einer pathologischen Herzhypertrophie attenuieren (A). Andererseits kommt es bei pathologischer Herzhypertrophie langfristig immer zu erhöhten kardialen und systemischen ANP/BNP Konzentrationen und demzufolge wahrscheinlich zu Veränderungen in dem Phosphorylierungsmuster der GC-A und zu Rezeptor-Desensibilisierung (siehe Einleitung). Es stellte sich also die Frage, wie solche posttranslationalen und funktionellen Veränderungen, also die Hemmung der GC-A/cGMP/cGKI-Signaltransduktion, kardiale Effekte von ANP beeinflussen. Wir postulierten, dass eine Desensibilisierung der GC-A oder die pharmakologische oder genetische Hemmung von cGKI in Kardiomyozyten, die inhibierenden Effekte von ANP auf LTCS (L-Typ Ca²⁺-Ströme) und [Ca²⁺]_i aufheben würde. Erstaunlicherweise beobachteten wir aber unter diesen Bedingungen (GC-A-Desensibilisierung, cGKI Hemmung) sogar direkte LTCS- und [Ca²⁺]_i-stimulierende Effekte von ANP an isolierten adulten murinen Myozyten. Pharmakologische (BTP-2) und genetische Inhibitionsexperimente (an TRPC3/C6^{-/-} Myozyten) zeigten, dass TRPC3/C6-Kanäle an diesen stimulierenden Effekten beteiligt sind. Elektrophysiologische Untersuchungen an Ko-transfizierten HEK293-Zellen zeigten, dass ANP/GC-A, cGMP unabhängig, den Kationen-Strom durch TRPC3/C6-Kanäle aktiviert. Ko-Immünpräzipitationsstudien an Ko-transfizierten HEK293-Zellen oder Kardiomyozyten von Mäusen mit kardialer Expression von FLAG-tagged GC-A (generiert von Herrn Hartmann, in AG Kuhn) bewiesen eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem GC-A-Rezeptor und TRPC3/C6-Kanälen. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnten wir weiterhin zeigen, dass diese Interaktion nicht durch die Guanylyl Cyclase-Domäne des GC-A-Rezeptors vermittelt wird bzw. von der cGMP-Signalfunktion des Rezeptors völlig unabhängig ist. Die Interaktion wird vermutlich durch die intrazelluläre "Protein-Kinase" Domäne von GC-A vermittelt (siehe nachfolgende Abbildung). Um die Dynamik dieser Interaktion zu charakterisieren, haben wir Konstrukte zur Expression von cerulean-tagged GC-A und YFP-tagged TRPC6 generiert. In Kooperation mit Herrn Dr. Nikolaev (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg) nutzen wir diese Konstrukte für FRET-Analysen an ko-exprimierenden HEK293-Zellen. Die Ergebnisse bestätigen, dass sich die C-Termini der beiden Proteine tatsächlich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Das basale FRET-Signal zwischen GC-A und TRPC6 wurde durch ANP (nicht aber durch cGMP Analoga) akut (< 10 sec) verändert, möglicherweise aufgrund einer Konformationsveränderung eines oder beider Proteine.

Diese aufwendigen Untersuchungen zeigen also, dass der GC-A-Rezeptor einen stabilen Proteinkomplex mit TRPC3/C6-Kanälen bildet. Diese räumliche Nähe scheint einerseits für die "physiologische" Inaktivierung der Kanäle durch den ANP/GC-A/cGMP/cGKI-Signalweg wichtig zu sein (siehe Projektteil A). Andererseits kann diese Protein-Protein-Interaktion (allosterisch?) auch eine direkte Aktivierung der Kanäle durch ANP/GC-A vermitteln, welche unabhängig von dem "klassischen" Signalträger cGMP ist. Dieser Signalweg führt letztlich zur Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Strömen (LTCS) und zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Kardiomyozyten (siehe nachfolgende Abbildung). Experimente an kultivierten Kardiomyozyten belegen die funktionelle Relevanz dieses "nicht-kanonischen" Signalwegs. Normalerweise kann ANP die wachstumsfördernden Effekten von Ang II oder Phenylephrin hemmen. Wenn aber der GC-A-Rezeptor desensibilisiert ist, übt ANP selbst prohypertrophe Effekte aus. Diese prohypertrophen Effekte werden durch TRPC3/C6-Kanäle vermittelt. Wir postulieren, dass dieser "neue" Signalweg im Herzen unter pathophysiologischen Bedingungen (und GC-A-Desensibilisierung) wichtig sein könnte und möglicherweise die Herzhypertrophie-Entwicklung beschleunigen oder zu Herzarrhythmien beitragen kann.

Zitat:

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang R-B, Völker K, Gaßner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. (2011b) A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signalling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, involves a GC-A – TRPC3/C6 – signalling complex. Proc Natl Acad Sci USA - ONLINE

*Equal contribution



5. Summary

The cardiac hormone atrial natriuretic peptide (ANP) is critically involved in the maintenance of arterial blood pressure and blood volume homeostasis. In addition to this endocrine actions, ANP exerts local, cardiac effects which counteract pathological cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis. These diverse cellular actions of ANP are mediated by the cGMP forming guanylyl cyclase (GC) receptor, GC-A. In cardiomyocytes, ANP/GC-A/cGMP signalling prevents pathological $[Ca^{2+}]_i$ increases and thereby counteracts pathological hypertrophy. However the downstream signalling pathways mediating this effect are unclear. The present thesis characterized the third and downstream intracellular messengers mediating the cardiac antihypertrophic effects of ANP, with a special focus on the role of cGMP-dependent protein kinase I (cGKI). In addition, we investigated whether and how desensitization of the GC-A receptor alters the cardiac effects of ANP.

Firstly, I examined the influence of ANP on beta-adrenergic versus Angiotensin II (Ang II)-dependent (Gs vs. $G\alpha_q$ mediated) stimulation of Ca^{2+}_i -handling and growth of cardiomyocytes. Intracellular Ca^{2+}_i -transients in adult isolated murine ventricular myocytes were studied by fluorometric recordings. ANP suppressed stimulatory effects of Ang II on Ca^{2+}_i -transients, but had no effect on isoproterenol stimulation. Ang II suppression by ANP was abolished in myocytes of mice deficient in GC-A, in cGKI or in the regulator of G protein signalling (RGS) 2. RGS2 is a target of cGKI which interferes with signalling by $G\alpha_q$ -coupled receptors such as the AT_1 -receptor for Ang II. To study the relevance of these effects for heart hypertrophy, we studied cardiac remodelling in mice with conditional, cardiomyocyte-restricted GC-A deletion (CM GC-A KO) and respective controls. Ang II – induced cardiac hypertrophy was significantly enhanced in CM GC-A KO mice. This was associated with increased activation of the Calcium/calmodulin-dependent prohypertrophic signal transducer CaMKII. In contrast, beta-adrenoreceptor-induced hypertrophy was not enhanced in CM GC-A KO mice. These data suggested that the ANP/GC-A/cGMP/cGKI signalling pathway antagonizes the Ca^{2+}_i -dependent hypertrophic growth response to Ang II, but not to beta-adrenergic stimulation. The selectivity of this interaction seems to be determined by cGKI and RGS2-dependent modulation of Ang II/ AT_1 signalling (Klaiber et al., 2010).

To investigate the role of cardiac cGKI in the intact organism, next we studied cardiac hypertrophic responses of mice with a conditional, cardiomyocyte-restricted deletion of cGKI (CM cGKI KO mice). CM cGKI KO mice exhibited unaltered cardiac morphology and function under resting conditions. Also, cardiac hypertrophic and contractile responses to β -adrenoreceptor stimulation by isoprenaline were unaltered. However, Ang II administration or cardiac pressure overload (induced by surgical transverse aortic constriction) provoked dilated cardiomyopathy and cardiac failure. This was accompanied by diminished expression

of the $[Ca^{2+}]_i$ -regulating proteins SERCA2a and phospholamban (PLB) and a reduction in PLB phosphorylation at Ser₁₆, the specific target site for cGKI, resulting in altered myocyte Ca^{2+}_i -homeostasis. In isolated adult myocytes C-type natriuretic peptide (CNP), but not ANP, stimulated PLB phosphorylation, Ca^{2+}_i -handling and contractility via cGKI. These results indicate that loss of cGKI in cardiac myocytes compromises the hypertrophic program to pathological stimulation, rendering the heart more susceptible to dysfunction and dilatation. In particular, cGKI mediates stimulatory effects of CNP on myocyte Ca^{2+}_i -handling and contractility (**Frantz et al., 2011**).

In patients with chronic cardiac hypertrophy or heart failure, cardiac and plasma ANP levels are markedly increased. However, GC-A/cGMP responses to ANP are blunted due to receptor desensitization. Therefore the third part of this thesis investigated whether and how GC-A desensitization interferes with the cardiac actions of ANP. GC-A desensitization was provoked in mice either by chronic infusion of a high dose of ANP, or by severe cardiac hypertrophy (which stimulates endogenous ANP production). Our experiments in isolated myocytes demonstrate that in this situation, ANP binding to GC-A stimulates a unique cGMP-independent signaling pathway, resulting in pathologically elevated intracellular Ca^{2+} levels. This pathway involves the activation of Ca^{2+} -permeable transient receptor potential canonical 3/6 (TRPC3/C6) cation channels by GC-A, which forms a stable complex with TRPC3/C6 channels. Collaborative electrophysiological experiments indicated that the resulting cation influx activates voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels and ultimately increases myocyte Ca^{2+}_i -levels (**Klaiber et al., 2011**).

Together, these observations reveal a dual role of the ANP/GC-A-signaling pathway in the regulation of cardiac myocyte Ca^{2+}_i -homeostasis. Under physiological conditions, formation of cGMP and activation of cGKI moderates the Ca^{2+}_i -enhancing action of hypertrophic factors such as Ang II. By contrast, a cGMP-independent pathway predominates under pathophysiological conditions when GC-A is desensitized by high ANP levels. The concomitant rise in Ca^{2+}_i might increase the propensity to cardiac hypertrophy and arrhythmias.

References:

Klaiber M, Kruse M, Völker K, Schröter J, Feil R, Freichel M, Gerling A, Feil S, Dietrich A, Londoño JE, Baba HA, Abramowitz J, Birnbaumer L, Penninger JM, Pongs O, Kuhn M. 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.* 2010;105:583-95.

Frantz S*, **Klaiber M***, Baba HA*, Oberwinkler H, Völker K, Gaßner B, Bayer B, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M. Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-

restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. Eur H J. 2011; in press. (*Equally contributed)

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang RB, Völker K, Gaßner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108: 18500-5. (*Equally contributed)

6. Literaturverzeichnis

- Ambrosi P, Oddoze C, Habib G. Utility of A-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002; 106: e70
- Baughman KL. B-type natriuretic peptide - a window to the heart. *N Engl J Med* 2002; 347: 158-159
- Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B, Pacher R. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2002; 105: 2392-2397
- Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC Jr. Natriuretic peptides in the diagnosis and management of chronic heart failure. *Heart Fail Clin* 2009; 5: 501-514. Review
- Bulut D, Potthast R, Hanefeld C, Schulz T, Kuhn M, Mügge A. Impaired vasodilator responses to Atrial Natriuretic Peptide in Essential Hypertension. *Eur J Clin Invest* 2002; 33: 567-573
- Cao L, Gardner, DG. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 1995; 25: 227 - 234
- Clarkson PBM, Wheeldon NM, Macleod C, Coutie W, MacDonald TM. Acute effects of atrial natriuretic peptide on left ventricular diastolic function. *Eur Heart J* 1995; 16: 1710-1715
- Di Virgilio F, Fasolato C, Steinberg TH. Inhibitors of membrane transport system for organic anions block fura-2 excretion from PC12 and N2A cells. *Biochem J* 1988; 256: 959-963
- Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe N. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II - induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 1059-1065
- Gomez AM, Cheng H, Lederer WJ, Bers DM. (1996) Ca²⁺ diffusion and sarcoplasmic reticulum transport both contribute to [Ca²⁺]_i decline during Ca²⁺ sparks in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1996; 496: 575–581
- Hempel A, Friedrich M, Schlütter KD, Forssmann WG, Kuhn M, Piper M. ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1997; 273: H244 - H249
- Hirooka Y, Takeshita A, Imaizumi T, Suzuki S, Yoshida M, Ando S-i, Nakamura M. Attenuated forearm vasodilative response to intraarterial atrial natriuretic peptide in patients with heart failure. *Circulation* 1990; 82: 147-153
- Holtwick R, Van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 2003; 111:1399-1407. Dazu ein Editorial von Molckentin JD. *J Clin Invest* 2003; 111: 1275-1277
- Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with

- cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1399-1407
- Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993; 92: 398 - 403
- Kilic A, Bubikat, A, Gaßner B, Baba HA, Kuhn M. Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling. *Endocrinology* 2007; 148: 4162-4169. Dazu ein Editorial von Forte LR. *Endocrinology* 2007; 148: 4160-4161
- Kilic A, Velic A, De Windt LJ, Fabritz L, Voß M, Mitko D, Zwiener M, Baba H, van Eickels M, Schlatter E, Kuhn M. Enhanced activity of the myocardial Na^+/H^+ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in ANP – receptor deficient mice. *Circulation* 2005; 112: 2307-2317
- Kinoshita H et al. Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signalling in the heart. *Circ Res* 2010; 106: 1849-1860
- Kirchhefer U, Klimas J, Baba HA, Buchwalow IB, Fabritz L, Hüls M, Matus M, Müller FU, Schmitz W, Neumann J. Triadin is a critical determinant of cellular Ca cycling and contractility in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H3165-H3174
- Kirchhof P, Fabritz L, Begrow F, Haverkamp W, Kuhn M. Heterogeneous action potential prolongation and abnormal intracellular calcium handling contribute to ventricular tachycardia in isolated hearts from ANP-receptor deficient mice. 2003. Submitted
- Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2703-2706
- Klaiber M*, Frantz S*, Baba HA*, Völker K, Gaßner B, Oberwinkler H, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M. Stress-dependent dilatative cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted deletion of cGMP-dependent protein kinase I. *Eur Heart J* 2011 *Equal contribution
- Kuhn M, Holtwick R, Baba HA, Perriard J-C, Schmitz W, Ehler E. Progressive cardiac hypertrophy and dysfunction in atrial natriuretic peptide receptor (GC-A) deficient mice. *Heart* 2002; 87: 368-374
- Kuhn M, Voss M, Mitko D, Stypmann J, Schmid C, Kawaguchi N, Grabellus F, Baba HA. Left ventricular assist device support reverses altered cardiac expression and function of natriuretic peptides and receptors in end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 308-314
- Kuhn M. Cardiac anti-remodelling effects of phosphodiesterase type 5 inhibitors: afterload-(in)dependent? *Cardiovasc Res* 2009; 82: 4-6

- Kuhn M. Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 191: 47-69. Review
- Kuhn M. Structure, regulation and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 2003; 93: 700-709.
- Kuwahara M, Sugano S, Yayou K, Tsubone H, Kobayashi H. Evaluation of a new tail-cuff method for blood pressure measurements in rats with special reference to the effects of ambient temperature. *Jikken Dobutsu* 1991; 40: 331-336
- Kwan HY, Huang Y, Yao X. Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2625-2630
- Lin X, Hänze J, Heese F, Sodmann R, Lang RE. Gene expression of natriuretic peptide receptors in myocardial cells. *Circ Res* 1995; 77: 750-758
- Lopez JM, Garbers DL, Kuhn M. The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* 1997; 272 (37): 23064-23068
- Lopez MJ, Wong SK-F, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase A receptor gene. *Nature* 1995; 378: 65-68
- Maier LS. Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart. *Front Biosci* 2009; 14: 486-496. Review
- McKie PM, Sangaralingham SJ, Burnett JC Jr. CD-NP: an innovative designer natriuretic peptide activator of particulate guanylyl cyclase receptors for cardiorenal disease. *Curr Heart Fail Rep* 2010; 7: 93-99. Review
- Meulemans AL, Sipido KR, Sys SU, Brutsaert DL. Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle. *Circ Res* 1988; 62: 1171-1174
- Nakajima K, Onishi K, Dohi K, Tanabe M, Kurita T, Yamanaka T, Ito M, Isaka N, Nobori T, Nakano T. Effects of human atrial natriuretic peptide on cardiac function and hemodynamics in patients with high plasma BNP levels. *Int J Cardiol* 2005; 104: 332-337
- Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Makita S, Hiramori K. Vasodilatory effects of C-type natriuretic peptide on forearm resistance vessels are distinct from those of atrial natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation* 1994; 90: 1210-1214
- Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Rehemudula D, Kanmatsue K, Furuya K. Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res* 2000; 86: 841-845
- Nunez DJR, Dickson MC, Brown MJ. Natriuretic peptide receptor mRNAs in the rat and human heart. *J Clin Invest* 1992; 90: 1996-1971
- Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* 2006; 25: 5305-5316

- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszódi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998; 17: 3045-3051
- Pierkes M, Gambaryan S, Boknik P, Lohmann SM, Schmitz W, Potthast R, Holtwick R, Kuhn M. Increased effects of C-type natriuretic peptide on cardiac ventricular contractility and relaxation in guanylyl cyclase A-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 852-861
- Pierkes M, Gambaryan S, Boknik P, Lohmann SM, Schmitz W, Potthast R, Holtwick R, Kuhn M. Increased effects of C-type natriuretic peptide on cardiac ventricular contractility and relaxation in guanylyl cyclase A-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 852-861
- Poole-Wilson PA. Treatment of acute heart failure: out with the old, in with the new. *JAMA* 2002; 287: 1578-1580
- Potter LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 2011; 23: 1921-1926
- Rugg EL, Aiton JF, Cramb G. Atrial natriuretic peptide receptors and activation of guanylate cyclase in rat cardiac sarcolemma. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162: 1339-1345
- Schiffrin EL. Decreased density of binding sites for atrial natriuretic peptide on platelets of patients with severe congestive failure. *Clinical Science* 1988; 74: 213-218
- Schröter J, Zahedi RP, Hartmann M, Gassner B, Gazinski A, Waschke J, Sickmann A, Kuhn M. Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *FEBS J* 2010; 277: 2440-2453
- Semigran MJ, Aroney CN, Herrmann HC, Dec WG, Boucher CA, Fifer MA. Effects of atrial natriuretic peptide on left ventricular function in hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 271-279
- Silver MA, Horton DP, Ghali JK, Elkayam U. Effect of nesiritide versus dobutamin on short-term outcomes in the treatment of patients with acutely decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 798-802
- Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 1998; 78: 921-947
- Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, Vahebi S, Cormaci G, Ketner EA, Moens AL, Champion HC, Kass DA. Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* 2007; 115: 2159-2167
- Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med* 2003; 9: 1506-1512
- Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem* 2002; 230: 31-47
- Tsutamoto T, Kanamori T, Morigami N, Sugimoto Y, Yamaoka O, Kinoshita M. Possibility of downregulation of atrial natriuretic factor receptors coupled to guanylate cyclase in

- peripheral vascular beds of patients with chronic severe heart failure. *Circulation* 1993; 87: 70-75
- Vasan RS, Benjamin EJ, Larson MG, Leip EP, Wang TJ, Wilson PWF, Levy D. Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction. The Framingham Heart Study. *JAMA* 2002; 288: 1252-1259
- Wegener JW, Nawrath H, Wolfsgruber W, Kühbandner S, Werner C, Hofmann F, Feil R. cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res* 2002; 90: 18-20
- Wegener JW, Nawrath H, Wolfsgruber W, Kühbandner S, Werner C, Hofmann F, Feil R. cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res* 2002; 90: 18-20
- Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 14860–14866
- Yamamoto K, Burnett JC, Redfield MM. Effect of endogenous natriuretic peptide system on ventricular and coronary function in failing heart. *Am J Physiol* 1997; 273: H2406-H2414
- Yoshizumi M, Houchi H, Tsuchiya K, Minakuchi K, Horike K, Kitagawa T, Katoh I, Tamaki T. Atrial natriuretic peptide stimulates Na⁺-dependent Ca⁺⁺ efflux from freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *FEBS Letters* 1997; 419: 225-258
- Zakeri R, Burnett JC. Designer natriuretic peptides: a vision for the future of heart failure therapeutics. *Can J Physiol Pharmacol* 2011; 89: 593-601

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Bedeutung der cGMP-abhängigen Protein Kinase I für die kardialen Effekte des atrialen natiuretischen Peptids“

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und dass die Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Außerdem erkläre ich, dass ich früher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

.....
Michael Klaiber

Würzburg, den

Anhang

Publikation 1:

Klaiber M, Kruse M, Völker K, Schröter J, Feil R, Freichel M, Gerling A, Feil S, Dietrich A, Londoño JE, Baba HA, Abramowitz J, Birnbaumer L, Penninger JM, Pongs O, Kuhn M. 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.* 2010;105:583-95.

Publikation 2:

Frantz S*, **Klaiber M***, Baba HA*, Oberwinkler H, Völker K, Gaßner B, Bayer B, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M. Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Eur H J.* 2011; in press.

*Equally contributed

Publikation 3:

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang RB, Völker K, Gaßner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:18500-5.

*Equally contributed