

Charakterisierung der dynamischen Interaktion des
Guanylyl Cyclase-A (GC-A)-Rezeptors mit den
Transient Receptor Potential Canonical Type 3 und
Type 6 (TRPC3/C6)-Kanälen

und

Generierung von β -Zell-spezifischen GC-A-*knock-*
out-Mäusen sowie die Analyse der Bedeutung von
ANP für die Insulin-Homöostase unter
pathophysiologischen Bedingungen

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Beatrice Dankworth
aus Halberstadt

Würzburg 2013

Die vorgelegte Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2010 bis Januar 2013 unter der Leitung von Prof. Michaela Kuhn an dem Institut für Physiologie I der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter : Prof. Michaela Kuhn

2. Gutachter: Prof. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	7
1. Einleitung	
1.1. Struktur und Bedeutung des Guanylyl Cyclase-A (GC-A)-Rezeptor	10
1.1.1. Allgemeine Strukturmerkmale von GC-A	10
1.1.2. Der Signalweg des GC-A/ANP-Systems	11
1.1.3. Die Rolle von GC-A/ANP für Kardiomyozyten	11
1.2. Eigenschaften und Bedeutung der <i>Transient Receptor Potential Canonical Type 3</i> und <i>Type 6</i> (TRPC3/6)-Kanäle für Kardiomyozyten	13
1.2.1. Allgemeine Strukturmerkmale der TRPC-Kanäle	13
1.2.2. Der klassische TRPC3/C6-Ca ²⁺ -Signalweg in Kardiomyozyten	14
1.2.3. Ein neuer TRPC3/C6-Ca ²⁺ -Signalweg in Kardiomyozyten nach Desensibilisierung von GC-A	15
1.3. Physiologie der β -Zelle	16
1.3.1. Aufbau der Langerhans Inseln	16
1.3.2. Die Glukose-stimulierte Insulinsekretion	17
1.3.3. Die Rolle von GC-A für die Insulinsekretion	19
1.3.4. Diabetes mellitus	20
1.4. Konventioneller <i>knock-out</i> von GC-A mit dem Cre/loxP-System	21
1.5. Wissenschaftliche Fragestellung	22
2. Material und Methoden	
2.1. Materialien	24
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.2. Antikörper	24
2.1.3. Zelllinien	25
2.1.4. Größenmarker	26

2.1.5. Plasmide	26
2.1.6. Mauslinien	27
2.1.7. Tierfutter	27
2.2. Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1. Isolation von genomischer DNA aus Langerhans-Inseln und aus Gewebe	28
2.2.2. DNA-Amplifizierung mittels PCR	28
2.2.3. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.3. Zellbiologische Methoden	31
2.3.1. Transiente Plasmidtransfektion	31
2.3.2. Isolation und Kultivierung muriner Langerhans-Inseln	31
2.3.3. FRET-Analysen an HEK293-Zellen	33
2.4. Proteinchemische und immunologische Methoden	33
2.4.1. Herstellung von Proteinlysaten aus HEK293-Zellen und deren Zellfraktionierung	33
2.4.2. Proteinextraktion aus Gewebeproben und Langerhans-Inseln	34
2.4.3. Ko-Immunpräzipitation	35
2.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung	35
2.4.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
2.4.6. Western- und Immunoblot	36
2.4.7. cGMP-Radioimmunassay mit Langerhans-Inseln	37
2.4.8. Insulin-Radioimmunassay zur Messung der Insulin-Sekretion	38
2.5. Tiermodell	39
2.5.1. Blutdruckmessungen	39
2.5.2. Blutzuckerbestimmung und oraler Glukosetoleranztest (oGTT)	40
2.5.3. Morphometrische Analysen an Langerhans-Inseln	40
2.6. Computeranalyse/Statistik	41

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der dynamische Interaktion des GC-A-Rezeptors mit TRPC3/C6-Kanälen	42
3.1.1. Ko-Immunpräzipitation von TRPC3/C6 mit GC-A in HEK293-Zellen	42
3.1.2. Keine Ko-Immunpräzipitation von TRPC4/C5 mit GC-A in HEK293-Zellen	44
3.1.3. TRPC3/C6-Expression ist vermindert in HA-GC-A-überexprimierenden Mäusen	44
3.1.4. Ko-Immunpräzipitation von TRPC3/C6 mit GC-A in Herzlysaten von HA-überexprimierenden Mäusen	46
3.1.5. Die Ko-Expression von GC-A-CFP und TRPC3-YFP in HEK293-Zellen führt zu einem basalen FRET-Signal	46
3.1.6. Das FRET-Signal verändert sich ANP-abhängig	47
3.1.7. Die Guanylyl Cyclase-Domäne ist nicht verantwortlich für die ANP-modulierte Interaktion zwischen GC-A und TRPC3	48
3.1.8. Die ANP-modulierte Interaktion besteht auch zwischen einem desensitisierten GC-A-Rezeptor und TRPC3	49
3.2. Die Bedeutung von ANP für die Insulin-Homöostase unter pathologischen Bedingungen	50
3.2.1. Charakterisierung der generierten β -Zell-GC-A-KO-Mäuse	50
3.2.1.1. Nachweis der β -Zell-spezifischen GC-A-Deletion mittels genomischer PCR	50
3.2.1.2. Die Expression von GC-A in Inseln und anderen Geweben	52
3.2.1.3. Immunhistochemie an Pankreasgewebe	53
3.2.1.4. Blutdruck und Herzgewicht der β -Zell-GC-A-KO-Mäuse	56
3.2.1.5. Basale Blutzuckerspiegel der β -Zell-GC-A-KO-Mäuse	58
3.2.1.6. cGMP-RIA an murinen Langerhans-Inseln	60
3.2.2. <i>High fat diet</i> (HFD)-Studie	61
3.2.2.1. Studiendesign	61
3.2.2.2. Gewichtsveränderungen	61
3.2.2.3. Ergebnisse der oralen Glukosetoleranztests	62
3.2.2.4. Blutdruckmessungen	66
3.2.2.5. Bestimmung der Herzgewichte	66

3.2.2.6.	Insulin-Sekretion	67
3.2.2.7.	Morphometrische Analyse von Langerhans-Inseln nach der HFD	68
4.	Diskussion	
4.1.	Die dynamische Interaktion zwischen TRPC3/C6 und GC-A	70
4.2.	Generierung der β -Zell-spezifischen GC-A-KO-Mäuse	71
4.2.1.	Vergleich des β -Zell-GC-A-KO-Mausmodells mit den globalen GC-A-KO-Mäusen	71
4.2.2.	Auswahl der Cre-Mauslinie für die Zucht	72
4.2.3.	GC-A-Expression in den β -Zell-GC-A-KO-Mäusen	73
4.2.4.	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Insulinsekretion	74
4.3.	Auswertung der <i>high fat diet</i> -Studie	75
4.3.1.	Die Gewichtszunahme	75
4.3.2.	Ausbildung der Insulinresistenz	76
4.3.3.	Veränderte Insulinausschüttung bei den β -Zell-GC-A-KO-Mäusen	78
4.3.4.	Adaption der β -Zellgröße	78
5.	Ausblick	79
6.	Anhang	
	Literaturverzeichnis	80
	Publikation	88
	Tabellenverzeichnis	89
	Abbildungsverzeichnis	90
	Abkürzungsverzeichnis	92
	Danksagung	94
	Lebenslauf	95
	Erklärung	96

Zusammenfassung

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) beeinflusst den arteriellen Blutdruck und das intravasale Volumen durch Stimulation der intrazellulären Produktion von cGMP über den membranständigen Guanylyl Cyclase-A (GC-A)-Rezeptor. ANP stimuliert außerdem die Angiogenese und ist am Wachstum der Kardiomyozyten beteiligt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die dynamische Interaktion zwischen den rezeptoraktivierten Kationenkanälen *Transient Receptor Potential Canonical Type 3* und *Type 6* (TRPC3/C6) und dem GC-A-Rezeptor untersucht. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ANP über GC-A den TRPC-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in Kardiomyozyten auf cGMP-unabhängige Weise stimuliert. Um eine mögliche direkte Interaktion von TRPC3/C6 und GC-A zu zeigen, wurde TRPC3 oder C6 mit Flag-GC-A in HEK293-Zellen koexprimiert. Die Membranfraktion der Zellen wurde nach Immunpräzipitation mit einem anti-Flag-Antikörper im Western Blot untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TRPC3/C6 unabhängig von ANP mit GC-A ko-immunpräzipitieren. Die Interaktion erfolgte auch mit einem modifizierten GC-A-Rezeptor, dem die Cyclase-Domäne fehlt. Um die Interaktion in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell mit einer Überproduktion von HA-GC-A in Kardiomyozyten verwendet. Auch bei diesem Modell konnte mittels anti-HA-Antikörper die Koimmunpräzipitation von GC-A und TRPC3/C6 nachgewiesen werden. Schließlich wurden FRET-basierte Untersuchungen durchgeführt, um die lokale Nähe von GC-A und TRPC3 zu beweisen und eine mögliche ANP-induzierte Konformationsänderung zu untersuchen. Die Koexpression von GC-A-CFP und TRPC3-YFP in HEK293 Zellen führte zu einem FRET-Signal, welches durch ANP konzentrationsabhängig (1-100 nM) gesenkt wurde. Die Gabe des membranpermeablen cGMP-Analagons 8-Br-cGMP führte dagegen zu keiner Veränderung des FRET-Signals. Die Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein eines stabilen Proteinkomplexes von GC-A und TRPC3, der für den neuen cGMP-unabhängigen Signalweg von GC-A ausschlaggebend ist.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Rolle von ANP/GC-A für die Insulinausschüttung der pankreatischen β -Zellen. Es ist bereits bekannt,

dass GC-A in den β -Zellen exprimiert wird und dass ANP an isolierten Langerhans'schen Inseln das β -Zell-Wachstum und die Insulinsekretion moduliert. Um langfristig die Bedeutung von ANP für die systemische Glukose-Homöostase zu ergründen, wurde ein Mausmodell mit einer β -Zell-spezifischen GC-A-Deletion generiert. Der Nachweis des konditionellen GC-A *knock out* (KO) erfolgte mittels genomischer PCR und Immunhistochemie. Eine Detektion von GC-A in den Langerhans'schen Inseln auf Proteinebene war leider nicht möglich. Aber es konnte gezeigt werden, dass der β -Zell-spezifische KO zu keiner Expressionsänderung von GC-A in anderen Geweben führte. Auch der Blutdruck und das Herzgewicht der KO Mäuse blieb unauffällig. Zur Untersuchung der Bedeutung von ANP für die Insulinausschüttung unter pathologischen Bedingungen wurden KO- und Kontrolltiere für 12 Wochen einer fettreichen Ernährung (60% Fett) ausgesetzt um einen Prädiabetes auszulösen. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Studie wurden orale Glukose-Toleranz-Tests (oGTT), Blutdruckmessungen und Gewichtsbestimmungen durchgeführt. Bereits vor der Studie wurde beobachtet, dass der Nüchternglukosewert in den weiblichen KO-Mäusen leicht erhöht ist. Daher wurden die oGTT's in der Studie geschlechtsspezifisch ausgewertet. Am Ende der Studie zeigten alle Mäuse eine vergleichbare insuffiziente Blutzuckerregulierung. Der Blutdruck war sowohl in KO- als auch in Kontrolltieren um ca. 60% erhöht. Einigen Tieren wurde das Pankreas entnommen und für immunhistologische Zwecke präpariert. Die morphometrische Auswertung der Pankreas-Schnitte ergab eine signifikant vergrößerte durchschnittliche Inselfläche und eine erhöhte durchschnittliche β -Zellfläche der KO-Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Die β -Zellen der KO-Tieren waren im Vergleich zu den Kontrollen hypertroph. Die Studie zeigt also, dass die Deletion von GC-A in den β -Zellen unter pathologischen Bedingungen zu einer Hypertrophie der β -Zellen führt und zu einem geringeren Schutz gegen die Ausbildung eines Prädiabetes beiträgt. Eine mögliche verstärkte periphere Insulinresistenz in den KO-Tieren ist auch nicht auszuschließen. Weitere Studien an dem neuen Mausmodell könnten die Bedeutung des ANP/GC-A-Systems für die Insulinausschüttung näher ergründen und dadurch eventuell neue Therapieansätze für Diabetes mellitus Typ 2 bringen.

Abstract

Atrial natriuretic peptide (ANP) modulates blood pressure and volume by its cGMP generating guanylyl cyclase-A (GC-A) receptor. ANP also stimulates cardiomyocyte growth and angiogenesis. This work concentrates on two separate mechanisms where ANP/GC-A system plays an important role.

The first part of this work concerns the dynamic interaction of the transient receptor potential canonical type 3 or type 6 (TRPC3/C6) cation channels with GC-A receptor. Recently, it was indicated that ANP via GC-A stimulates the TRPC-mediated Ca^{2+} influx in cardiomyocytes in a cGMP-independent manner. To analyze the presumed direct interaction between TRPC3/C6 and GC-A the proteins TRPC3 or C6 and Flag-GC-A were coexpressed in HEK293 cells in presence or absence of ANP. After lysis GC-A was precipitated from the membrane fraction of the cells with anti-Flag-antibodies. TRPC3 and TRPC6 were detected in this fraction. The co-immunoprecipitation was also performed with a modified GC-A receptor lacking the cyclase domain as well as with cardiomyocytes from transgenic mice characterized by cardiomyocyte overexpression of HA-GC-A. In all cases TRPC3/C6 co-immunoprecipitated with GC-A. Finally, FRET-based approaches were used to examine the local distance between GC-A and TRPC3. Coexpression of GC-A-CFP and TRPC3-YFP in HEK293 cells led to a FRET signal which was decreased by ANP (1-100 nM) in a concentration dependent manner. Incubation of the membrane permeable cGMP analog 8-Br-cGMP did not alter the FRET signal. All results confirm the presence of a stable protein interaction between GC-A and TRPC3 or TRPC6.

In the second part of this work the role of ANP/GC-A system for (patho)physiologic insulin release in pancreatic β -cells was investigated. It was recently shown that GC-A is expressed in β -cells and that ANP modulates β -cell growth and insulin secretion in isolated pancreatic islets. To analyze the relevance of ANP for the systemic glucose homeostasis a new mouse model was generated characterized by a β -cell-specific GC-A deletion. To prove the conditional GC-A knock out (KO) we used genomic PCR and immunohistochemical approaches. The specific deletion did alter neither the GC-A expression in other tissues nor blood pressure and heart weight in KO

mice. Fasting blood glucose levels were slightly elevated in female KO mice. Therefore all subsequent experiments were evaluated gender-related. Male and female controls and KO mice were fed a high fat diet (60 % fat) for 12 weeks to provoke a prediabetic state and insulin resistance. Oral glucose tolerance tests (oGTT), blood pressure measurements and weight analysis were performed to analyze if the KO affects insulin homeostasis under pathophysiological conditions. All mice developed an insufficient blood glucose regulation which was evident using the oGTT. Blood pressure was increased by 60% both in controls and KO mice. For immunohistochemical studies the pancreata from several animals were dissected and fixed in formalin. The cut organ slices were treated with glucagon and insulin antibodies. All islets were documented and analyzed morphometrically. The mean islet area and the mean β -cell area was significantly increased in KO animals. In summary, the β -cell-specific KO of GC-A led to hypertrophic β -cells under pathophysiological conditions. To uncover the entire role of ANP/GC-A system for the insulin release further studies have to be performed. The new mouse model provides the potential to find new therapeutic strategies for the treatment diabetes mellitus type 2.

1. Einleitung

1.1 Struktur und Bedeutung des Guanylyl Cyclase-A (GC-A)-Rezeptors

1.1.1 Allgemeine Strukturmerkmale von GC-A

Die Guanylyl Cyclase-A (GC-A) ist der Rezeptor für das Blutdruck-regulierende und natriuretisch wirkende Hormon atriales natriuretisches Peptid (ANP) sowie dem B-Typ natriuretischem Peptid (BNP). GC-A ist ein Transmembranrezeptor, der als Homodimer oder Homotetramer vorliegt (Chinkers 1992). Der Rezeptor hat eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine kurze Transmembranregion und eine intrazelluläre Region (Abb. 1). Der intrazelluläre Bereich ist zusammengesetzt aus der Protein-Kinase-Homologen-Domäne (KHD), einer Hinge-Region und einer C-terminalen Guanylyl Cyclase-Domäne (Chinkers 1989, Wilson 1995). GC-A wird vor allem in vaskulären glatten Muskelzellen, im Endothel, im zentralen und peripheren Nervensystem, in den Nebennieren, den Nieren, der Milz und im Herzgewebe exprimiert (Kuhn 2003).

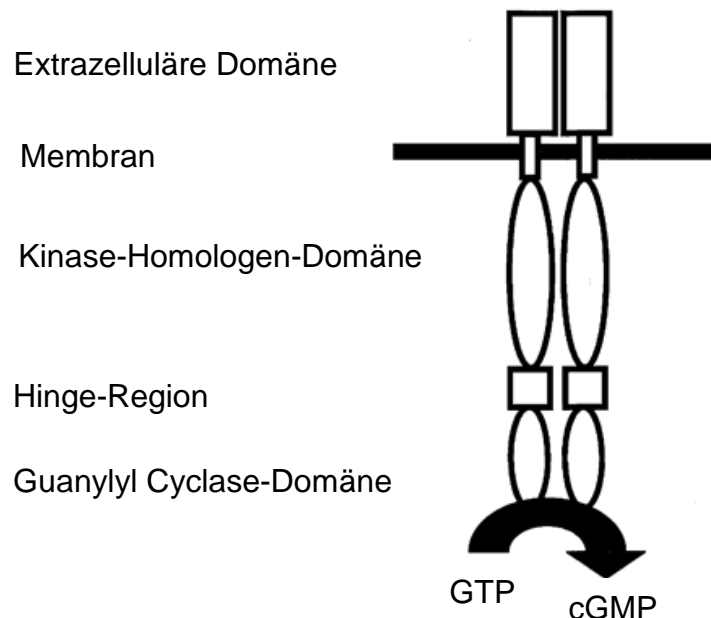


Abb. 1: Schematische Struktur eines funktionellen GC-A-Rezeptordimers. Quelle: Kuhn, Handb Ex Pharmacol 2009, S. 49, modifiziert.

1.1.2 Der Signalweg des GC-A/ANP-Systems

Der Hauptligand für GC-A, das ANP, wird vorwiegend in den Herzvorhöfen gebildet (de Bold 2001). Die Produktion und Freisetzung von ANP wird bei einem erhöhten intra-atrialen Volumen oder Druck stimuliert oder durch Dehnung der Herzvorhofwand bzw. durch Dehnung der Myozyten angeregt (Edwards 1988). Verschiedene Hormone wie Angiotensin II oder Endothelin führen ebenfalls zu einer Ausschüttung von ANP (Soualmia 1997, Stasch 1989). Durch die Bindung von ANP an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne der GC-A rotieren die juxtamembranen Bereiche, so dass die intrazellulären Domänen zweier Monomere in die richtige Orientierung gebracht werden und es zur Bildung des Botenstoffes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) kommt (Misono 2005).

cGMP reguliert eine Vielzahl an Proteinen (Abb. 2), wie z.B. die cGMP-regulierten zyklischen Nukleotidphosphodiesterasen (PDE2, PDE3), die cGMP-abhängigen Proteinkinasen I und II (PKG I, PKG II) sowie cGMP-abhängige Ionenkanäle (Tsai 2009). Der Blutdruck wird schließlich nach Freisetzung von ANP durch renale Salz- und Wasserexkretion und durch Dilatation der Blutgefäße gesenkt (Currie 1983).

1.1.3 Die Rolle des GC-A-Rezeptors für Kardiomyozyten

Bei erhöhtem intra-atrialem Volumen oder Druck erhöht sich die Expression der natriuretischen Peptide (NP) in den Herzventrikeln. Die NPs wirken dabei nicht nur endokrin, sondern sie haben auch lokal antihypertrophe (ANP) bzw. antifibrotische (BNP) Effekte (Kuhn 2003). Mäuse mit einer globalen Deletion von GC-A haben nicht nur einen erhöhten arteriellen Bluthochdruck, sondern leiden auch an einer starken Herzhypertrophie (Knowles 2001, Lopez 1995). Eine blutdruckunabhängige, leichte Herzhypertrophie kann an Mäusen mit konditionaler, Kardiomyozyten-spezifischer Deletion der GC-A (CM-GC-A-KO-Mäuse) nachgewiesen werden (Holtwick 2003). Auch *in vitro* inhibiert ANP das Wachstum und die Proliferation von kultivierten Kardiomyozyten und Fibroblasten über GC-A (Kuhn 2003). Die natriuretischen Peptide übernehmen also eine wichtige Rolle, um pathologisches Wachstum der Kardiomyozyten zu

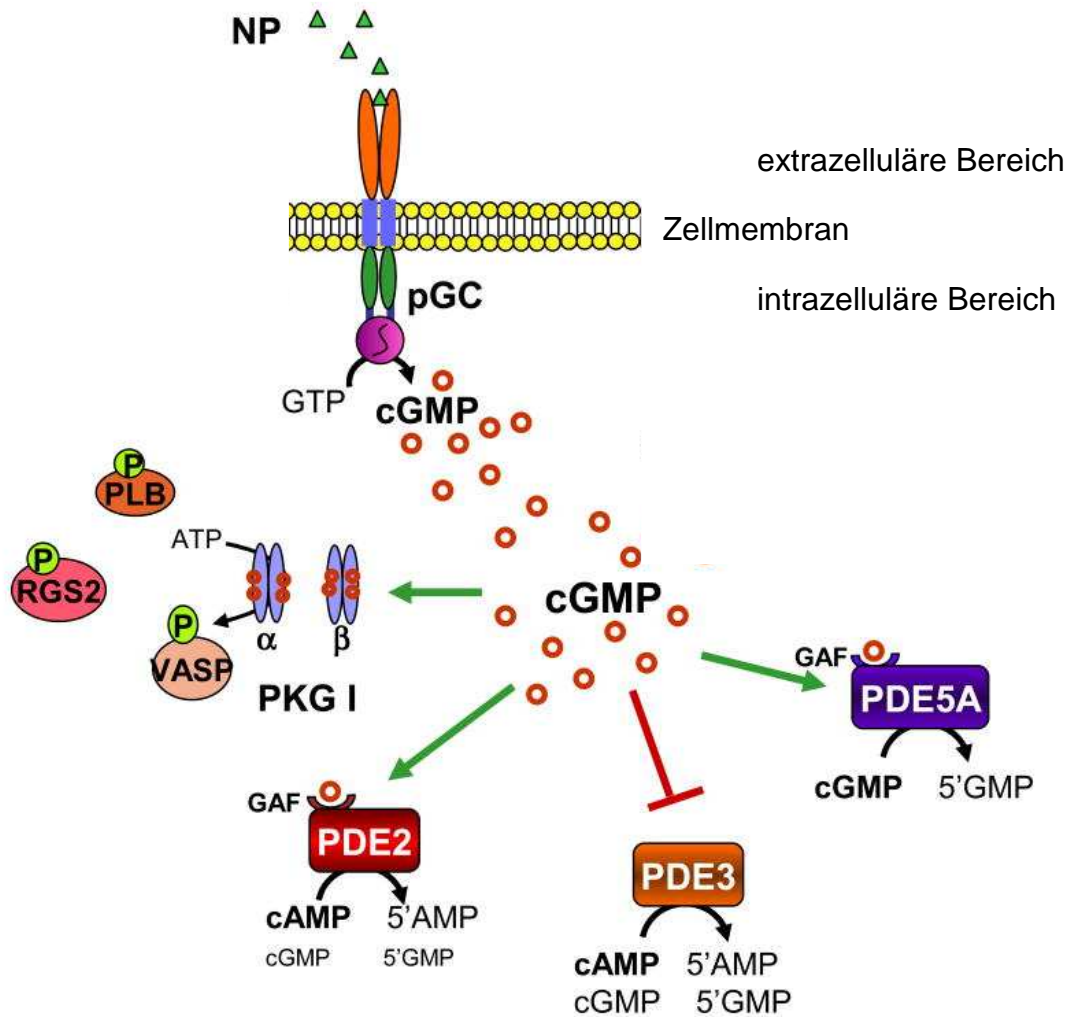


Abb. 2: Die cGMP-Signalkaskade. Der Botenstoff cGMP wird durch die partikuläre GC (pGC, GC-A) produziert. cGMP kann cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) und Phosphodiesterasen (PDE) aktivieren (grüner Pfeil) oder inhibieren (roter Pfeil). PKG I phosphoryliert verschiedene Proteine, wie Phospholamban (PLB), Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP) sowie *regulator of G protein signaling 2* (RGS2). Quelle: Tsai (2009), S. 217, modifiziert.

hemmen. Eine erhöhte Freisetzung von ANP dient als Marker für die Entwicklung einer Herzhypertrophie. Denn die Plasmakonzentration von ANP beträgt in gesunden Menschen etwa 10 fmol/ml. In Patienten mit Herzinsuffizienz ist dieser Wert um das bis zu 30fache erhöht (Cody 1986). Der detaillierte Mechanismus der antihypertrophen Effekte von NP/GC-A in den Kardiomyozyten ist allerdings noch unklar.

Das NP/GC-A System steht auch im Zusammenhang mit Zellproliferation und Angiogenese im Herzen und im Skelettmuskel (Kuhn 2009 A).

1.2 Eigenschaften und Bedeutung der *Transient Receptor Potential Canonical Type 3* und *Type 6* (TRPC3/C6)-Kanäle für Kardiomyozyten

1.2.1 Allgemeine Strukturmerkmale der TRPC-Kanäle

Die *Transient Receptor Potential Canonical* (TRPC)-Kanäle sind Ionenkanäle, die aus 4 Domänen bestehen. Jede Domäne enthält sechs transmembrane Bereiche. Zu der TRPC-Superfamilie gehören sechs humane und sieben murine Mitglieder. Alle TRPC-Kanäle sind nicht-selektiv permeabel für Kationen, wobei Ca^{2+} -Ionen eine große Rolle spielen. Einige Mitglieder scheinen an dem SOC („store-operated Ca^{2+} “)-Influx beteiligt zu sein, andere an der ROC („receptor-operated Ca^{2+} “)-Influx-Aktivität. Es findet keine spannungsabhängige Aktivierung der Kanäle statt (Earley 2010).

Die TRPC-Kanäle können an Hand von Sequenzalignments und funktionellen Gemeinsamkeiten in drei Gruppen unterteilt werden:

TRPC3-, TRPC6- und TRPC7-Kanäle sind sensitiv für den Phospholipase C (PLC)-Metaboliten Diacylglycerol (DAG) und scheinen in vielen Zelltypen wichtige rezeptorgesteuerte Kanäle zu bilden. Die TRPC-Kanäle können als Homotetramere vorliegen oder miteinander heteromultimere Kanäle bilden (Ramsey 2006).

TRPC1, TRPC4 und TRPC5 sind dagegen G-Protein-aktivierte rezeptor-gesteuerte Kanäle, die ebenfalls untereinander Heteromultimere bilden können (Ramsey 2006).

TRPC2 nimmt eine Sonderstellung ein. Das humane TRPC2-Gen ist vermutlich ein Pseudogen. Nur in Mäusen und Ratten wird TRPC2 nachweislich exprimiert. TRPC2 wird wahrscheinlich durch DAG aktiviert und spielt eine Rolle in der Signaltransduktion von Pheromonen (Ramsey 2006).

1.2.2 Der klassische TRPC3/C6-Ca²⁺-Signalweg in Kardiomyozyten

Die TRPC3- und TRPC6-Kanäle spielen eine Rolle für den pathologischen Kalzium-Signalweg in Kardiomyozyten, der zur Entwicklung einer Herzhypertrophie führt (Onohara 2006). Dazu bindet der Vasokonstriktor Angiotensin II (Ang II), welcher Kardiomyozytenhypertrophie und Fibroblastenproliferation im Herzen hervorruft, an den Ang II Typ 1 (AT1)-Rezeptor von Kardiomyozyten (Sadoshima 1993, Paradis 2000, Diniz 2009). Es kommt Gαq-Protein-gesteuert zur Aktivierung der PLC und Bildung von DAG. Dadurch werden die TRPC3/C6-Kanäle direkt aktiviert und Ca²⁺ strömt ein. Durch die hervorgerufene leichte Membranpotentialerhöhung kommt es zur Öffnung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen und zu einem weiteren Einstrom von Ca²⁺. Dadurch wird der Calcineurin/*nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Signalweg aktiviert, der schließlich zur Hypertrophie der Kardiomyozyten führt (Abb. 3).

Der ANP/GC-A/cGMP-Signalweg kann den Ang II-stimulierten Ca²⁺-Einstrom in Kardiomyozyten hemmen und der Herzhypertrophie entgegenwirken (Klaiber 2010). Dieser Schutzmechanismus wird durch die cGMP-vermittelte Aktivierung der GMP-abhängigen Protein Kinase I (PKG I) eingeleitet. PKG I erhöht wahrscheinlich die Expression oder die Phosphorylierung des „regulator of G protein signaling 2“ (RGS2)-Proteins. RGS2 hemmt den AngII/AT-1-Signalweg und damit den pathophysiologischen Ca²⁺-Einstrom (Klaiber 2010).

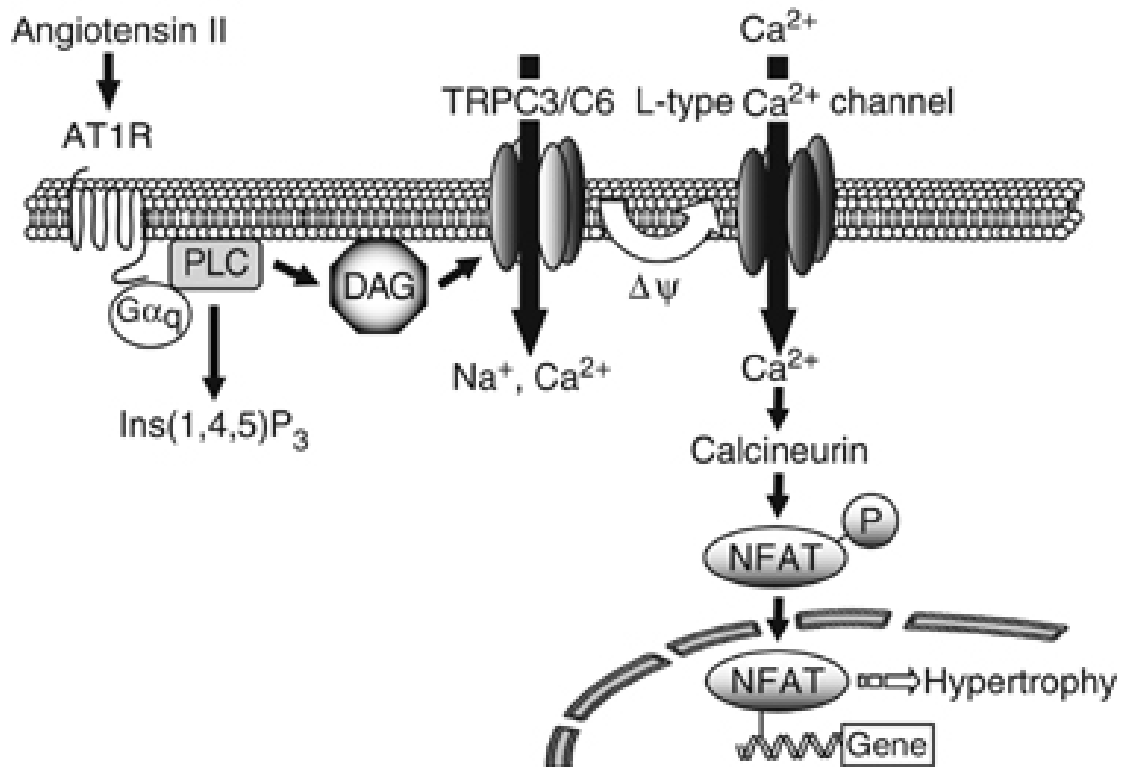


Abb. 3: Schema der Ang II-induzierten NFAT-Aktivierung in Kardiomyozyten. Quelle: Onohara 2006, S. 5313.

1.2.3 Ein neuer TRPC3/C6-Ca²⁺-Signalweg in Kardiomyozyten nach Desensitisierung von GC-A

Neueste Erkenntnisse haben ergeben, dass ANP nicht immer vor dem pathologischen Ang II-stimulierten Ca²⁺-Einstrom in Kardiomyozyten schützen kann. Bei einer Desensitisierung des GC-A-Rezeptors oder bei Verlust des PKGI/cGMP-Signalweges kommt es, statt zu einer Senkung, zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (Klaiber 2011).

Eine Desensitisierung des GC-A-Rezeptors kann bei akutem Bluthochdruck, Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz auftreten, da in diesen Fällen der ANP-Spiegel sehr hoch ist (Kuhn 2004, Kuhn 2009). Es kommt dann zu keiner cGMP-Bildung durch den aktivierten GC-A-Rezeptor. Klaiber *et al* (2011) haben gezeigt, dass GC-A unter diesen Bedingungen die TRPC3/C6-Kanäle aktivieren kann und somit zur Öffnung der L-Typ-Kalzium-Kanäle beiträgt.

Dieser Effekt tritt auch auf, wenn die PKG I deletiert ist. Es wird angenommen, dass die aktivierte GC-A immer zu einer Aktivierung der TRPC3/C6-Kanäle

führt, aber normalerweise phosphoryliert die durch cGMP stimulierte PKG I die TRPC3/C6-Kanäle, wodurch diese wieder inaktiviert werden (Abb. 4).

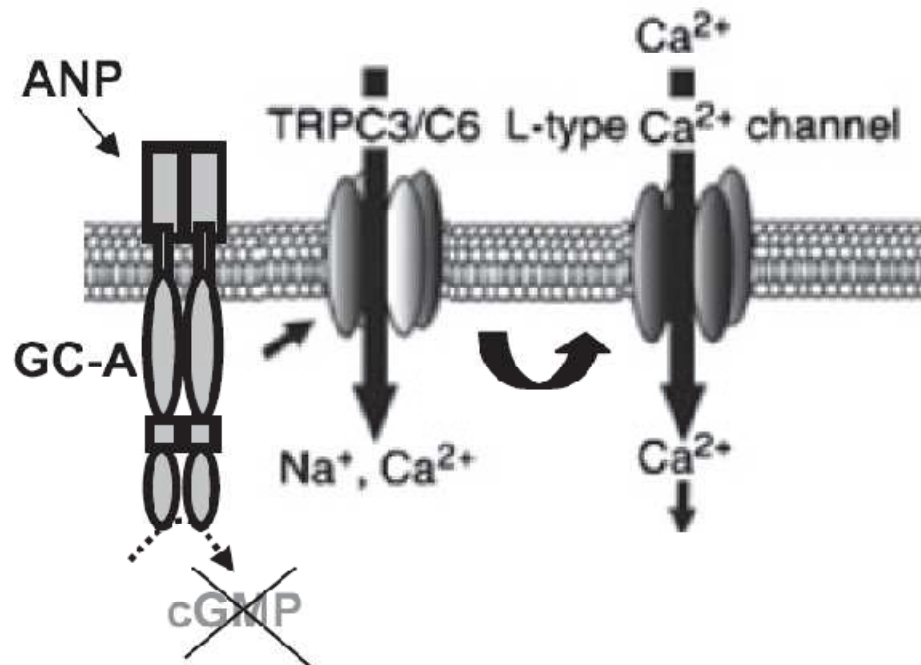


Abb. 4: Schema zum GC-A/TRPC3/C6-vermittelten Ca²⁺-Einstrom in Kardiomyozyten. Quelle: Klaiber 2011, S. 18504.

1.3 Physiologie der β -Zelle

1.3.1 Aufbau der Langerhans-Inseln

Das Pankreas besteht zu ca. 98% aus exokrinem Gewebe, welches Verdauungsenzyme in den Darmtrakt sezerniert. In diesem Gewebe sind die sogenannten Langerhans-Inseln eingebettet. Obwohl die Inseln nur etwa 1-2% des Pankreas-Gewebes ausmachen, ist ihre Funktion für die Energiehomöostase und den Metabolismus essentiell. In einem gesunden menschlichen Pankreas sind ca. 1 Millionen Inseln verteilt. Die Inseln bestehen aus Hormon-produzierenden endokrinen Zellen, die hoch spezialisiert sind. Es gibt mindestens 5 endokrine Zelltypen: die Insulin-produzierenden β -Zellen (70-80% der Inselzellen), die Glukagon-produzierenden α -Zellen (ca. 20% der

Inselzellen), die Somatostatin-produzierenden δ -Zellen (max. 5% der Inselzellen), die Ghrelin-produzierenden ϵ -Zellen und die PP-Zellen (max. 2% der Inselzellen), die das pankreatische Polypeptid bilden und sezernieren (Güney 2009). Die β -Zellen fungieren als Sensor für den Blutzuckerspiegel und setzen bei einem erhöhten Blutglukosewert Insulin frei. Insulin vermittelt die Glukoseaufnahme in den Fettzellen und den Muskelzellen sowie die Glykogensynthese in der Leber. Der Blutzuckerspiegel wird dadurch gesenkt.

Die pankreatischen Langerhans-Inseln werden durch ein dichtes Netzwerk von Kapillaren durchblutet. Die Vaskularisierung ist in den Inseln fünfmal dichter als im exokrinen Gewebe (Henderson 1985). Dadurch wird die Zufuhr von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sowie die schnelle Erfassung des Blutzuckerspiegels gewährleistet.

1.3.2 Die Glukose-stimulierte Insulinsekretion

Unter physiologischen Bedingungen ist der Anstieg des Blutzuckerspiegels (≥ 6 mmol/l) der primäre Stimulus für die Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen (Jensen 2008). Einige Faktoren, wie Aminosäuren (v.a. Arginin), Fettsäuren und Ketonkörper können die Glukose-stimulierte Insulinsekretion verstärken (Straub 2002). Auch einige gastro-intestinale Hormone wie Gastrin, die Inkretinhormone GLP-1 (*glukagon-like peptide-1*) und GIP (*glucose-dependent insulinotropic peptide*) sowie Glukagon, Kortisol und Adrenalin fördern die Insulinsekretion (Ashcroft 1968; Creutzfeldt 2001).

Die Insulinsekretion nimmt bis zu einer Glukosekonzentration von 15 mmol/l stetig zu. Die Glukose-Moleküle gelangen über den Glut2-Transporter insulinunabhängig vom Blut in die β -Zellen (Newgard 1995), wo sie zur Verstoffwechslung in die Glykolyse eingeschleust werden. Das aus der Glykolyse entstandene Endprodukt Pyruvat wird schließlich in die mitochondriale Matrix importiert, in AcetylCoA umgesetzt und in dieser Form in den Zitratzyklus eingeschleust. Dort erzeugte Reduktionsäquivalente, Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH₂) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂), werden in den Komplexen der mitochondrialen Atmungskette zur Sauerstoffreduktion und zum Aufbau eines Protonengradienten

genutzt (Mitchell 1967). Mit dessen Hilfe erfolgt schließlich die Adenosintriphosphat (ATP)-Generierung durch das Enzym ATP-Synthase, so dass der gesteigerte Stoffwechsel der β -Zelle insgesamt zu einem deutlichen Anstieg der Adenosintriphosphatmoleküle bei gleichzeitiger Abnahme von Adenosindiphosphat (ADP) führt. Die veränderte ATP/ADP-Ratio im Zytoplasma führt zur Hemmung des ATP-abhängigen K^+ -Kanals (K_{ATP} -Kanal), was eine Depolarisierung der Zelle zur Folge hat. Durch die Depolarisierung öffnet sich ein spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanal und Kalzium-Ionen strömen ein. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration ist schließlich der Auslöser für die gesteigerte Exozytose von den Insulin-enthaltenen Speichergranula (Jensen 2008). In Abbildung 5 ist der Mechanismus der Insulinsekretion grafisch dargestellt.

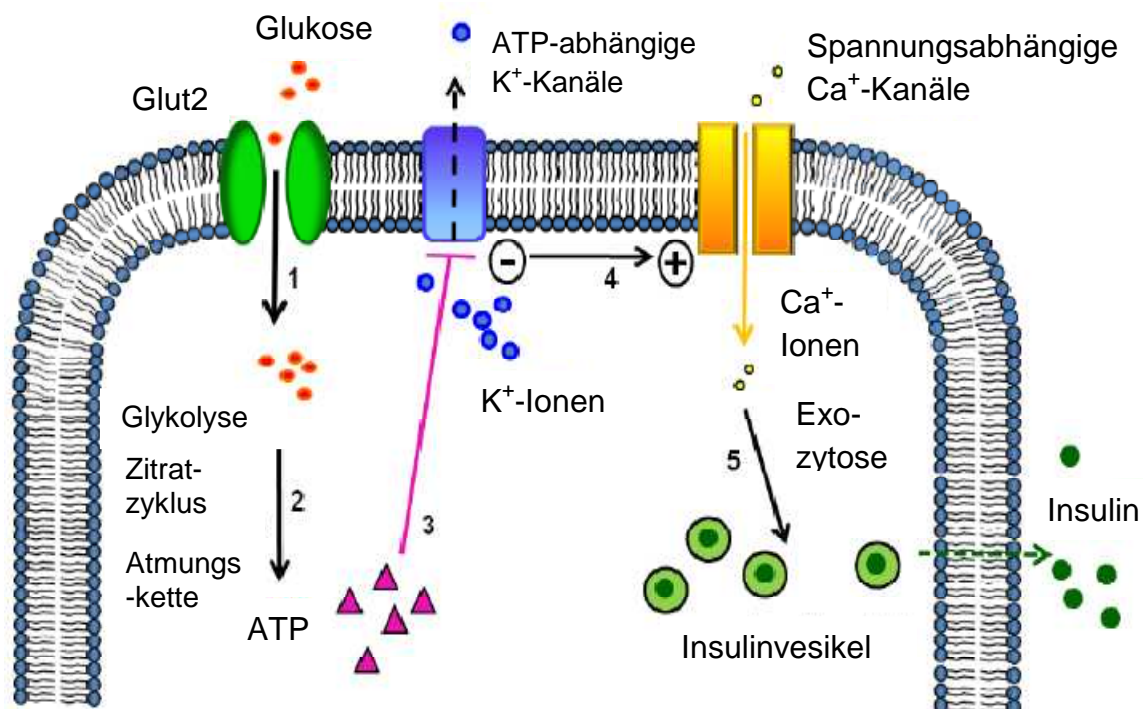


Abb. 5.: Der zelluläre Mechanismus der Glukose-abhängigen Insulinsekretion. Nach Aufnahme der Glukosemoleküle in die β -Zelle über GLUT2-Transporter (1) erfolgt die Verstoffwechslung der Glukose (2). Dadurch kommt es zum Anstieg der ATP-Konzentration im Zytosol. Der Anstieg bewirkt ein Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle (3). Die daraus resultierende Depolarisierung der Plasmamembran führt zur Öffnung spannungsabhängiger Kaliumkanäle (4). Der Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen erhöht die zytosolische Kalziumkonzentration, welche die Exozytose insulinspeichernder Vesikel auslöst (5). Quelle: Puff 2010, S. 3, modifiziert.

Unter physiologischen Bedingungen zeigt die Insulinausschüttung einen biphasischen Verlauf. In der ersten, etwa 10-minütigen Phase findet unmittelbar nach Glukosestimulation eine starke Sekretion gespeicherter Insulinmoleküle statt. Die Sekretion erreicht bereits nach drei bis fünf Minuten ihr Maximum. Die länger anhaltende zweite Phase verläuft auf einem niedrigeren Sekretionsniveau und kann sich bis zum Erreichen eines normoglykämischen Blutzuckerspiegels über eine Dauer von mehreren Stunden erstrecken. Dabei werden nicht nur gespeicherte, sondern vor allem auch neugebildete Insulinmoleküle sezerniert (Rorsman 2003).

1.3.3 Die Rolle von GC-A für die Insulinsekretion

Der GC-A-Rezeptor spielt nicht nur für das kardiovaskuläre System eine Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass GC-A auch für die Insulinsekretion von Bedeutung ist, wenn auch die Ergebnisse sehr kontrovers sind. Im Pankreas wurde GC-A sowohl in β -Zellen als auch in nicht- β -Zellen nachgewiesen (You 2009). Die Arbeitsgruppe von Ropero konnte zeigen, dass der aktivierte GC-A-Rezeptor einen direkten Effekt auf die Regulierung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS) hat (Ropero 1999, 2010). Die GC-A/ANP-vermittelte Bildung von intrazellulärem cGMP führte in isolierten Zellen zur Hemmung der Aktivität des K_{ATP} -Kanals und erhöhte so das Glukose-induzierte Kalzium-Signal. Dadurch war die GSIS verstärkt (Ropero 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals, Sur1 und Kir6.2, in globalen GC-A KO Mäusen vermindert ist (Ropero 2010).

Andere Studien zeigen dagegen, dass ANP nur Langzeitwirkungen auf die Insulinsekretion hat und diese inhibiert. Die Arbeitsgruppe von You und Laychock haben Langerhans-Inseln aus Ratten isoliert und diese entweder für 3 Stunden oder über 7 Tage mit 5.5 mM Glukose und verschiedenen ANP-Konzentrationen stimuliert. Nach 3 Stunden konnte keine Veränderung in der basalen oder Glukose-stimulierten Insulinsekretion festgestellt werden. Nach einer Inkubation über 7 Tage war die Glukose-stimulierte Insulinsekretion inhibiert. Der totale Insulingehalt blieb unverändert. Durch die Langzeitgabe von

ANP kam es zu keiner Glukose-stimulierte Erhöhung des ATP-Levels und damit auch zu keiner Veränderung der ATP/ADP-Ratio. Eine Langzeitinkubation mit ANP führt also zur Hemmung der ATP-Generierung in isolierten Inseln und damit zu einer inhibierten Glukose-stimulierten Insulinsekretion (You 2011).

Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass GC-A eine Bedeutung für die β -Zellproliferation und die Regulierung der β -Zellmasse hat. So reguliert GC-A/ANP die β -Zell-Proliferation positiv über einen PI3K/Akt-Signalweg (You 2011). Die Inseln von globalen GC-A-KO-Mäusen sind zudem kleiner, haben eine niedrigere β -Zellmasse und einen gesenkten Insulingehalt im Vergleich zu Kontrollen (Ropero 2010).

1.3.4 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) ist eine komplexe Regulationsstörung des Stoffwechsels, die durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert ist. Sie entsteht durch eine Fehlfunktion der Insulinfreisetzung und/oder eine verminderte Insulinwirkung. Nach den Leitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft liegt ein Diabetes vor, wenn der Nüchternblutzucker über 7 mmol/l liegt oder wenn zwei Stunden nach oraler Applikation von Glukose (75 g) der Blutzucker bei über 11 mmol/l liegt (Kerner 2004). In der deutschen Bevölkerung liegt die Prävalenz des Diabetes mellitus bei sieben bis acht Prozent (Giani 2004). Besonders problematisch sind die Folgeerkrankungen, die durch die chronische Hyperglykämie entstehen. Es treten häufig diabetische Retinopathien, Nephropathien und Neuropathien auf. Auch eine Makroangiopathie wird durch DM stark begünstigt (Hien 2007). Die Insulininsuffizienz kann durch eine selektive autoimmune Zerstörung der β -Zellen (Typ 1 DM, T1DM) oder durch eine nicht kompensierte periphere Insulinresistenz (Typ 2 DM, T2DM) hervorgerufen werden. Der T2DM ist mit starkem Übergewicht assoziiert.

Der Zustand vor Ausbildung eines DM wird als Prädiabetes bezeichnet. Dieser wird hervorgerufen durch Insulinresistenz, was zur verminderten Aufnahme von Insulin in Hepatozyten, Skelettmuskelzellen und Adipozyten führt. Das Pankreas kompensiert die Insulinresistenz durch erhöhte β -Zellmasse und

erhöhte Insulinsekretion. Die Patienten sind hyperinsulinämisch. Kann die Insulinresistenz nicht kompensiert werden, manifestiert sich die Erkrankung.

1.4 Konventioneller *knock-out* von GC-A mit dem Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System ist ein Verfahren zum gezielten Entfernen von DNA-Sequenzen aus lebenden Organismen (Sauer 1988). Das Enzym Cre (*cyclization recombination*) stammt aus der Bakteriophage P1 und gehört zur Gruppe der Rekombinasen. Diese Enzymklasse katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA. Die Cre-Rekombinase kann die Rekombination zwischen zwei sogenannten loxP-Sequenzen (*locus of X-over of P1*) katalysieren, wenn diese Erkennungssequenzen gleichgerichtet liegen und ein DNA-Segment flankieren. Der DNA-Bereich wird auch als „gefloxt“ bezeichnet. Die Cre-Rekombinase schneidet den flankierte DNA-Abschnitt aus dem Chromosom und nur eine einzelne loxP-Sequenz bleibt zurück (Abb. 6).

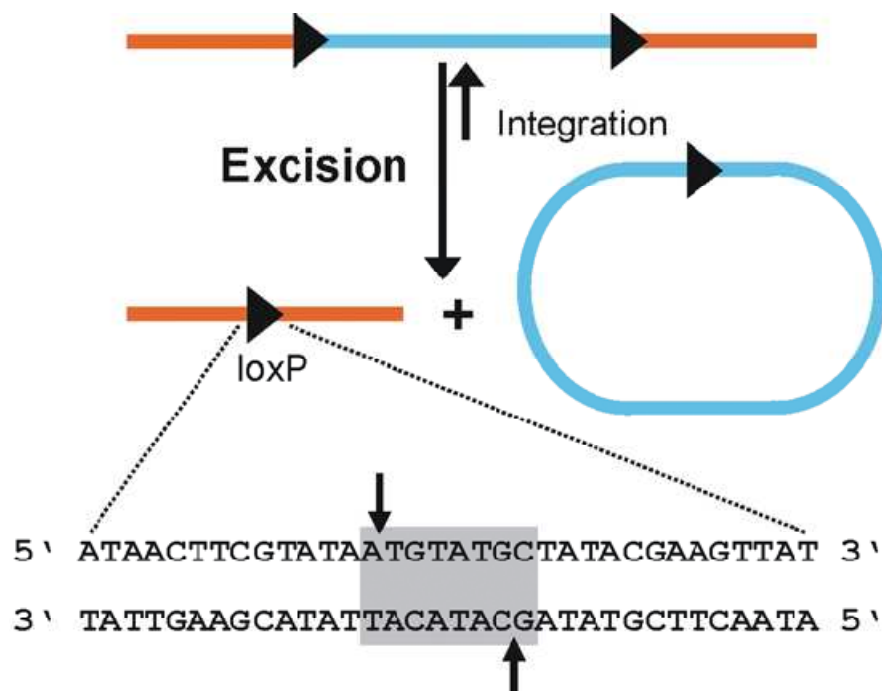


Abb. 6: Cre/loxP-vermitteltes Ausschneiden von DNA. Die Basensequenz der loxP-Erkennungssequenz (schwarzes Dreieck) ist angegeben. Die Pfeile markieren die Schnittstelle. Quelle: Biospektrum 3/05 (11.Jahrgang); S. 289.

Um gewebespezifische *knock-out* (KO)-Mäuse zu generieren, verwendet man meist zwei genetisch veränderte Mauslinien.

Eine Linie exprimiert die Cre-Rekombinase selektiv in bestimmten Zelltypen. Die zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase kann durch die Auswahl eines geeigneten Promoters erreicht werden. Bei der Generierung der β -Zell-spezifischen GC-A-KO-Mäusen wurde z.B. eine Mauslinie verwendet, die vor der DNA-Sequenz für die Cre-Rekombinase einen *rat insulin II*-Promoter (RIP) kodiert. Dieser Promoter wird nur in den β -Zellen exprimiert. Daher findet sich die Kodierung für die Cre-Rekombinase bei diesen Mäusen in allen Zellen wieder, aber die Expression erfolgt ausschließlich in den β -Zellen.

Die zweite benötigte Mauslinie muss in dem Zielgen, welches stillgelegt werden soll, einen loxP-flankierten Genabschnitt enthalten. Dieser sollte so gewählt werden, dass das Zielgen nach Entfernen des loxP-flankierten Abschnittes nicht mehr exprimiert wird. Dazu muss nicht zwangsweise das gesamte Zielgen aus dem Genom entfernt werden. Für die Inaktivierung von GC-A reicht es z.B., wenn der Bereich zwischen Exon 1 und Intron 1 gefloxt ist (Holtwick 2002).

Durch Kreuzung der beiden Mauslinien erhält man gewebespezifische KO-Mäuse, im konkret beschriebenen Fall eine β -Zell-spezifische GC-A-Deletion.

1.5 Wissenschaftliche Fragestellung

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Interaktion zwischen GC-A und TRPC3/C6. Es ist bereits bekannt, dass ANP über GC-A den TRPC-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in Kardiomyozyten auf cGMP-unabhängige Weise stimuliert. Nun sollte geklärt werden, ob die Stimulation von TRPC3/C6 durch eine direkte Interaktion mit GC-A erfolgt, oder ob dazwischen ein Mediator agiert. Aus physiologischer und pathophysiologischer Sicht ist es sehr wichtig, diesen neuen Mechanismus genau zu untersuchen. Schließlich liegt eine GC-A Desensibilisierung oft bei Bluthochdruckpatienten oder bei Patienten mit Herzhypertrophie vor (Kuhn 2004, 2009). Mit den neuen Erkenntnissen kann zukünftig besser auf das Krankheitsbild eingegangen

werden. Für die Fragestellung wurden Ko-Immünpräzipitationen und FRET-Experimente durchgeführt.

Für den zweiten Teil der Arbeit wurden β -Zell-spezifische GC-A-KO-Mäuse generiert, um die (patho)physiologische Rolle des GC-A/NP Systems für den Glukosehaushalt *in vivo* zu untersuchen. Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass ANP die Proliferation von β -Zellen, die Insulinsekretion und die Durchblutung des endokrinen Pankreas stimuliert. Ob diese Effekte auch für die systemische Glukose-Homöostase eine Rolle spielen, ist allerdings noch unbekannt. Mit dem neuen Mausmodell sollte dieser Frage auf dem Grund gegangen werden. Es sollte geklärt werden, ob ANP Effekte auf die Proliferation der β -Zellen bzw. auf die Insulinsekretion ausübt und ob das GC-A/ANP-System eine Bedeutung für die Entwicklung des Prädiabetes hat. Daher wurden die konditionellen KO-Mäuse fettreich ernährt und anschließend wurden die Inseln morphometrisch analysiert.

Die Fragestellungen bzw. Aufgaben, die im Rahmen dieser Doktorarbeit bearbeitet wurden, kann man wie folgt zusammenfassen:

1. Klärung der Frage, ob eine direkte Interaktion von TRPC3/C6 mit GC-A erfolgt oder ob ein Mediator benötigt wird.
2. Generierung eines neuen Mausmodells (β -Zell-GC-A-KO-Mäuse), welches sich besser zur *in vivo*-Analyse der Bedeutung von GC-A für die Insulinhomöostase eignet als die bisherigen Mausmodelle.
3. Charakterisierung der β -Zell-GC-A-KO-Mäuse.
4. Erste Untersuchungen mit den β -Zell-GC-A-KO-Mäusen zur Bedeutung von GC-A für den Insulinhaushalt unter pathophysiologischen Bedingungen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die meisten verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von Sigma oder Merck bezogen. Davon abweichende Reagenzien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Des Weiteren wurden laborübliche Verbrauchsmaterialien und laborübliche Gerätschaften verwendet. Besondere Geräte sind in den entsprechenden Abschnitten mit Herstellerangaben beschrieben.

Tabelle 1: Chemikalienliste mit Herstellern

Chemikalienname	Hersteller
8-Br-cGMP	Biolog
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat APS	Amresco
ANP	Bachem
Bacto tryptone	BDH
BC Assay Reagent A	Uptima
Bromophenol Blue Sodium Salt	Fluka
BSA Type A1	Gerbu
Cyt-CF	nanoTools
DMEM	LifeTechn.
ECL Western Blotting Substrate	Pierce
Kaliumacetat	Fluka
PhosphoStop Tabletten	Roche
Polyacrylamide	BDH
Protease-Inhibitor Complete Mini	Roche
RMPI 1640 Medium	Gibco
Sodium dodecyl sulfate	Fluka
Trypsin 2,5%	Gibco
Xylene Cyanole FF	Roth

2.1.2 Antikörper

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Primär-Antikörper

Antikörper-Bezeichnung	Bezugsquelle	Eingesetzte Verdünnung	Herkunft
Anti-Flag M2 Monoclonal Antibody (α Flag)	Sigma	1:1.000	Kaninchen
Anti-Guanylyl-Cyclase-A (α GC-A)	AG Kuhn	1:500	Kaninchen
Anti-HA	Covance	1:250	Maus
Anti-TRPC3	Alomone Labs	1:250	Kaninchen
Anti-TRPC6	Alomone Labs	1:250	Kaninchen
Anti-TRPC4	Veit Flockerzi (Exp. u. Klin. Pharmakologie, Universität des Saarlandes, Homburg)	1:250	Kaninchen
Anti-TRPC5	Veit Flockerzi (Exp. u. Klin. Pharmakologie, Universität des Saarlandes, Homburg)	1:250	Kaninchen
Anti-GAPDH Monoclonal Antibody, Clone 14C10	Cell Signaling	1:10.000	Kaninchen

Tabelle 3: Sekundär-Antikörper

Antikörper-Bezeichnung	Bezugsquelle	Eingesetzte Verdünnung
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	1:10.000
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	1:10.000

2.1.3 Zelllinien

Die HEK293-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Viacheslav Nikolaev, Universitätsmedizin Göttingen, Abt. Kardiologie und Pneumologie, zur Verfügung gestellt. Langerhans-Inseln wurden immer frisch isoliert und für maximal 24 Stunden kultiviert. Alle Zellen wurden bei 37°C in Wasserdampf-gesättigter 5%iger (v/v) CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.1.4 Größenmarker

Zur Größenbestimmung von Proteinen wurde der „EZ-Run Prestained Rec Protein Ladder“-Mix von Fisher BioReagents eingesetzt. Für die Bestimmung der DNA-Länge in Agarose-Gelen wurde der „DNA Ladder mix“ von GeneRuler verwendet.

2.1.5 Plasmide

Eine Auflistung der verwendeten Plasmide und eine kurze Beschreibung der bekannten Eigenschaften ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Plasmide

Bezeichnung	Bezugsquelle	Eigenschaften
Flag-GCA	AG Kuhn	Wildtyp-GC-A aus Ratte mit pcmv5-Rückgrat und Flag-Anhang am 5'-Ende
Flag-GC-A $_{\Delta 863-1057}$	AG Kuhn	GC-A mit fehlender Kodierung für Cyclase-Domäne, aus Ratte mit pcmv5-Rückgrat und Flag-Anhang am 5'-Ende
Flag-GC-A $_{D893A}$	AG Kuhn	GC-A mit inaktiver Cyclase-Domäne, aus Ratte mit pcmv5-Rückgrat und Flag-Anhang am 5'-Ende
TRPC3	Veit Flockerzi (Exp. u. Klin. Pharmakologie, Universität Homburg)	
TRPC6	Veit Flockerzi (Exp. u. Klin. Pharmakologie, Universität Homburg)	
TRPC3-YFP	AG Kuhn	TRPC3-Codierung mit YFP-Anhang am 3'-Ende
GC-A-CFP	AG Kuhn	Wildtyp-GC-A aus Ratte mit pcmv5-Rückgrat und CFP-Anhang am 3'-Ende
GC-A $_{\Delta 863-1057}$ -CFP	AG Kuhn	GC-A mit fehlender Kodierung für Cyclase-Domäne, aus Ratte mit pcmv5-Rückgrat und CFP-Anhang am 3'-Ende

2.1.6 Mauslinien

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen TRPC3/C6 und GC-A wurden transgene Mäuse der „FLAG-HA-TEV-GC-A-aMyHC-Kolonie“ verwendet. In diesem Mausmodell kommt es zur Überexpression von HA-GC-A in den Kardiomyozyten. Die Mauslinie wurden von der AG Kuhn bereitgestellt (Klaiber 2011).

Um die Bedeutung des ANP/GC-A-Systems für die Insulin-Homöostase näher zu untersuchen, wurden β -Zell-spezifische GC-A-*knock-out* (β -Zell-GC-A-KO)-Mäuse gezüchtet. Dazu wurden *rat insulin II promoter* (RIP)-Cre Mäuse aus der Herrera-Linie von Matthew Poy, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase ausschließlich in den Insulin-produzierenden pankreatischen β -Zellen (Herrera 2000). Die RIP-Cre^{+/+}-Mäuse wurden mit flox/flox-GC-A-Mäusen verpaart, welche von der AG Kuhn bereitgestellt wurden (Holtwick 2002). Die Nachkommen (F1-Generation) wurden mittels Schwanzspitzenbiopsie und PCR auf die Präsenz des Cre-Transgens untersucht. So wurden heterozygote gefloxt GC-A Mäuse mit und ohne RIP-Cre-Transgen generiert. Die Mäuse der F1-Generation wurden entsprechend weiterverpaart. Dadurch standen flox/flox-GC-A-Kontrolltiere und konditionelle KO-Tiere aus einer Familie zur Verfügung.

Als Negativkontrolle wurden gelegentlich Mäuse mit einer globalen GC-A-Deletion (GC-A -/- Mäuse) verwendet. Diese Mauslinie wurde ebenfalls von der AG Kuhn zur Verfügung gestellt (Skryabin 2004).

2.1.7 Tierfutter

Die Versuchstiere erhielten Futter mit einem Fettanteil von 15% (z.B. Altromin, Artikel C1090). Für die *high fat diet* wurde ein spezielles Pellet mit 60% Fettanteil verwendet (Altromin, Artikel C1090-60 Obesitas-induzierende Diät mit w/60% Energie aus Fett). Abgesehen von der Phase, in der orale Glukosetoleranztests bzw. basale Glukosemessungen durchgeführt wurden, stand den Versuchstieren stets das Futter *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von genomischer DNA aus Langerhans-Inseln und aus Gewebe

Zur Isolation der DNA aus Gewebe und aus den Langerhans-Inseln wurde die Chloroform/Phenol-Extraktionsmethode verwendet. Dazu wurden ca. 30 mg des jeweiligen Gewebes mit dem Skalpell zerkleinert und mit 500 µl Verdau-Puffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,1% SDS, 200 mM NaCl) zuzüglich 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Alternativ wurden ca. 300 Inseln zu dem Puffer gegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 56°C unter permanenten Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde zu jedem Ansatz 500 µl eines Phenol-Chloroform-Gemisches (1:1) dazugegeben und gevortext. Die Ansätze wurden darauf bei 10.000g für 5 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die gefällte DNA wurde bei 10.000g für 5 min bei RT zentrifugiert und das Isopropanol wurde vorsichtig entfernt. Das verbleibende Pellet wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 10.000g bei RT zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Schließlich wurde das Pellet bei 37°C unter Schütteln getrocknet. Das Pellet wurde in Wasser resuspendiert (15 µl Wasser für Insel-DNA bzw. 50 µl für Gewebe-DNA) und über Nacht bei 4°C zum vollständigen Lösen der DNA inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Messung der DNA-Konzentration und evtl. die Verdünnung der DNA.

2.2.2 DNA-Amplifizierung mittels PCR

Zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten wurde die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde für einen 20 µl Standard-Reaktionsansatz 300 ng Ziel-DNA eingesetzt, weiterhin 20 pmol der entsprechenden Primer, 4 nmol dNTP-Mix, 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Invitrogen), 2 µl 10x Reaktionspuffer (Invitrogen) und 0,8 µl 50 mM MgCl₂ (Invitrogen).

In Tabelle 5 sind alle verwendeten Primer aufgelistet. Die Position der Primer, die an dem Gen für gefloxt GC-A anliegen, sind in Abb. 7 schematisch dargestellt. Die Tabellen 6 bis 8 beinhalten die jeweiligen Zyklerprogramme für die entsprechenden Primerpaare.

Tabelle 5: Auflistung der Primer für PCR-Experimente

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
MK115	tcc tgt ctc ccg tga cct tcc	Flox PCR fw
MK116	atc aga gaa taa cca gcc aga g	flox/KO PCR rv
MK117	gca tgt agt ttg tag tct cat ac	KO PCR fw
Cre800	gct gcc acg acc aag tga cag caa tg	Cre PCR fw
Cre1200	gta gtt att cgg atc atc agc tac ac	Cre PCR rv

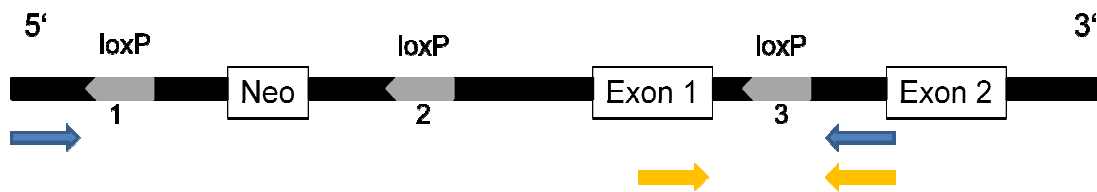


Abb. 7: Primerposition von MK115/MK116 (orange) und MK117/MK116 (blau) auf dem gefloxten GC-A Gen

Tabelle 6: Zyklerprogramm für die „Flox“ PCR (Primer MK115/MK116)

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	2 min	1
PCR	94°C	30 s	35
	58°C	30 s	
	72°C	1 min	
Vervollständigung	72°C	3 min	1
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 7: Zyklerprogramm für die „KO“ PCR (Primer MK117/MK116)

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	3 min	1
PCR	94°C	15 s	40
	56°C	15 s	
	72°C	45 s	
Vervollständigung	72°C	7 min	1
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 8: Zyklusprogramm für die „Cre“ PCR (Primer Cre800/Cre1200)

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	2 min	1
PCR	94°C	30 s	35
	63°C	30 s	
	72°C	1 min	
Vervollständigung	72°C	3 min	1
Kühlung	4°C	∞	

2.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden in 2%igen Agarose-Gelen (w/v) elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur späteren DNA-Färbung mit 50 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Agarose-Lösung wurde in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und auf das auspolymerisierte Agarosegel aufgetragen. Das Ethidiumbromid lagert sich als Interkalator zwischen die Basenpaare und durch UV-Bestrahlung (302 nm) kann die DNA sichtbar gemacht werden. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 1 Stunde. Als Größenstandard wurde der DNA-Ladder-Mix von GeneRuler eingesetzt. Die Dokumentation wurde mit dem Gel Logic 100 Imaging System von Kodak durchgeführt.

50 x TAE

2 M Tris

0,25 M NaOAc

50 mM EDTA

6x DNA-Auftrags- Puffer

0,25% Bromphenolblau (w/v)

0,25% Xylencyanol (w/v)

50% Glycerin (v/v)

2% 50x TAE (v/v)

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde eine geeignete Menge der Lösung mit Wasser verdünnt und in eine Quartzküvette gegeben. Mit dem Spektralphotometer SmartSpec3000 von BioRad wurde anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Extinktion des Lösungs- bzw. Verdünnungsmittels wurde als Leerwert abgezogen.

Für die Konzentrationsberechnung von Nukleinsäurelösungen wird angenommen, dass bei einer OD von 260 nm eine Extinktionseinheit 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht (Cryer 1975).

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Transiente Plasmidtransfektion

Zur transienten Plasmidtransfektion in HEK293-Zellen wurde das FuGENE 6 Transfection Reagent von Roche verwendet. Die Zellen wurden auf 10 cm-Schalen ausplattiert und bei Erreichen von ca. 50% Konfluenz mit insgesamt 6 µg Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll transfiziert. Nach 2 Tagen erfolgte die Weiterbehandlung der Zellen bzw. die Zellyse.

2.3.2 Isolation und Kultivierung muriner Langerhans-Inseln

Zur Isolation von murinen Langerhans-Inseln wurden die Mäuse zunächst mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran betäubt. Danach wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt. Mit Hilfe einer Schere wurde das Fell der Maus vom Abdomen gelöst. Nach einer Desinfizierung mit 70%igem Ethanol wurde die Bauchdecke der Maus bis zur Brust geöffnet. Die folgenden Schritte wurden unter einem Binokular durchgeführt. Die Leberlappen wurden cranial umgeklappt und mit Zellstoff fixiert. Darauf wurde der freigewordene Gallenzugang an der Darmmündung mit einem chirurgischen Faden abgebunden. Um den Gallengang am Leberausgang wurde ein loser Knoten mit chirurgischem Faden vorgelegt. Oberhalb des Knotens wurde vorsichtig ein

Loch in den Gallengang geschnitten und eine Injektionskanüle (30G x ½) eingeführt. Die Kanüle wurde durch Festziehen des losen Knotens fixiert. Über die Kanüle konnte nun mit einer Spritze ca. 2 ml Kollagenase-Lösung (Collagenase P von Roche, 2 mg/ml) durch den Gallengang in das Pankreas injiziert werden. Das Pankreas wurde darauf vollständig entnommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Verdauung wurde unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad für 6 min bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden 10 ml eiskalter Isolationspuffer (135 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 1,28 mM CaCl₂, 2% BSA, 10 mM d-Glucose, + Pen/Strep, pH 7.4) in das Röhrchen gegeben, um die Verdauung zu stoppen. Die Lösung wurde mit einer Pipette resuspendiert und bei 1.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Pellet erneut in 10 ml Puffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde mindestens 3x wiederholt. Die Suspension wurde schließlich in ein Becherglas überführt und mit Isolationspuffer auf ca. 50 ml aufgefüllt.

Zum Isolieren der Inseln wurden jeweils 10 ml Suspension in eine Petrischale überführt. Die Petrischale wurde auf einem schwarzen Untergrund gelegt. Unter dem Binokular wurden schließlich die schneeweißen Inseln detektiert und vorsichtig mit einer Pipette aufgezogen und in eine frische Petrischale mit Isolationspuffer überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis kein exokrines Gewebe in der Petrischale vorhanden war.

Zur Kultivierung wurden die Inseln in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap gesammelt und bei 300g kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Inseln wurden vorsichtig mit 1 ml RPMI 1640-Medium (von Gibco, + 10% FCS + Pen/Strep) aufgewirbelt und in eine mit Medium gefüllte Petrischale überführt. Die Inkubation erfolgte für einige Stunden oder über Nacht im Brutschrank bei 37°C. Spätestens am Folgetag wurden Experimente mit den Inseln durchgeführt. Eine Kultivierung über einen längeren Zeitraum ist nicht zu empfehlen, da die Zellen schnell eingehen.

2.3.3 FRET-Analysen an HEK293-Zellen

Zur Bestimmung des Abstandes von zwei membrangängigen Proteinen wurde das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) angewendet. Beim FRET wird die Energie eines angeregten Farbstoffes, dem Donor, auf einen zweiten Farbstoff, dem Akzeptor, übertragen. Die Strahlungsintensität des nun angeregten Akzeptors ist ein Maß für den Energietransfer, denn der Energieaustausch erfolgt strahlungsfrei (Förster 1948). Als ein gängiges Donor/Akzeptor-Paar werden häufig die fluoreszierenden Proteine *Cyan*-fluoreszierendes-Protein (CFP) als Donor und *Yellow*-fluoreszierendes-Protein (YFP) als Akzeptor verwendet. Da die Energieübertragung von dem Abstand und von der Orientierung der Chromophore zueinander abhängt, kann die Methode Auskunft über die Nähe der Fluoreszenzfarbstoffe geben. FRET kann nur in einem Bereich von bis zu 10 nm beobachtet werden (Stryer 1978).

Alle FRET-Messungen wurden an dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg, unter Anleitung von Dr. Viacheslav Nikolaev durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur, 48 Stunden nach der Transfektion der HEK293-Zellen, mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop und einem Öl-Immersion-Plan-Neofluar 63x Objektiv. Die Anregung erfolgte alle 5 s bei 436 ± 10 nm. Die Fluoreszenzen wurden von einzelnen Zellen im YFP- bzw. CFP-Emissionskanal mit einem 535 ± 15 nm bzw. 480 ± 20 nm Emissionsfilter gemessen. Das FRET-Signal wurde als Emissionsverhältnis YFP:CFP dargestellt.

2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten aus HEK293-Zellen und deren Zellfraktionierung

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurde pro 10 cm-Schale HEK293-Zellen 1 ml des Lysispuffers (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM Na_3VO_4 , Protease-Inhibitor Complete Mini von Roche) auf die Zellen gegeben. Nach

einer Inkubationszeit von ca. 10 min wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml-Cap überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10.000g, 5 min, 4°C) und die anschließende Abnahme des Überstandes mit den gelösten Proteinen.

Für die Zellfraktionierung wurde pro 10 cm-Schale HEK293-Zellen 1 ml von dem Cyt-CF Puffer (Nanotools) auf die Zellen gegeben. Dem Puffer wurde zuvor eine Protease-Inhibitor Complete Mini Tablette (Roche) zugegeben. Die Zellen wurden vorsichtig abgeschabt und in ein 1,5 ml-Cap überführt. Es folgten 10 min Inkubation bei RT, wobei die Suspension mehrmals aufgewirbelt wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt (1.000g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und als Cytosolfraktion aufbewahrt und aliquotiert. Das Pellet wurde in 250 µl Lysispuffer (s.o.) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Auch bei dieser Inkubation erfolgte eine regelmäßige Aufwirbelung des Lysates. Nach einer weiteren Zentrifugation (2.000g, 10 min, 4°C) der Caps wurde der Überstand abgenommen und als Membranfraktion aufbewahrt und aliquotiert. Das Pellet mit der Kernfraktion wurde nicht weiter benötigt und verworfen.

2.4.2 Proteinextraktion aus Gewebeproben und Langerhans-Inseln

Die frischisolierten Gewebe wurden in ein Turrax-Röhrchen mit 2 ml Lysispuffer (siehe 2.4.1) gegeben. Das Gewebe wurde mit dem Ultra-Turrax Stab PT3100 von Polytron zerkleinert (10.500rpm) und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000g für 10 min bei 4°C. Das Lysat in der Mitte des Röhrchens wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Cap überführt.

Zur Proteinextraktion aus Langerhans-Inseln wurden 400-500 Inseln gesammelt und in 50 µl SDS-NaHCO₃-Puffer resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde für die Western-Blot Analyse verwendet.

SDS-NaHCO₃-Puffer:
1 Teil NaHCO₃ (10 mM)
2 Teile SDS (20%)

2.4.3 Ko-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient eigentlich der Konzentrierung von Proteinen. Dabei wird ein Bestandteil des Proteins, das Antigen, mittels eines Antikörpers detektiert und aus einer Lösung konzentriert. Der Antikörper ist dabei an ein festes Substrat, wie z.B. Sepharosekügelchen, gekoppelt. Da das Protein mitsamt seiner Interaktionspartner aus der Lösung präzipitiert wird (Ko-IP), können mit der Methode Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden.

Für die Immunpräzipitation wurden M2-Agarose-Beads (Sigma A2220) oder HA-Agarose-Beads (Sigma A2095) verwendet. Die Beads wurden nach Herstellerangaben mit PBS gewaschen und mit BSA abgesättigt. Zu 40 µl Beads wurde 200 µl Zelllysate gegeben und unter Rotation für 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine Micro-Bio-Spin-Chromatografie-Säule (Biorad 7326204) geladen und bei minimaler Drehzahl zentrifugiert. Der Durchfluss wurde als „Unbound“-Fraktion aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit 500 µl Lysispuffer wurde der Säulenausgang gut verschlossen und 100 µl erwärmtes Laemmli auf die Beads gegeben. Nach 5 min Inkubation wurde der Säulenausgang wieder geöffnet und die Säule zentrifugiert (10.000g, 30 s). Das Eluat wurde aufgefangen und für spätere Westernblot-Analysen verwendet.

5x Laemmli-Puffer (10 ml)

100 mg Bromphenolblau
3,5 ml Glycerin
1,5 g SDS
3,2 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8
2,5 ml Mercapto-Ethanol

2.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Assay verwendet, der darauf basiert, dass Proteine in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren (Biuret-Reaktion). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 3 µl Zell- oder Gewebelysate mit 300 µl BCA Reagenz (Reagenz A von Uptima : 4%iges $\text{CuSO}_4 = 50 : 1$) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. BSA-Standards und

Puffer für die Leerwertbestimmung wurden dabei stets mitgeführt. Anschließend erfolgte die Messung der Proben mit einem Photometer bei einer Absorption von 562 nm.

2.4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Denaturierung wurden die Proteinproben mit Laemmlipuffer versetzt (siehe 2.4.3) und entweder für 10 min bei 72°C oder für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 50 V, anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Der Vorgang wurde beendet, wenn eine ausreichende Trennung der gewünschten Proteine erreicht war.

Sammelgel (5%):

17% (v/v) Acrylamid-Stammlösung
120 mM Tris/HCl, pH 6,8
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) APS
0,1% (v/v) TEMED

Trenngel (10%):

27% (v/v) Acrylamid-Stammlösung
250 mM Tris/HCl, pH 8,8
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) APS
0,06% (v/v) TEMED

Laufpuffer:

25 mM Tris
200 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

2.4.6 Western- und Immunoblot

Unmittelbar nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel im „semi-dry“ Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Proteine wurden dabei mit 2,5 mA/cm² für 60 min auf die Membran übertragen.

Zur Überprüfung des Transfers wurden membrangebundene Proteine mit einer 0,2%igen Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt und detektiert. Die Membran wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Wasser und TBST entfärbt.

Anschließend wurde die Membran für 1-2 h mit 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST bei Raumtemperatur blockiert. Es folgte das Waschen der Membran für 3x 5 min mit TBST. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung in TBST bei 4°C über Nacht durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde die Membran 6x 5 min mit TBST bei Raumtemperatur gewaschen. Der Zweit-Antikörper wurde für 1 h mit einer Verdünnung von 1:10.000 in TBST bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff von 6x 5 min mit TBST bei Raumtemperatur erfolgte die Detektion der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper durch Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Membran 2 min mit ECL-Lösung inkubiert. Abschließend wurde das FluorChem SP Detektions-System von Alpha Innotech verwendet.

Transferpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

20% (v/v) Methanol

TBST

10 mM Tris pH 8.0

150 mM NaCl

0.05% Tween 20

2.4.7 cGMP-Radioimmunassay (cGMP-RIA) mit Langerhans-Inseln

Zur Bestimmung des cGMP-Gehalts von stimulierten und nicht-stimulierten Langerhans-Inseln, wurde ein cGMP-Radioimmunassay (RIA) verwendet. Bei dieser Methode wird ein radioaktiv-markiertes cGMP-Analogon („Tracer“) mit einem spezifischen Antiserum immunologisch präzipitiert. Die Inkubation mit dem Antiserum führt zu einem Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem

Tracer. Dieses Gleichgewicht wird durch die Menge von nicht-markiertem cGMP beeinflusst, da das nicht-markierte cGMP um freie Bindungsstellen konkurriert. Es wird also weniger Tracer präzipitiert, je mehr unmarkiertes cGMP vorhanden ist. Der hier verwendete Tracer wurde von Hartmann Analytic erworben. Nach einer Proteinfällung und Dekantierung des Überstandes kann die im Präzipitat befindliche Menge an gebundenem Tracer durch Messung der Radioaktivität ermittelt werden. Über eine Standardkurve mit einer definierten Menge an unmarkiertem cGMP kann auch der cGMP-Gehalt einer unbekannt Probe bestimmt werden.

Um den cGMP-Gehalt von stimulierten Inseln zu ermitteln, wurden die Inseln wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben isoliert und in einer mit Inkubationsmedium (RPMI 1640 + 1% FCS) gefüllte 3,5 cm-Petrischale überführt. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden im Brutschrank. Anschließend wurde für 30 Minuten der Phosphodiesterase (PDE)-Hemmer IBMX (Endkonzentration 0,5 mM) hinzugefügt. Dadurch soll der Abbau von cGMP durch PDE's verhindert werden. Jeweils 35 Inseln wurden danach mit 50 µl Medium auf eine Pipette aufgezogen und in eine 96-Lochplatte überführt. Zu den Inseln wurde entweder 5 µl PBS oder 5 µl ANP (Endkonzentration 10^{-6} M) zugegeben und für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Stimulation mit 165 µl eiskaltem 100%igem Ethanol (Endkonzentration 75%). Die 96-Lochplatte wurde über Nacht bei -80°C eingefroren.

Am Folgetag wurde das Ethanol im Wasserbad bei 56°C abgedampft und das Pellet in 70 µl RIA-Puffer (50 mM Na-Acetat, pH 6.0) resuspendiert. Der RIA wurde freundlicherweise von Birgit Gaßner, Physiologie I, Universität Würzburg, durchgeführt.

2.4.8 Insulin-Radioimmunassay zur Messung der Insulin-Sekretion

Zur Bestimmung der Insulin-Sekretion von Langerhans-Inseln wurden die Inseln wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben isoliert und am Folgetag in Sekretionsmedium (122 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 2,5 mM CaCl_2 , 0,5% BSA, 3 mM Glucose, pH 7.4) umpipettiert. Die Inseln

wurden für 2 Stunden in dem Sekretionsmedium inkubiert. Anschließend wurden jeweils 20 Inseln mit 50 µl Medium in eine 24-Loch-Platte überführt. Zu den Inseln wurde jeweils 1,5 ml Sekretionsmedium mit zusätzlich ANP 10^{-9} M sowie 6 mM Glucose anstatt 3 mM Glucose zugefügt. Alternativ wurde Sekretionsmedium mit zusätzlich ANP 10^{-9} M sowie 16 mM Glucose verwendet. Die Inkubation mit dieser Stimulus-Lösung erfolgte für 15 Minuten im Brutschrank. Am Ende der Inkubation wurden 400 µl des Mediums abgenommen und in ein Glasröhrchen überführt. Dieses Glasröhrchen wurde bei -20°C aufbewahrt, bis der Insulin-Radioimmunoassay (RIA) durchgeführt wurde. Zur Bestimmung des Insulingehalts in dem Zellkulturmedium wurde das Rat Insulin RIA Kit (Cat. #RI-13K) von Millipore nach Herstellerangaben verwendet.

2.5 Tiermodell

2.5.1 Blutdruckmessungen

Zur Messung des murinen Blutdrucks wurde die nicht-invasive Schwanzplethysmographie angewendet. Hierbei wurde die Maus in einer Röhre fixiert und auf eine Heizplatte (THC-31 von Softron) gesetzt. Um den Schwanz der Maus wurde eine Blutdruckmanschette angelegt und jede Minute wurde der Blutdruck mit dem Indirect Blood Pressure Meter BP-98A von Softron dokumentiert. Die Messung erfolgte über maximal 15 Minuten und wurde über eine Woche immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt.

2.5.2 Blutzuckerbestimmung und oraler Glukosetoleranztest (oGTT)

Zur basalen Blutzuckerbestimmung wurden die Tiere über Nacht für 14 h gefastet. Dabei stand den Tieren frisches Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Am nächsten Morgen wurde der Schwanz der Maus mit 70% Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde vorsichtig mit dem Skalpell die Schwanzvene der Maus angeritzt und evtl. der Schwanz massiert, bis ein Tropfen Blut ausgetreten ist. Der Blutzuckergehalt in diesem Tropfen wurde mit dem AccuCheck-Mobile

Glucometer von Roche gemessen. Anschließend wurde den Tieren wieder Futter *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

Mit dem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) kann die Blutglukose-Regulierungsfähigkeit des Körpers bestimmt und eine gestörte Glukoseverwertung erkannt werden. Dazu wird in Wasser gelöste Glukose verabreicht, was zu einem steilen Anstieg der Blutzuckerkonzentration führt. Das Pankreas reguliert den Blutzuckerspiegel durch Freisetzung von Insulin, welches blutzuckersenkende Reaktionen in der Leber, dem Muskel und im Fettgewebe stimuliert. Nach zwei Stunden sollte der Blutzuckerspiegel wieder im Normbereich liegen.

Während des oGTT wird der Blutzuckerspiegel zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Der Nüchternblutzuckerwert, der Maximalwert und der Blutzuckerspiegel am Ende des oGTT erlauben diagnostische Aussagen. So kann bei Nichterreichen des Nüchternblutzuckerwertes nach einer definierten Zeit auf eine Insulinresistenz bzw. auf eine verminderte Insulinsekretionsfähigkeit geschlossen werden.

Zur Durchführung des oGTT wurden die ausgewählten Mäuse über Nacht für 14 Stunden gefastet. Am nächsten Morgen wurde eine 20%ige Glukose-Lösung in destilliertem Wasser vorbereitet. Die Mäuse wurden gewogen und der basale Blutzuckerspiegel wurde wie oben beschrieben mit dem AkkuChek-Mobile Glucometer von Roche bestimmt. Den Mäusen wurde nun 10 µl Glukoselösung pro Gramm Körpergewicht oral mit einer Knopfkanüle verabreicht. Dies entspricht einer Gabe von 2 mg Glukose pro 1 g Körpergewicht. Der Blutzuckerspiegel wurde erneut nach 15, 30, 60 und 90 Minuten gemessen.

2.5.3 Morphometrische Analysen an Langerhans-Inseln

Zur Untersuchung der morphometrischen Eigenschaften der Langerhans-Inseln aus den Tieren der *high fat diet*-Studie, wurde das Pankreas aus jeweils sechs Kontroll- und KO-Mäusen entnommen und in Formalin eingelegt. Die Pankreata wurden für die Immunfluoreszenzfärbungen zu Rebecca Wagner, Toxikologie, Universität Tübingen geschickt. Frau Wagner hat freundlicherweise Gewebeschnitte angefertigt und eine Doppelfärbung von Glukagon und Insulin

durchgeführt. Die Langerhans-Inseln wurden von ihr gezählt und unter dem Mikroskop in 200facher Vergrößerung dokumentiert. Die resultierenden Aufnahmen wurden mit dem Programm GIMP 2.6 ausgewertet. Für jede Insel wurde die Anzahl und die Fläche der α - und β -Zellen sowie die Gesamtfläche der Insel bestimmt.

2.6 Computeranalyse/Statistik

Zur Auswertung der Bandenintensität der Westernblots wurde das mitgelieferte Programm des FluorChem SP Detektions-System von Alpha Innotech verwendet. Dabei wird die zu untersuchende Bande markiert und das Programm ermittelt den *integrated density value* (IDV).

Für die Berechnung von Summen, Mittelwerten, Standardabweichungen und statistischen Differenzen wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Statistik-Berechnungen fanden unter Anwendung des zweiseitigen, ungepaarten Student'schen t-Tests statt. Für die Wahrscheinlichkeitsberechnung im Tiermodell wurde dieser unter der Annahme verschiedener Varianzen ermittelt. Generell wurde ein Unterschied als signifikant definiert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p einen Wert kleiner als 0,05 ergab.

Alle angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Standardabweichungen (SD) als Strich-Markierungen über die Balken bzw. über die Kurven eingezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der dynamischen Interaktion des GC-A-Rezeptors mit TRPC3/C6-Kanälen

3.1.1 Ko-Immunitprazipitation von TRPC3/C6 mit GC-A in HEK293-Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen direkten Interaktion von GC-A mit TRPC3/C6 wurden Ko-Immunitprazipitations-(Ko-IP)-Experimente durchgeföhrt. Dazu wurden in HEK293-Zellen TRPC3- oder TRPC6-Plasmide mit Flag-GC-A kotransfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen für 2 Stunden auf Serum-freies Medium gesetzt, dann erfolgte entweder für 10 Minuten eine Inkubation mit PBS oder mit ANP (jeweilige Endkonzentration 100 nM), um eine mögliche Beeinflussung der Interaktion durch ANP zu untersuchen. Anschließend erfolgte die Zellfraktionierung. Ein Teil der Membranfraktion wurde für die Immunitprazipitation mit M2-Agarose-Beads (Sigma) verwendet. Schließlich wurde die Membranfraktion sowie eine Waschfraktion aus der IP und das Eluat der IP auf 10%ige SDS-Gele aufgetragen und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine wurden Flag-, GC-A-, TRPC3- und TRPC-6 Antikörper verwendet.

In den Abbildungen 8 und 9 wird gezeigt, dass TRPC3 und TRPC6 mit Flag-GC-A ko-immunitprazipitieren, wobei ANP keinen Einfluss auf die IP nimmt.

Um die Bedeutung der Cyclase-Domäne für die Interaktion zwischen den TRPC3/C6-Kanälen und GC-A zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit TRPC3- oder TRPC6-Plasmiden sowie einer Cyclase-inaktiven GC-A-Mutante (Flag-GC-A_{D893A}) oder mit einer Cyclasefreien GC-A-Mutante (Flag-GC-A_{Δ863-1057}) kotransfiziert.

Die Ko-IP zeigt deutlich, dass auch bei diesem Experiment eine Assoziation der GC-A-Proteine mit TRPC3/C6 stattfindet (Abb. 8 und 9). Es sei anzumerken, dass der trunkierte GC-A-Rezeptor Flag-GC-A_{Δ863-1057} nicht mit dem GC-A-

Antikörper detektiert werden kann, da sich die Bindungsstelle des Antikörpers in der Cyclase-Domäne befindet. Der Versuch hat gezeigt, dass die Cyclase-Domäne nicht für die Interaktion zwischen TRPC3/C6 und GC-A verantwortlich ist.

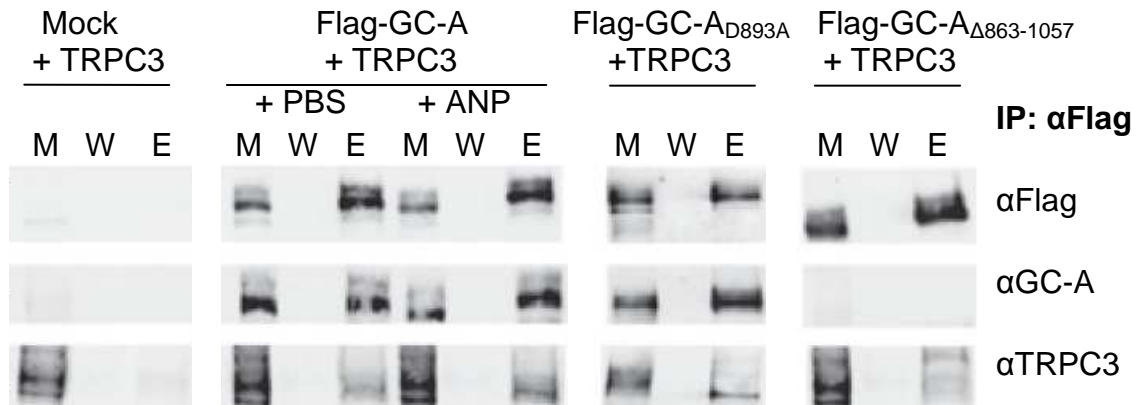


Abb. 8: Ko-IP von TRPC3 mit Flag-GC-A, Flag-GC-A_{D893A} und Flag-GC-A_{Δ863-1057} aus Membranlysat transfizierter HEK293-Zellen. Aufgetragen wurde M: Membranfraktion, W: Waschfraktion, E: Eluat. TRPC3 koimmunpräzipitierte mit Flag-GC-A sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ANP (100 nM, 10 min). Die Präzipitation erfolgte auch bei den GC-A-Proteinen mit inaktiver Cyclase-Domäne (Flag-GC-A_{D893A}) und ohne Cyclase-Domäne (Flag-GC-A_{Δ863-1057}).

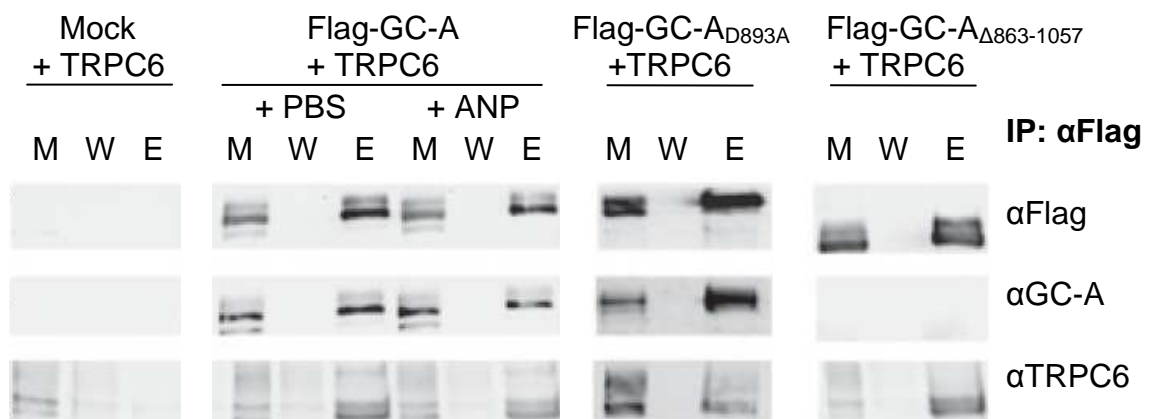


Abb. 9: Ko-IP von TRPC6 mit Flag-GC-A, Flag-GC-A_{D893A} und Flag-GC-A_{Δ863-1057} aus Membranlysat transfizierter HEK293-Zellen. Aufgetragen wurde M: Membranfraktion, W: Waschfraktion, E: Eluat. Auch TRPC6 koimmunpräzipitierte mit Flag-GC-A sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ANP (100 nM, 10 min). Die Präzipitation erfolgte auch hier bei den GC-A-Proteinen mit inaktiver Cyclase-Domäne (Flag-GC-A_{D893A}) und ohne Cyclase-Domäne (Flag-GC-A_{Δ863-1057}).

3.1.2 Keine Ko-Immunitäzitation von TRPC4/C5 mit GC-A in HEK293-Zellen

Um herauszufinden, ob die Interaktion von GC-A auch mit anderen Mitgliedern der TRPC-Familie stattfindet, wurden in HEK293-Zellen TRPC4- oder TRPC5-Plasmide mit Flag-GC-A kotransfiziert. Nach 2 Tagen erfolgte die Zellfraktionierung, wobei ein Teil der Membranfraktion für die Immunpräzitation mit M2-Agarose-Beads (Sigma) verwendet wurde. Schließlich wurde die Membranfraktion sowie eine Waschfraktion aus der IP und das Eluat der IP auf 10%ige SDS-Gele aufgetragen und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine wurden Flag-, TRPC4- und TRPC-5 Antikörper verwendet.

Es konnte keine spezifische Interaktion zwischen TRPC4/C5 und GC-A festgestellt werden (Abb. 10).

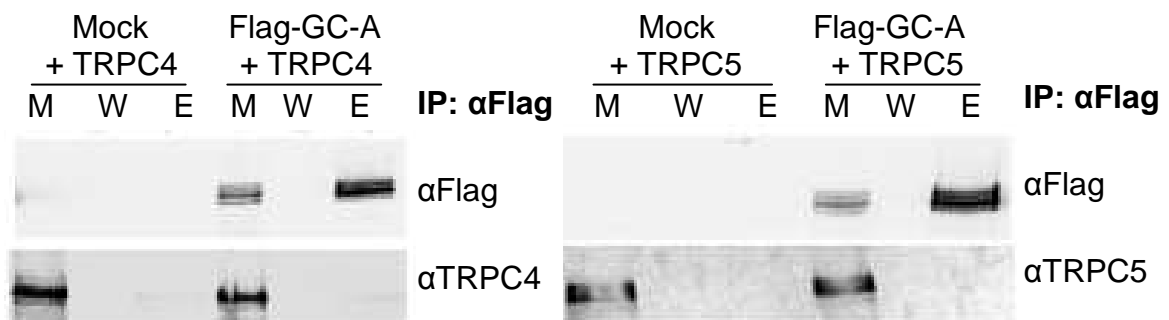


Abb. 10: Ko-IP von TRPC4 und TRPC5 mit Flag-GC-A aus Membranlysate transfizierter HEK293-Zellen. Aufgetragen wurde M: Membranfraktion, W: Waschfraktion, E: Eluat. Die Koexpression von Flag-GC-A mit TRPC4 oder TRPC5 führt zu keiner signifikanten Ko-Immunitäzitation.

3.1.3 TRPC3/C6-Expression ist vermindert in HA-GC-A-überexprimierenden Mäusen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen den TRPC-Kanälen und GC-A auch in murinem Herzgewebe nachgewiesen werden kann. Leider stellte sich heraus, dass die Expression von GC-A in Kardiomyozyten so gering ist, dass ein Nachweis über Westernblot-Analyse nicht möglich ist (Abb.

11). Verwendet man stattdessen Herzlysat aus transgenen Mäusen, welche HA-GC-A in den Kardiomyozyten überexprimieren, so kann GC-A im Westernblot nachgewiesen werden. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Auftragung der Proben auf das Gel wurde die Expression von GAPDH untersucht (Abb. 11).

Statistische Auswertungen der Westernblot-Analysen haben ergeben, dass im Herzgewebe der transgenen Mäuse zwar HA-GC-A überexprimiert wird, aber dafür die Expression von TRPC3 und TRPC6 im Vergleich zu wildtyp-Mäusen vermindert ist (Abb. 12).

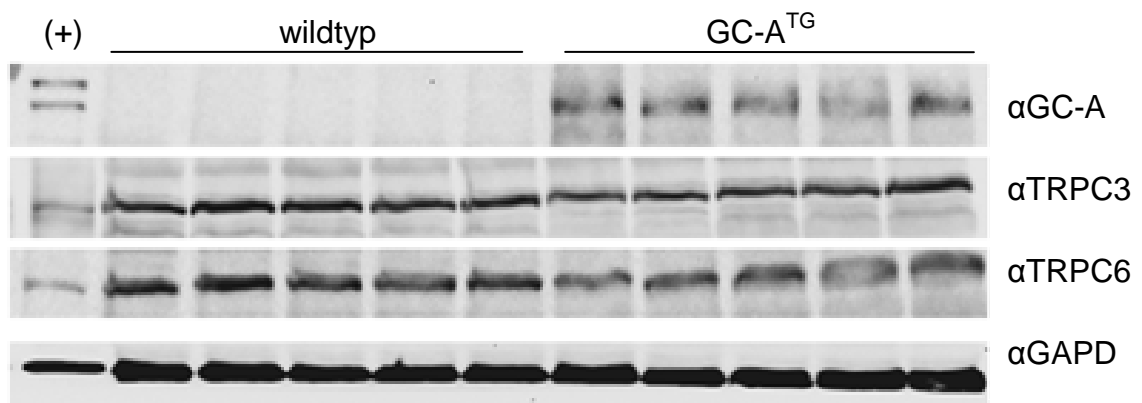


Abb. 11: Westernblot mit 100 μ g Proteinlysat aus verschiedenen wildtyp und transgenen Mäusen. Die Expression von GC-A ist nur in den transgenen GC-A überexprimierenden Mäusen detektierbar ($n = 5$).

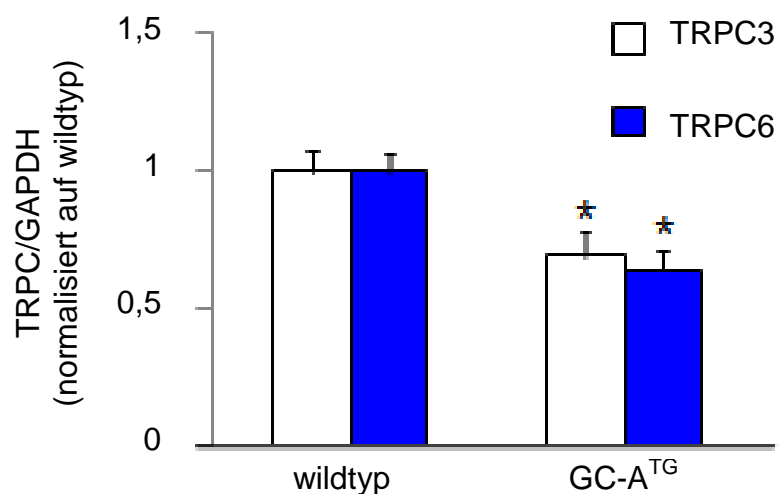


Abb. 12: Statistische Auswertung der Bandenintensität zu Abb. 11. Die Expression von TRPC3 und TRPC6 ist signifikant vermindert (* $p < 0.05$) in den transgenen Mäusen ($n = 5$).

3.1.4 Ko-Immünpräzipitation von TRPC3/C6 mit GC-A in Herzlysaten von HA-GC-A-überexprimierenden Mäusen

Um zu zeigen, dass die Interaktion zwischen den TRPC-Kanälen und GC-A nicht nur im heterologen System nachweisbar ist, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit Herzlysaten transgener Mäuse durchgeführt. Dazu wurden zwei Herzlysate gepoolt und damit zwei KO-Immünpräzipitationen mit HA-Agarose-Beads (Sigma) durchgeführt. Die Eluate wurden anschließend wieder gepoolt, um mehr Material zum Auftragen zu haben. In Abb. 13 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl TRPC3 als auch TRPC6 in dem Eluat detektiert werden konnte. Die Interaktion zwischen den TRPC-Kanälen und GC-A findet also auch in murinem Herzgewebe statt.

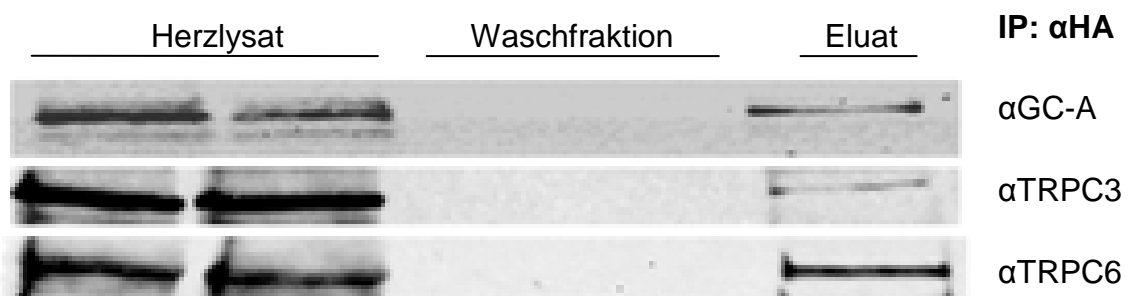


Abb. 13: Ko-Immünpräzipitation von TRPC3/C6 mit HA-GC-A aus transgenem Herzgewebe. Auch im Herzgewebe findet die Interaktion zwischen GC-A und TRPC3/C6 statt.

3.1.5 Die Ko-Expression von GC-A-CFP und TRPC3-YFP in HEK293-Zellen führt zu einem basalen FRET-Signal

Zur Untersuchung der Distanz zwischen den TRPC-Kanälen und GC-A wurden Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Experimente durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen mit TRPC3-YFP- und GC-A-CFP-Plasmiden kotransfiziert und deren Fluoreszenz und FRET-Intensität in der Pharmakologie, Universität Würzburg, gemessen. Ein FRET-Signal war bei allen gemessenen Proben deutlich zu erkennen (Abb. 14). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beleg für die lokale Nähe von GC-A zu TRPC3.

3.1.6 Das FRET-Signal verändert sich ANP-abhängig

Um die Einflüsse von cGMP und ANP auf die Interaktion zwischen TRPC3 und GC-A zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit TRPC3-YFP- und GC-A-CFP-Plasmiden kotransfiziert und mit dem cGMP-Analogen 8-Br-cGMP (100 μ M) bzw. mit ANP versetzt. Dabei wurde das FRET-Signal gemessen und ausgewertet. Die Inkubation mit dem cGMP-Analogen führte zu keiner Veränderung des FRET-Signals, während ANP eine Abnahme des Signals hervorrief (Abb. 14). Der Versuch wurde mit verschiedenen Konzentrationen von ANP (0,1 nM – 100 nM) wiederholt. ANP modulierte die Interaktion zwischen GC-A und TRPC3 konzentrationsabhängig (Abb. 15).

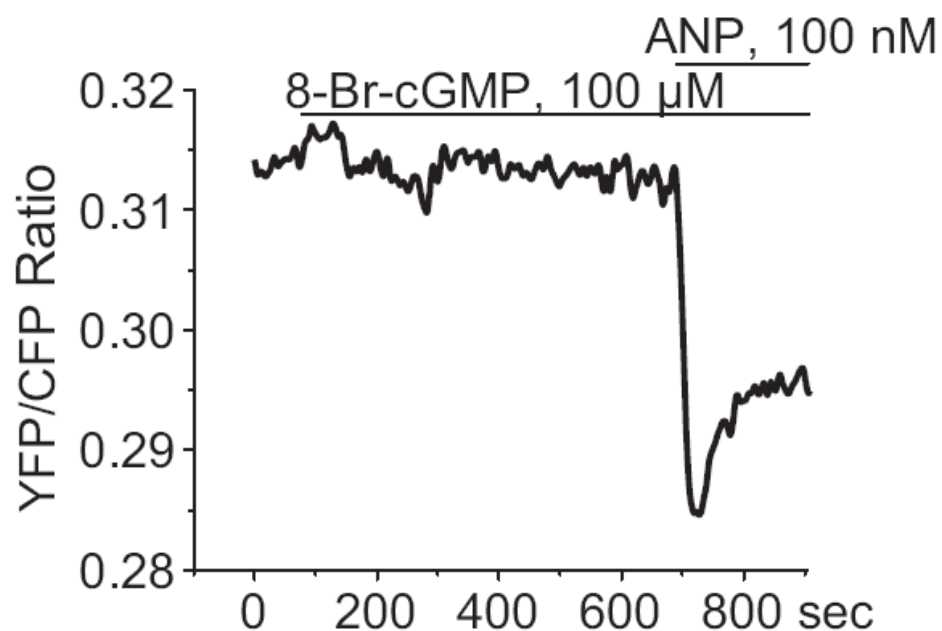


Abb. 14: Repräsentative Kurve von FRET-Signalen in GC-A-CFP- und TRPC3-YFP-kotransfizierten HEK293-Zellen unter basalen Bedingungen und bei Inkubation mit 8-Br-cGMP und ANP (Klaiber 2011).

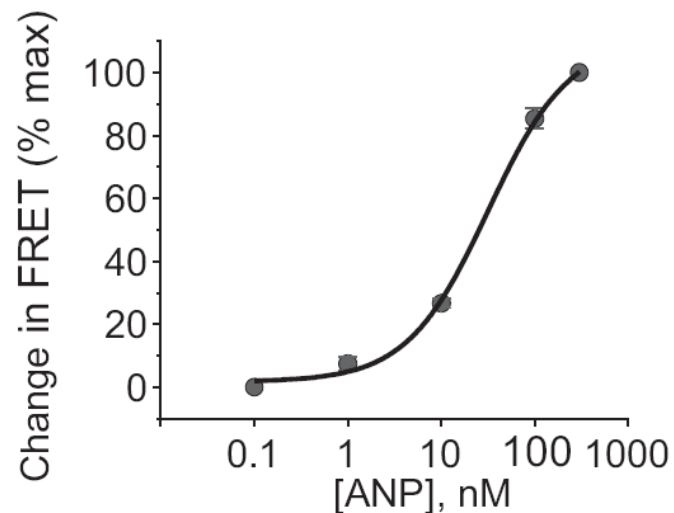


Abb. 15: Konzentrationsabhängige Effekte von ANP auf die FRET-Signale in GC-A $_{\Delta 863-1057}$ -CFP und TRPC3-YFP kotransfizierten HEK293-Zellen, n = 11 (Klaiber 2011).

3.1.7 Die Guanylyl-Cyclase Domäne ist nicht verantwortlich für die ANP-modulierte Interaktion zwischen GC-A und TRPC3

Um zu untersuchen, ob die Cyclase-Domäne der GC-A für die ANP-abhängige Veränderung der Interaktion zwischen GC-A und TRPC3 verantwortlich ist, wurde das FRET-Experiment von Abschnitt 3.1.6 mit dem verkürzten GC-A-Plasmid GC-A $_{\Delta 863-1057}$ -CFP wiederholt. Dieses Plasmid kodiert ein GC-A-Protein ohne Cyclase-Domäne mit CFP-Anhang am C-Terminus (Abb. 16).



Abb. 16: Schematische Darstellung der exprimierten Proteine und die Lage ihres Fluorophor-Anhanges. Mitte: repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von einzelnen Zellen (blau: CFP, gelb: YFP).

Durch die FRET-Experimente konnte gezeigt werden, dass die ANP-abhängige Veränderung des FRET-Signals auch in Abwesenheit der Cyclase-Domäne stattfindet (Abb. 17). Die Cyclase Domäne der GC-A ist also nicht verantwortlich für die Interaktion zwischen TRPC3 und GC-A.

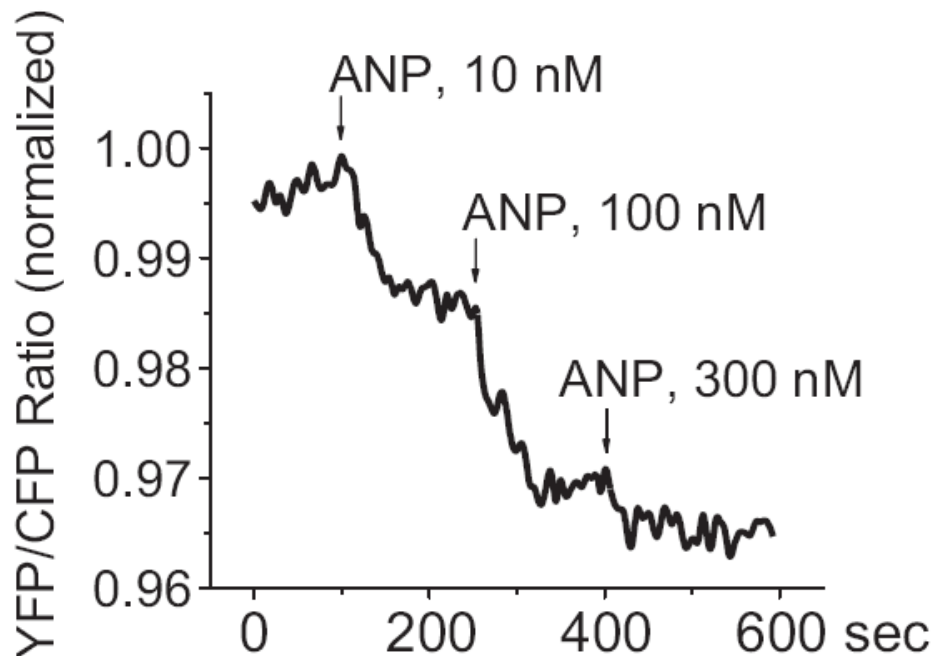


Abb. 17: FRET-Experimente mit einem trunkeierten GC-A-Protein führen ebenfalls zu einer ANP-abhängigen Veränderung des Signals. Dargestellt ist eine repräsentative Kurve (Klaiber 2011).

3.1.8 Die ANP-modulierte Interaktion besteht auch zwischen einem desensitisierten GC-A-Rezeptor und TRPC3

GC-A-CFP und TRPC3-YFP-kotransfizierte HEK293-Zellen wurden entweder mit PBS oder mit ANP vorinkubiert (100 nm, 60 min). Die Inkubation mit ANP führt zur Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors, so dass bei erneuter ANP-Gabe kein cGMP gebildet werden kann. Nach der Vorinkubation erfolgten FRET-Experimente mit diesen Zellen. Sowohl in den Kontrollzellen als auch in den desensitisierten Zellen war ein FRET-Signal messbar, welches durch Zugabe von ANP verändert wurde (Abb. 18). Die Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors beeinflusst also nicht die ANP-modulierte Interaktion zwischen GC-A und TRPC3.

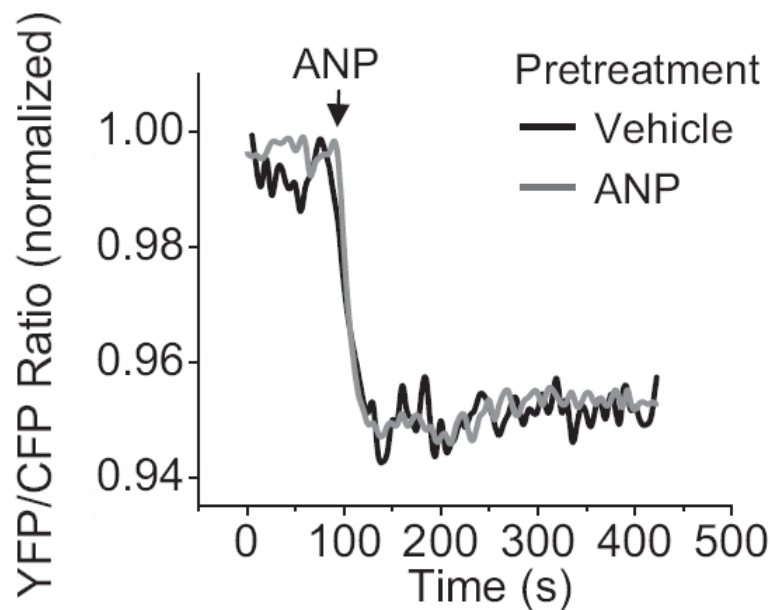


Abb. 18: Repräsentatives FRET-Experiment mit Kontrollzellen (Vorinkubation mit PBS) und desensitisierten Zellen, die mit ANP vorinkubiert wurden (Klaiber 2011).

3.2 Die Bedeutung von ANP für die Insulin-Homöostase unter pathologischen Bedingungen

Um die Bedeutung von dem ANP/GC-A-System für die Insulin-Homöostase näher zu untersuchen, wurden β -Zell-spezifische *GC-A-knock-out* (β -Zell-GC-A-KO)-Mäuse gezüchtet. Nach erfolgreichem Nachweis der konditionellen GC-A-Deletion wurde eine fetthaltige Diät mit den KO-Tieren und einer Kontrollgruppe durchgeführt. Die Auswirkung der Diät wurde u.a. durch orale Glukose-Toleranz-Tests, durch morphometrische Analysen der Inseln und durch Blutdruckmessungen überprüft.

3.2.1 Charakterisierung der β -Zell-GC-A-KO Mäuse

3.2.1.1 Nachweis der β -Zell-spezifischen GC-A-Deletion mittels genomischer PCR

Zur Überprüfung der konditionellen GC-A Deletion wurde den gezüchteten β -zellspezifischen *GC-A-knock-out* (β -Zell-GC-A-KO)-Mäusen aus der dritten Generation das Pankreas entnommen und die Langerhans'schen Inseln isoliert.

Zusätzlich wurden Gewebeproben aus Lunge und exokrinem Pankreas gesammelt. Aus den Inseln und den Gewebeproben wurde mittels der Phenol/Chloroform-DNA-Extraktionsmethode die DNA isoliert und für PCR-Experimente eingesetzt. Dazu wurden Primer verwendet, die die Kodierung von Cre-Rekombinase nachweisen („Cre“-Primerpaare: Cre800, Cre1200) oder die nur ein Amplifikat bilden, wenn der gefloخته GC-A-Abschnitt herausgeschnitten wurden („KO“-Primerpaare: MK116, MK117).

Die Auswertung der PCR-Produkte auf dem Agarose-Gel haben ergeben, dass die DNA für die Cre-Rekombinase in den Gewebeproben und in den Inseln vorhanden war. Die genomische Deletion des gefloختen GC-A-Abschnittes konnte dagegen nur in den Inseln beobachtet werden (Abb. 19). Damit wurde gezeigt, dass die Cre-Rekombinase nur in den pankreatischen β -Zellen einen Teil der GC-A-DNA herausgeschnitten hat.

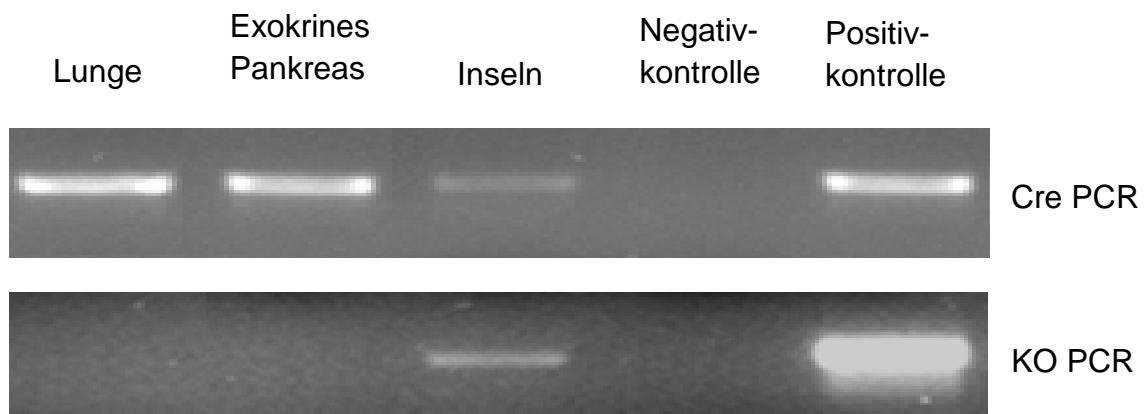


Abb. 19: PCR mit genomischer DNA aus Geweben von β -Zell-GC-A-KO-Mäusen. Die Cre-PCR führt nur zu einem Produkt, wenn die Cre-Rekombinase kodiert wird. Bei der KO-PCR bildet sich nur ein Amplifikat, wenn das gefloخته GC-A aus dem Gen herausgeschnitten ist.

Zur weiteren Bestätigung der erfolgreichen GC-A-Deletion wurden die Pankreata aus drei β -Zell-GC-A-KO-Mäusen sowie aus drei flox/flox-Mäusen entnommen und die Langerhans-Inseln isoliert. Nach Isolation der genomischen DNA wurde mittels PCR überprüft, ob die Cre-Rekombinase nur in den KO-Inseln nachweisbar ist (Cre-PCR) und ob die flox-Sequenzen erfolgreich herausgeschnitten wurden (Flox-PCR). In Abbildung 20 kann man deutlich

erkennen, dass die Cre-Rekombinase sowie die durch sie vermittelte Deletion (KO-PCR) nur in den KO-Tieren nachweisbar ist. Die flox-Sequenzen konnten dagegen nur in den Kontrollmäusen nachgewiesen werden.

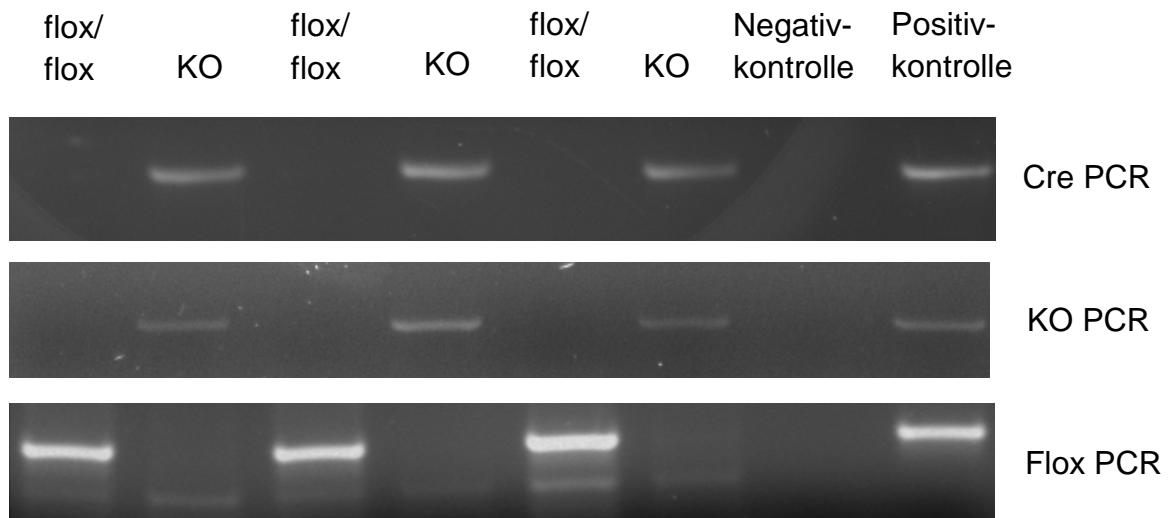


Abb. 20: PCR mit genomischer DNA aus Inseln von β -Zell-GC-A-KO-Mäusen und flox/flox-Mäusen ($n = 3$). Bei der Cre-PCR bildet sich nur ein Amplifikat, wenn Cre-Rekombinase codiert wird. Die KO-PCR führt nur zu einem Produkt, wenn der gefloxt GC-A-Abschnitt entfernt wurde und die Flox-PCR bildet nur ein Produkt, wenn der gefloxt GC-A-Abschnitte noch vorhanden ist. Die untere unspezifische Banden bei der Flox-PCR konnte nicht zugeordnet werden.

3.2.1.2 Die Expression von GC-A in Inseln und anderen Geweben

Die Expression von GC-A sollte in den Inseln der gezüchteten β -Zell-GC-A-KO-Mäuse deutlich erniedrigt sein im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Um dies zu ergründen, wurden Inseln aus β -Zell-GC-A-KO-Mäusen, aus GC-A +/+ Mäusen (Kontrollmäuse) und GC-A -/- Mäusen (Negativkontrolle) isoliert und lysiert. Zur weiteren Kontrolle wurde auch das Nierengewebe aus den Mäusen isoliert. In Abbildung 21 ist das Ergebnis der Westernblot-Analyse mit den gewonnenen Proteinlysaten dargestellt. GC-A konnte in dem Nierengewebe der Kontrollmäuse und der konditionellen KO-Mäuse detektiert werden. Erwartungsgemäß konnte GC-A nicht in den globalen GC-A-KO-Mäusen nachgewiesen werden. Leider war eine Detektion der GC-A in den Inseln nicht möglich. Daher konnte eine eventuelle GC-A-Expressionsverminderung in den Inseln auf Proteinebene nicht untersucht werden.

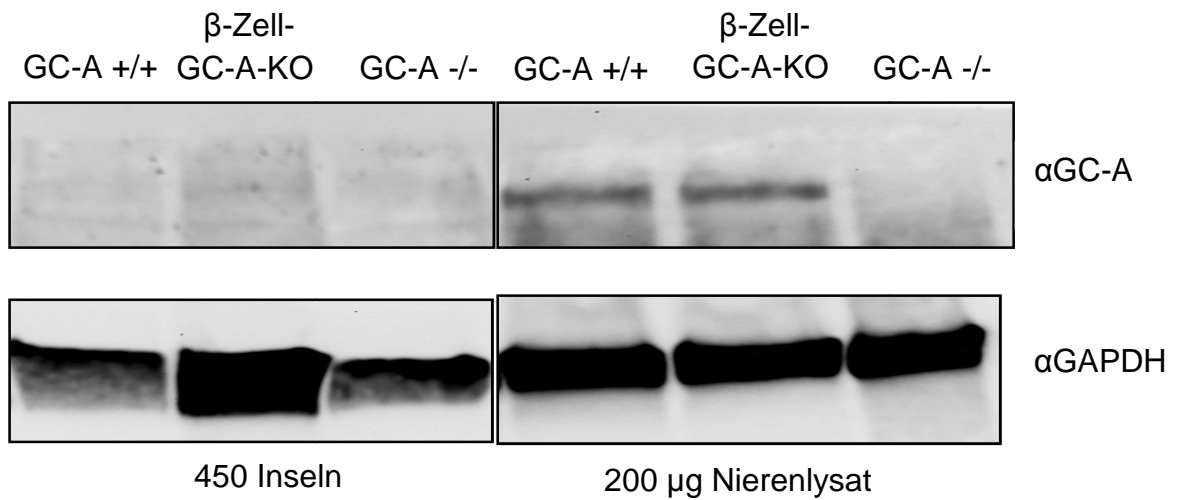


Abb. 21: Westernblot-Analyse von Inselzelllysat und Nierenlysat von GC-A +/+, β -Zell-GC-A-KO- und GC-A -/- Mäusen. GC-A ist in dem Inselzelllysat nicht nachweisbar.

Bei einer gelungenen β -Zell-spezifischen GC-A-Deletion sollte keine Expressionsänderung von GC-A in anderen Geweben auftreten. Da aus vorhergehenden Experimenten bekannt ist, dass GC-A gut im Nierengewebe und im Lungengewebe detektierbar ist, wurde das Lungen- und Nierengewebe aus vier β -Zell-GC-A-KO-Mäusen sowie aus vier flox/flox-GC-A-Mäusen entnommen und lysiert. Im Westernblot wurde ermittelt, ob die Expression von GC-A in den Geweben der KO-Mäuse verändert ist (Abb. 22A, 22B). Die statistische Auswertung der Bandenintensität hat ergeben, dass es zu keiner Expressionsänderung aufgrund der konditionellen GC-A-Deletion gekommen ist (Abb. 23).

3.2.1.3 Immunhistochemie an Pankreasgewebe

Zur weiteren Untersuchung der GC-A Expression in den Langerhans-Inseln wurde das Pankreasgewebe aus flox/flox-Mäusen, GC-A -/- Mäusen und β -Zell-GC-A-KO-Mäusen mit Formalin perfundiert, entnommen und in Formalin eingelegt. Die HE-Immunhistochemie mit GC-A-Antikörpern wurde freundlicherweise von Prof. Hideo Baba aus dem Pathologischen Institut, Uni-

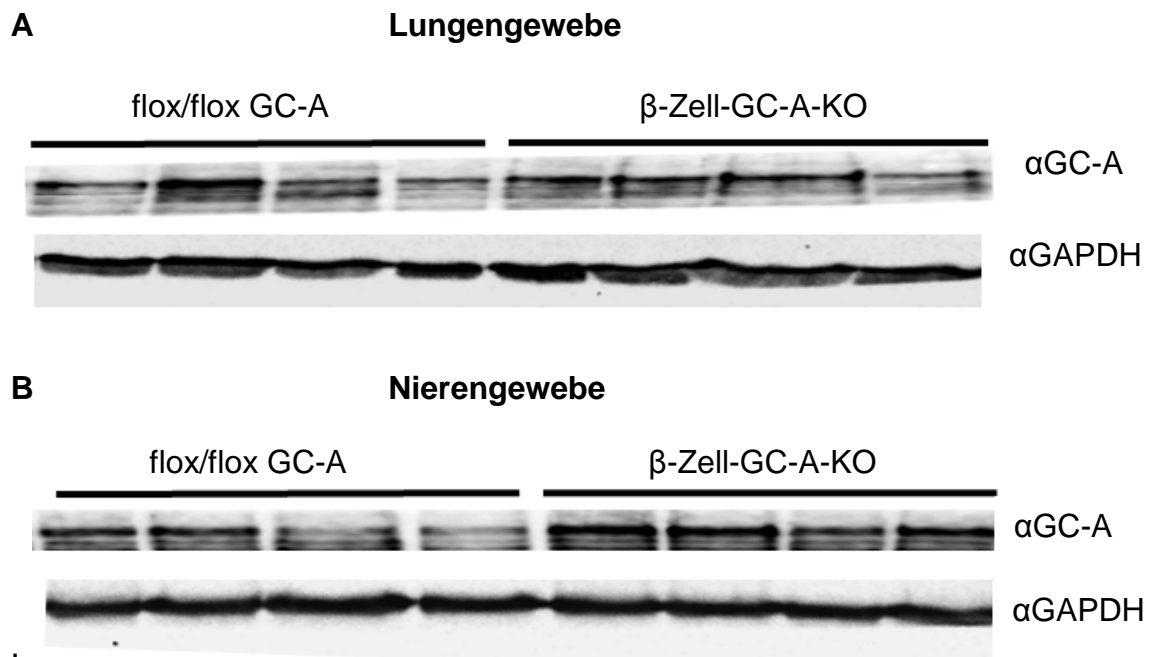


Abb. 22: Westernblot-Analyse des Lungengewebes (A) und des Nierengewebes (B) von β -Zell-GC-A-KO- und flox/flox-GC-A-Mäusen. Es wurden Antikörper gegen GC-A und zum Vergleich gegen GAPDH eingesetzt.

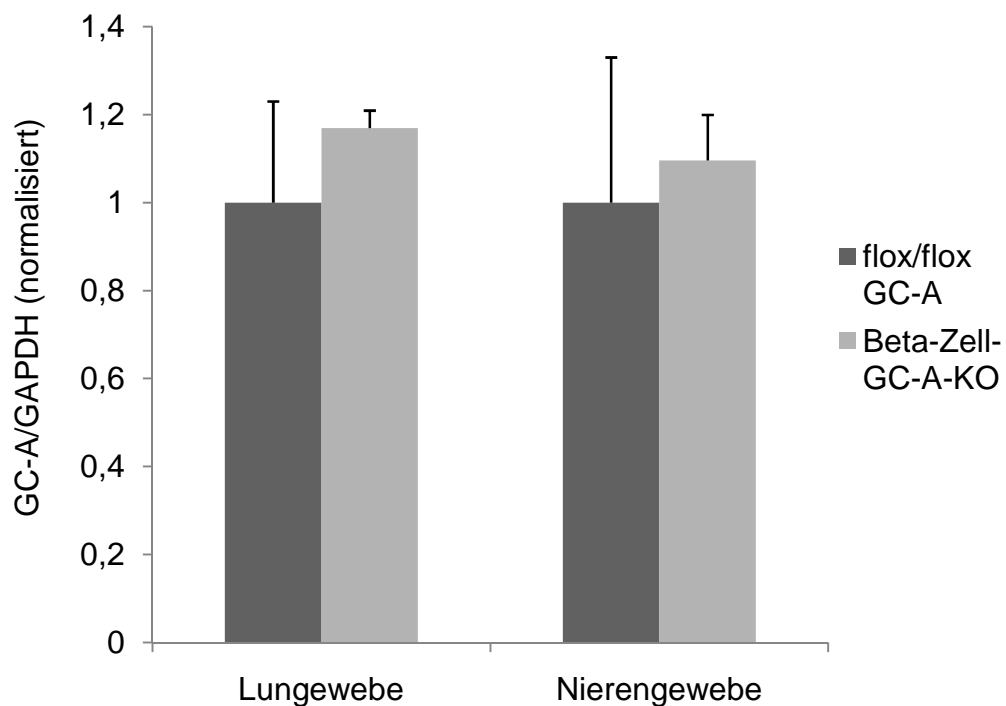
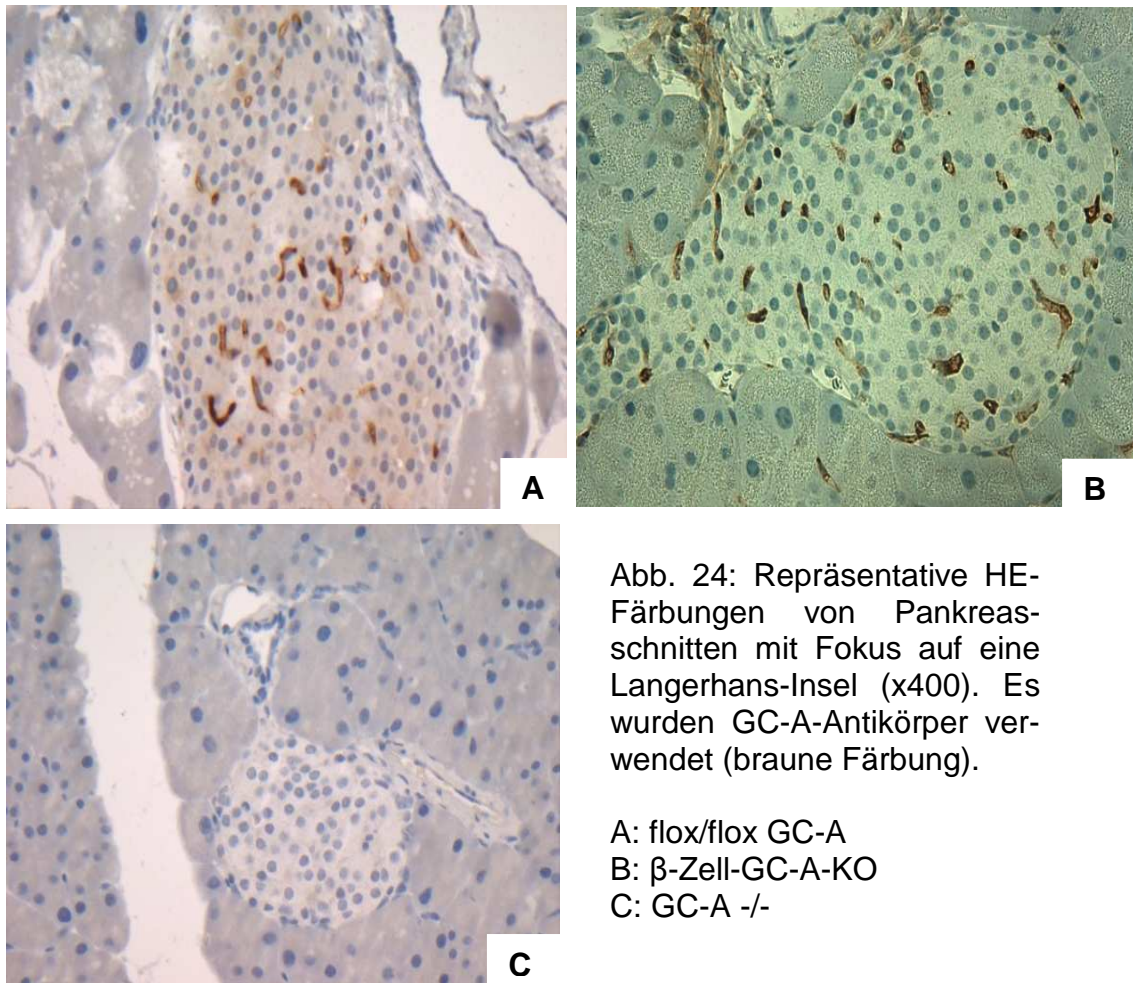


Abb. 23: Statistische Auswertung der Bandenintensität des Lungen- und Nierengewebes (Abb. 22). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der KO-Mäuse und der Kontrollmäuse festgestellt werden ($n = 4$).

versitätsklinikum Essen, durchgeführt. Während die Inseln der flox/flox-GC-A Mäuse auf der ganzen Fläche braun eingefärbt sind und damit ein hohes Aufkommen von GC-A aufweisen, sind in den Inseln der β -Zell-GC-A-KO-Mäuse vorwiegend die Kapillaren eingefärbt (Abb. 24 A, B). Bei den GC-A $-/-$ Mäusen kam es wie erwartet zu keiner Färbung (Abb. 24 C).



Zum Vergleich wurde auch das Lungengewebe aus flox/flox-GC-A- und β -Zell-GC-A-KO-Mäusen entnommen und für die Immunhistochemie verwendet. Wie erwartet konnte kein sichtbarer Unterschied zwischen den Geweben festgestellt werden (Abb. 25).

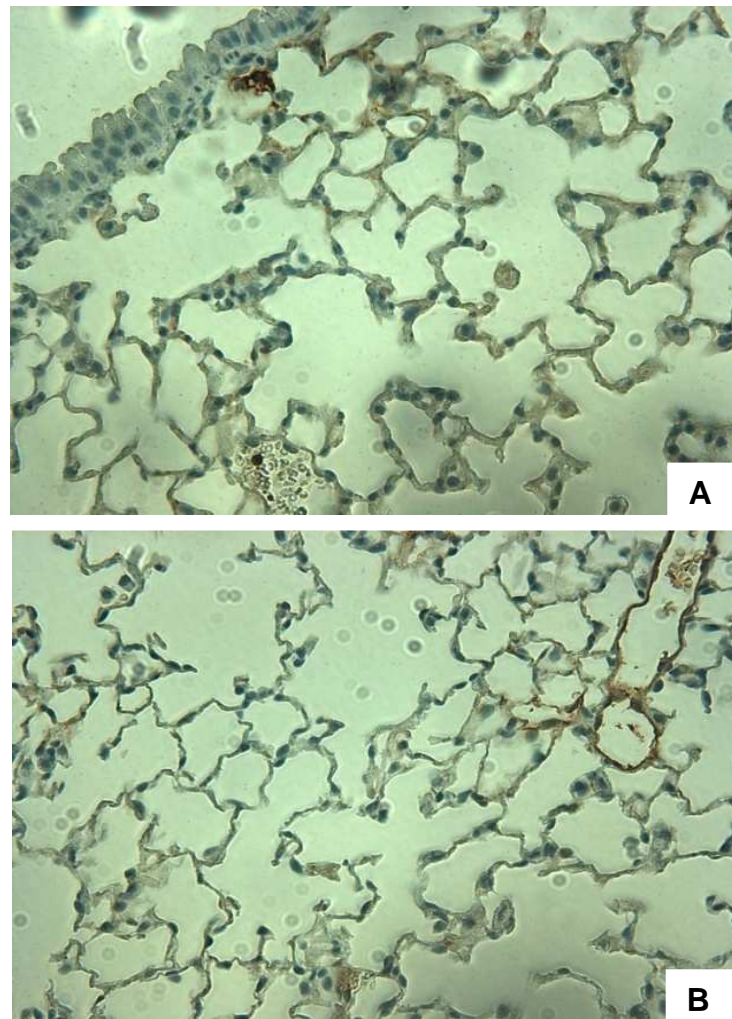


Abb. 25: HE-Färbung von Lungengewebe. GC-A ist braun markiert. A: flox/flox-GC-A-Maus, B: β -Zell-GC-A-KO-Maus.

3.2.1.4 Blutdruck und Herzgewicht der β -Zell-GC-A-KO-Mäuse

Der GC-A Rezeptor ist von großer Bedeutung für die Blutdruckregulation und eine kardiale Dysfunktion des Rezeptors trägt zur Entwicklung einer Herzhypertrophie bei. Daher wurde untersucht, ob der Blutdruck und das Herzgewicht der konditionellen GC-A-KO-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen verändert ist. Mittels Schwanzplethysmografie wurden an KO- und Kontrolltieren (jeweils 4 Monate alt) über eine Woche Blutdruckmessungen durchgeführt und die Werte gemittelt. Der Blutdruck der KO-Mäuse unterschied sich nicht von dem Blutdruck der Kontrollmäuse (Abb. 26). Die konditionelle

GC-A-Deletion hat also keine Auswirkung auf die Blutdruckregulation genommen.

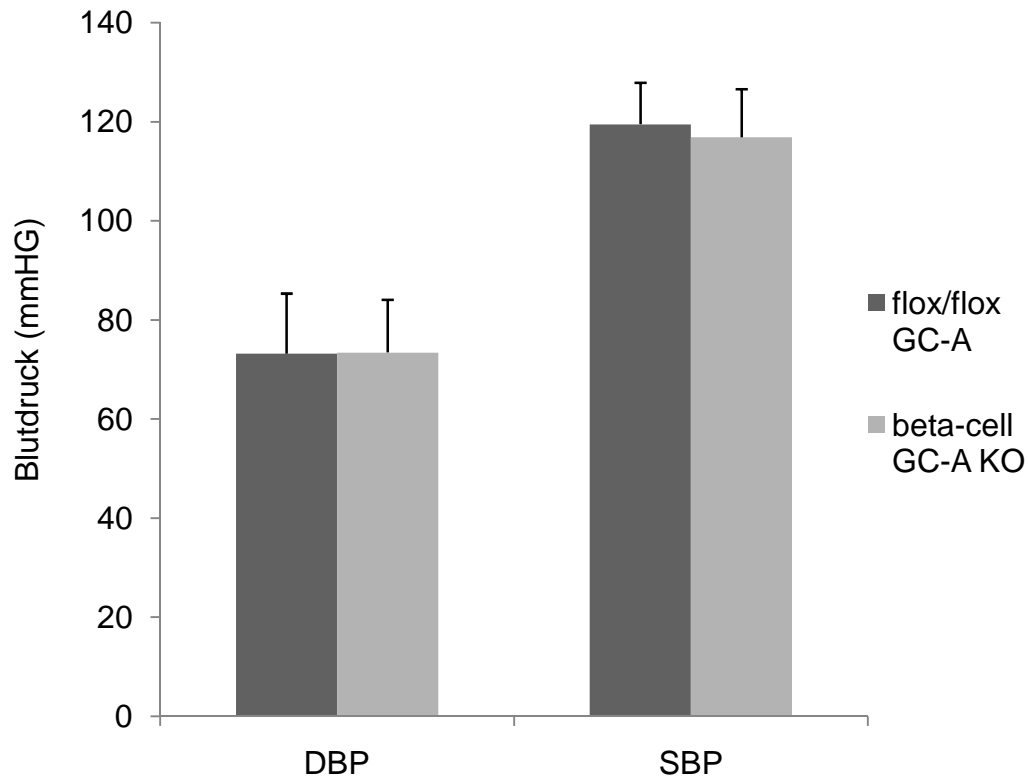


Abb. 26: Blutdruckmessungen an flox/flox-GC-A-Mäusen (n = 8) und β -Zell-GC-A-KO-Mäusen (n = 7). Weder der diastolische Blutdruck (DBP) noch der systolische Blutdruck (SBP) unterscheiden sich in den Kohorten.

Zur Untersuchung einer möglichen Herzhypertrophie wurden jeweils fünf β -Zell-GC-A-KO-Mäuse bzw. fünf flox/flox-GC-A-Mäuse gewogen. Die Tiere waren zwischen 10 und 12 Monate alt. Anschließend wurde den Mäusen das Herz entnommen und ebenfalls gewogen. Das resultierende aussagekräftige Herz/Körper-Gewicht ist zwar bei den KO Mäusen tendenziell erniedrigt, aber ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 27). Die β -Zell-GC-A-KO-Mäuse haben keine Herzhypertrophie entwickelt.

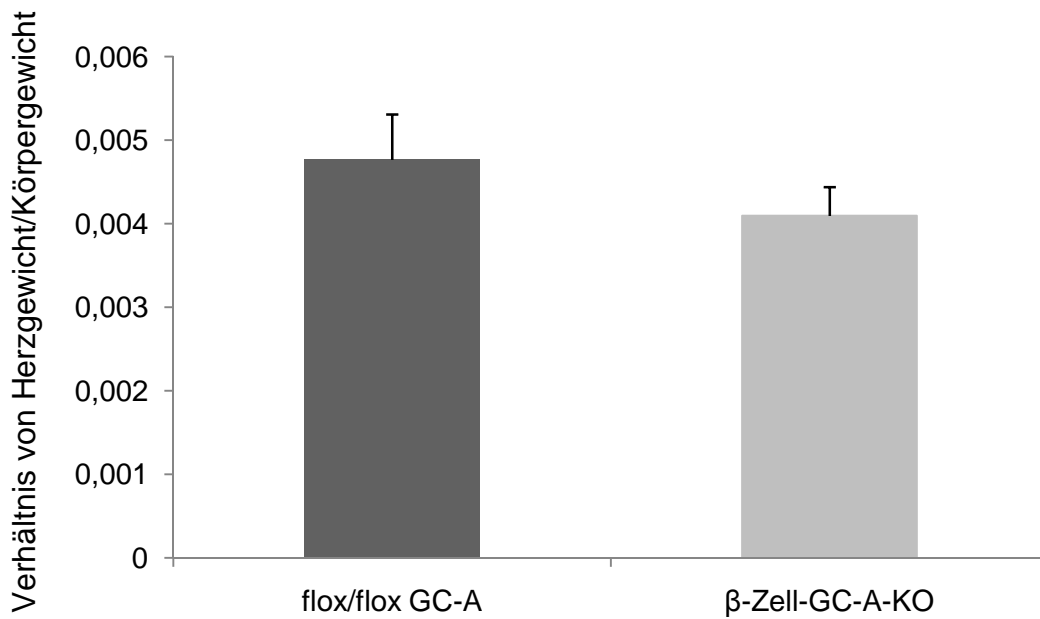


Abb. 27: Statistische Auswertung der Herzgewicht/Körpergewicht-Messung. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen KO-Mäusen und Kontrollmäusen vor (n = 5).

3.2.1.5 Basale Blutzuckerspiegel der β-Zell-GC-A-KO-Mäuse

Zur Messung der basalen Blutzuckerspiegel wurden flox/flox-GC-A-Mäuse und β-Zell-GC-A-KO-Mäuse über 14 Stunden gefastet. Es wurden sowohl 12 Wochen alte Tiere als auch 50 Wochen alte Tiere beider Geschlechts verwendet, um mögliche altersbedingte bzw. geschlechtsbedingte Auswirkungen auf den Blutzuckerspiegel aufzudecken.

Bei den männlichen Individuen konnte kein Unterschied zwischen den alten und jungen KO- bzw. Kontrollmäusen festgestellt werden (Abb. 28). Die älteren KO-Weibchen haben dagegen einen nicht-signifikanten erhöhten basalen Glukosepiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 29). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied, der evtl. hormonbedingt ist, lässt sich nicht ausschließen.

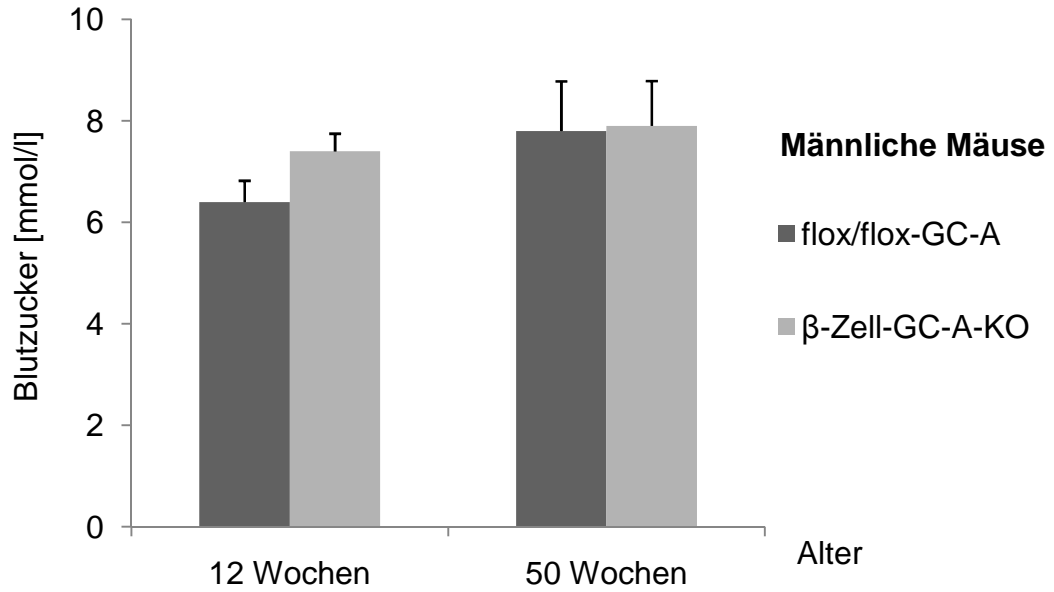


Abb. 28: Basale Glukosespiegel nach 14 h fasten. Es wurden 12 Wochen alte und 50 Wochen alte männliche flox/flox-GC-A- und β -Zell-GC-A-KO-Mäuse verwendet (n = 6).

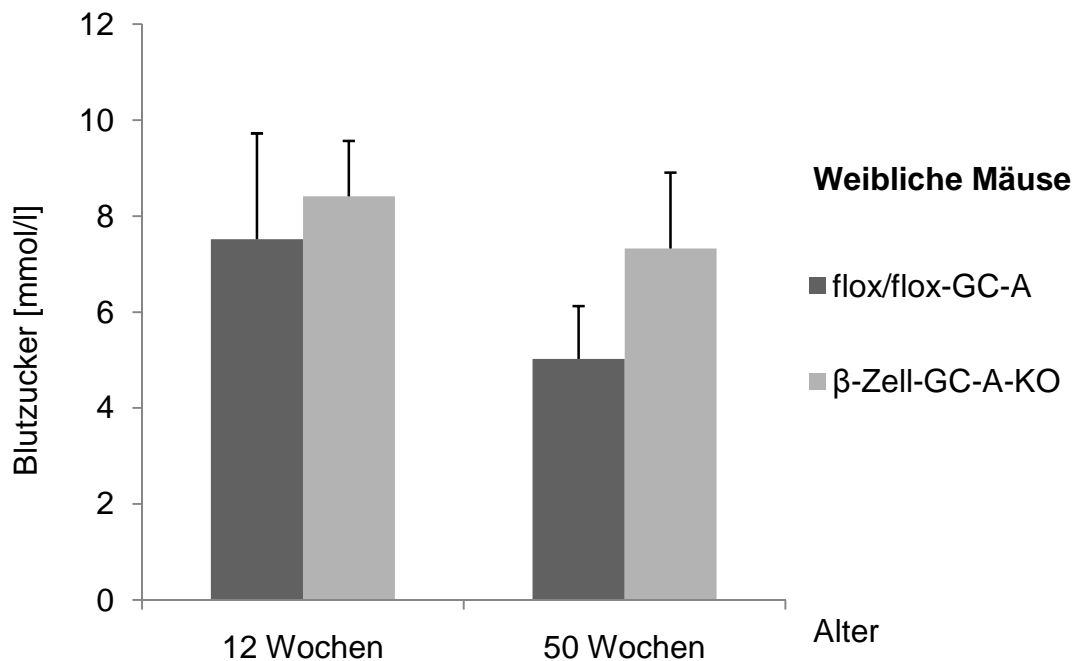


Abb. 29: Basale Glukosespiegel nach 14 h fasten. Es wurden 12 Wochen alte und 50 Wochen alte weibliche flox/flox-GC-A- und β -Zell-GC-A-KO-Mäuse verwendet (n = 6).

3.2.1.6 cGMP-RIA an murinen Langerhans-Inseln

Murine Langerhans-Inseln wurden aus flox/flox-GC-A- und β -Zell-GC-A-KO-Mäusen isoliert, um die Bildung von cGMP zu messen. Dazu wurden die Inseln mit PBS oder ANP inkubiert und anschließend sofort mit 75%iger Ethanollösung konserviert. Das Ethanol wurde abgedampft und der cGMP-Gehalt des Pellets wurde durch einen cGMP-Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Die Inkubation mit PBS wurde durchgeführt, um den basalen cGMP-Spiegel zu ermitteln. Dieser ist bei den KO- und Kontrolltieren vergleichbar niedrig (Abb. 30). Die Inkubation mit ANP führt hingegen zur GC-A-Aktivierung und damit zu einer erhöhten Produktion von cGMP. In den Kontrollmäusen ist der cGMP-Gehalt nach der Stimulation signifikant erhöht im Vergleich zu den KO-Mäusen (Abb. 30). Die verminderte Reaktion der KO-Inseln auf die ANP-Stimulation ist ein weiteres Indiz für die gelungene konditionelle Deletion.

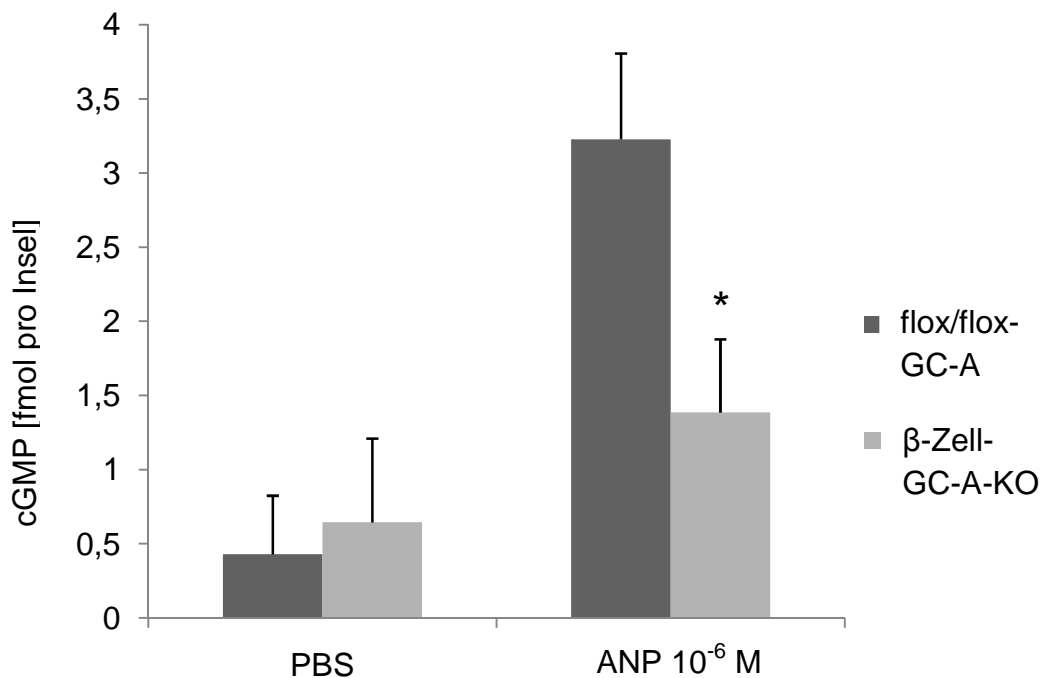


Abb. 30: Statistische Auswertung des cGMP-RIAs mit Inseln aus flox/flox-GC-A- und β -Zell-GC-A-KO-Mäusen. Die Inseln wurden mit PBS oder mit ANP (10^{-6} M) inkubiert. Die Inseln der KO-Mäuse haben eine signifikant (*: $p = 0,015$) verminderte cGMP-Produktion nach Stimulation mit ANP im Vergleich zu den Kontrollen ($n = 4$).

3.2.2 *High fat diet* (HFD)-Studie

3.2.2.1 Studiendesign

Es wird angenommen, dass ANP positive Effekte auf die Insulinausschüttung und die β -Zell-Proliferation ausübt. Um die Bedeutung von ANP für die Insulin-Homöostase unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden β -Zell-GC-A-KO-Mäuse und flox/flox-GC-A-Mäuse auf eine fettreiche Ernährung umgestellt (*high fat diet*, mit 60% Fettanteil anstatt den üblichen 15%). Dieses experimentelle Modell führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung eines Prädiabetes und zur Ausbildung einer Insulinresistenz (Nishikawa 2007).

Sowohl weibliche als auch männliche Versuchstiere wurden für 3 Monate fettreich ernährt. Die Mäuse waren zu Beginn der Studie ca. 4 Monate alt. In Tabelle 9 ist die Anzahl der einzelnen Kohorten angezeigt.

Während der Versuchszeit wurde regelmäßig das Körpergewicht der Tiere gemessen. Nach 2, 4 und 12 Wochen wurden orale Glukosetoleranztests durchgeführt. Zu Beginn und am Ende der Studie erfolgten Blutdruckmessungen. Abschließend wurden am Ende der Studie die Herzgewichte bestimmt, Insulin-Sekretionsexperimente durchgeführt und die Inseln einiger Mäuse morphometrisch analysiert.

Tabelle 9: Anzahl der Versuchstiere, aufgeteilt nach Geschlecht und Genotyp.

	Kontrollgruppe (flox/flox-GC-A Mäuse)	β -Zell-GC-A-KO- Mäuse
Männlich	14	9
Weiblich	7	11

3.2.2.2 Gewichtsveränderungen

Die Mäuse wurden vor der Diät, sowie 2, 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn der Diät gewogen. Das Ausgangsgewicht bei den männlichen Mäusen lag bei 26 ± 2 g für die Kontrollmäuse bzw. 25 ± 2 g für die KO-Mäuse. Die weiblichen Kontrollmäuse wogen zu Beginn der Diät 20 ± 1 g. Die weiblichen KO-Mäuse

wogen 19 ± 1 g. Am Ende der Diät hat sich das Gewicht der Kontroll- und KO-Männchen fast verdoppelt (flox/flox-GC-A: 39 ± 2 g, β -Zell-GC-A-KO: 38 ± 3 g). Das Ausgangsgewicht der Weibchen war nach der Diät nur um 23% bei den Kontrolltieren bzw. um 29% bei den KO-Mäusen erhöht (flox/flox-GC-A: 25 ± 2 g, β -Zell-GC-A-KO: 24 ± 2). Allerdings ist der Unterschied zwischen den Gewichten von Kontroll- und KO-Mäusen nicht signifikant. Auffällig bleibt, dass die KO-Tiere tendenziell leichter waren (Abb. 31).

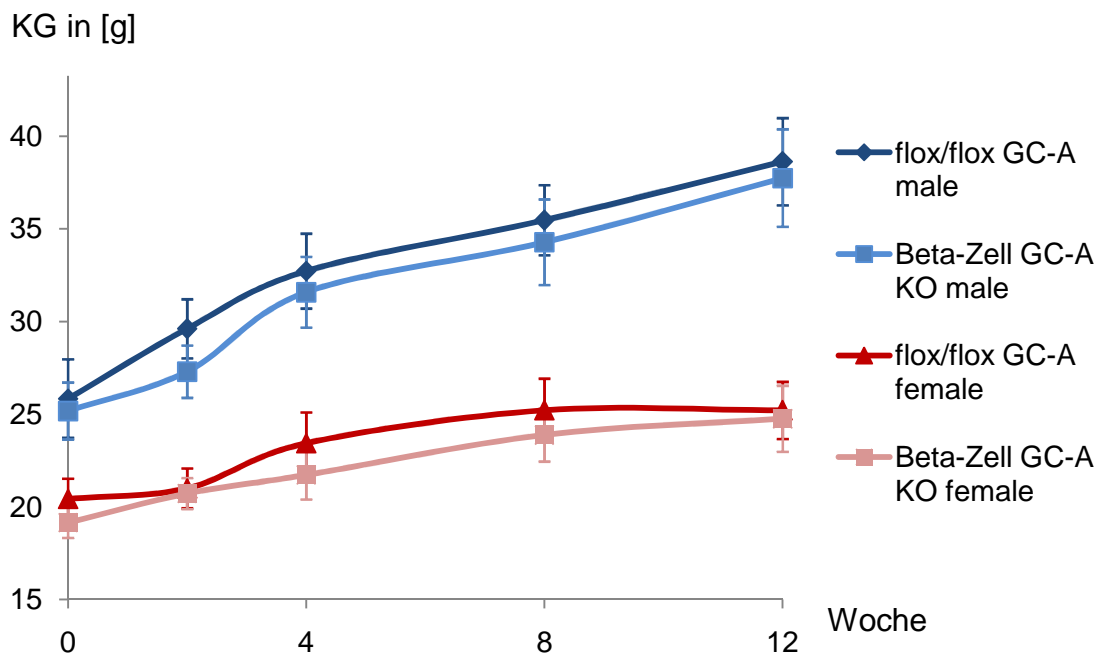


Abb. 31: Murine Gewichtsveränderung innerhalb der *high fat diet*-Studie. $n = 7$.

3.2.2.3 Ergebnisse der oralen Glukosetoleranztests

Um zu untersuchen, ob die fettreiche Diät zur Bildung einer Insulinresistenz führt, wurde zu Beginn der Studie, dann nach 4 und nach 12 Wochen ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) an 7 Mäusen aus jeder Kohorte durchgeführt. Dazu wurde der basale Blutzuckerspiegel nach 16 Stunden Nahrungskarenz gemessen. Anschließend wurde den Mäusen ein Glukosebolus verabreicht und nach 15, 30, 60 und 90 Minuten erneut der Blutzuckerspiegel bestimmt.

Zu Beginn der HFD wurde bei allen Mäusen eine für ihr Alter typische Blutzuckerspiegelkurve gemessen (Abb. 32 A-B, 33 A-B). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den KO-Mäusen. Doch bereits 4 Wochen nach Beginn der HFD war bei allen Mäusen der Blutzuckerspiegel 30 Minuten nach Glukosebolus schon deutlich erhöht im Vergleich zu der ersten Messung (Abb. 32, 33). Nach 90 Minuten konnte der Blutzuckerspiegel allerdings wieder gesenkt werden. Nachdem die Mäuse 12 Wochen fettreich ernährt wurden, war ihre Blutzuckerspiegelkurve deutlich nach oben verschoben. Der Glukosespiegel war 30 Minuten nach dem Glukosebolus durchschnittlich um 90 % bei den männlichen Kontrollen bzw. um 73 % bei den männlichen KO-Tieren erhöht im Vergleich zur Messung zu Beginn der Studie. Auch 90 Minuten nach der Glukosegabe war der Blutzuckerspiegel immer noch etwa doppelt so hoch wie bei der Messung zu Beginn der Studie. Zwischen den Kontrolltieren und den KO-Mäusen gab es dabei keinen Unterschied (Abb. 32 C). Die Glukosetoleranztests an den weiblichen Mäusen führten zu einem ähnlichen Ergebnis (Abb. 33).

Um zu überprüfen, ob die erhöhten Blutglukosespiegel nach Beendigung der HFD mit dem voranschreitenden Alter der Mäuse zusammenhängt, wurden 7 männliche Kontrolltiere bzw. 7 männliche β -Zell-GC-A KO-Mäuse ausgewählt, die nicht an der HFD teilgenommen haben und 12 Monate alt waren. An diesen „alten“ Mäusen wurde nach 14 Stunden Nahrungskarenz ein oGTT durchgeführt. In Abb. 32 A und B (rote Linie) ist deutlich zu erkennen, dass die Blutzuckerspiegel der alten Mäuse nicht so stark ansteigen wie bei den Mäusen nach der HFD. Die Spiegel sind eher vergleichbar mit den Blutzuckerspiegel der jungen Mäuse vor der Diät. Es ist daher anzunehmen, dass die Mäuse aus der HFD ausschließlich durch die mehrwöchige fettreiche Ernährung eine gestörte Insulinwirkung, vermutlich eine Insulinresistenz, ausgebildet haben.

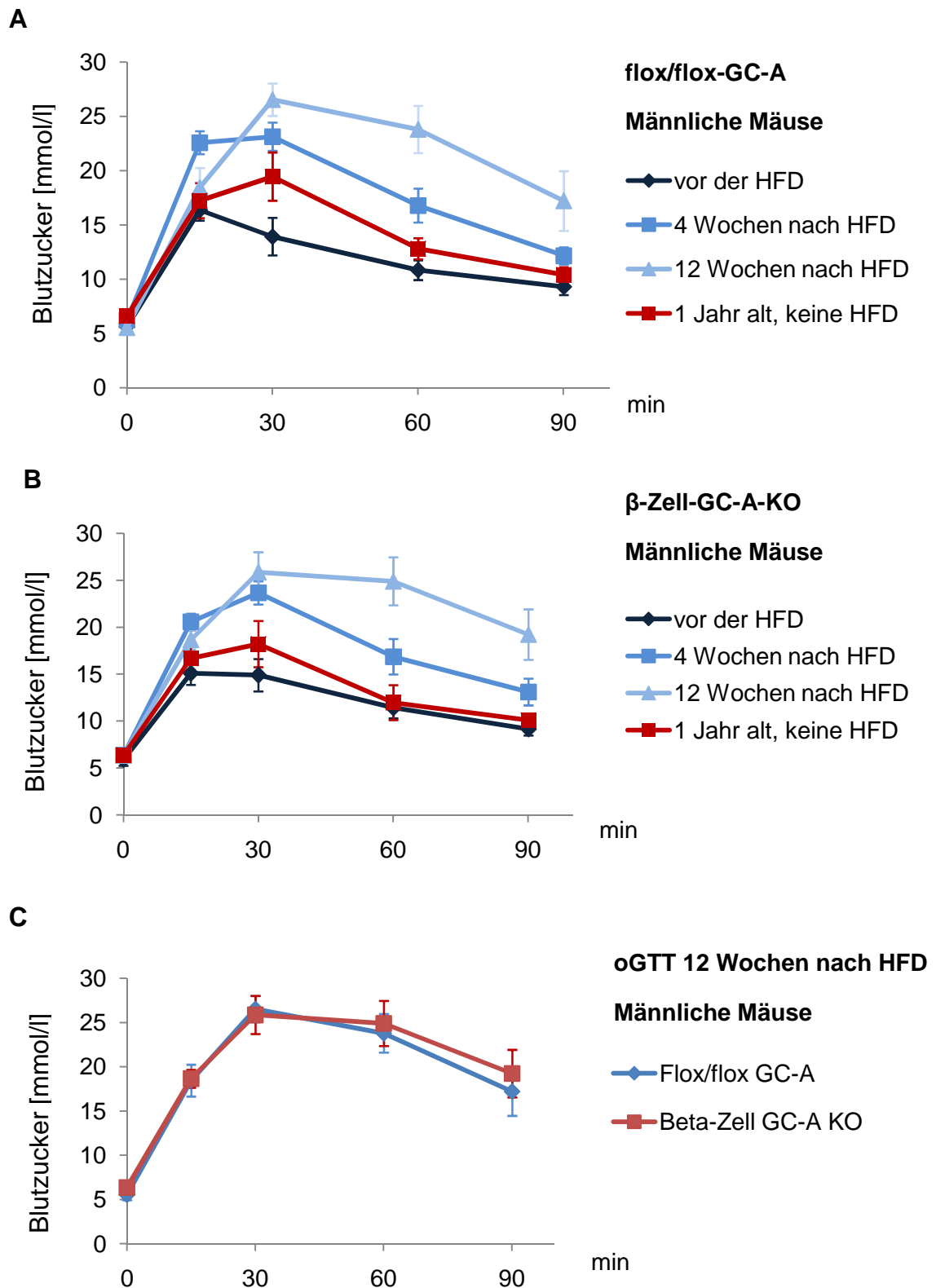


Abb. 32 A-C: Ergebnisse der oralen Glukosetoleranztests (oGTT) an männlichen Kontroll- und KO-Mäusen während der HFD. A: oGTT-Messungen an den Kontrollmäusen. Rote Linie: oGTT-Messung an 12 Monate alte Mäuse ohne HFD. B: oGTT-Messungen an KO-Mäusen. Rote Linie: oGTT-Messung an 12 Monate alte KO-Mäuse ohne HFD. C: Vergleich der oGTT-Messung der Kontroll- und KO-Mäuse 12 Wochen nach der HFD. $n = 7$. SE.

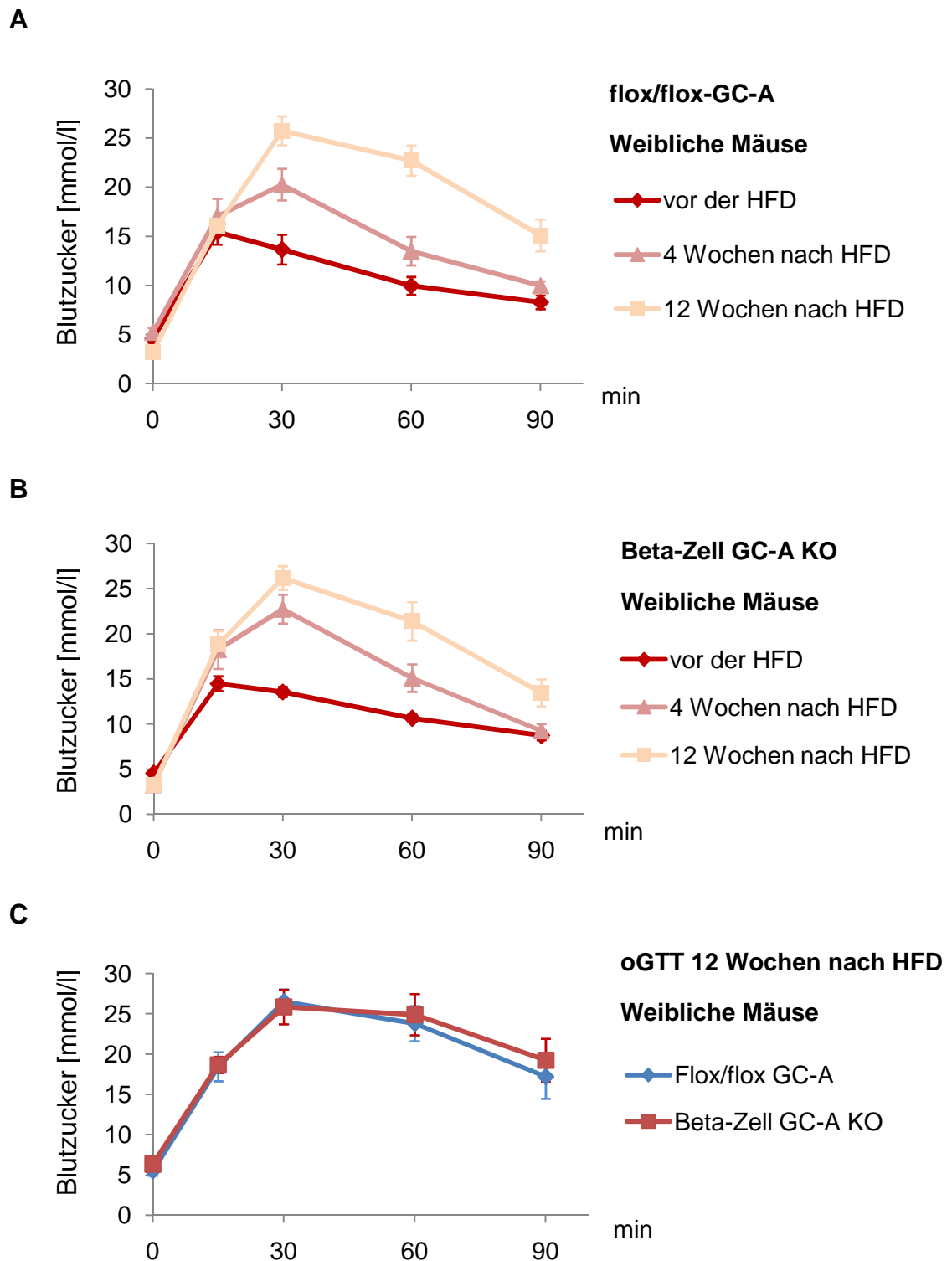


Abb. 33 A-C: Ergebnisse der oralen Glukosetoleranztests (oGTT) an weiblichen Kontroll- und KO-Mäusen während der HFD. A: oGTT-Messungen an den weiblichen Kontrollmäusen vor der Diät sowie nach 4 und 12 Wochen HFD. Rote Linie: oGTT-Messung an 12 Monate alte Mäuse ohne HFD. B: oGTT-Messungen an den weiblichen KO-Mäusen vor der Diät sowie nach 4 und 12 Wochen HFD. Rote Linie: oGTT-Messung an 12 Monate alte KO-Mäuse ohne HFD. C: Vergleich der oGTT-Messung der weiblichen Kontroll- und KO-Mäuse 12 Wochen nach der HFD. n = 7. SE.

3.2.2.4 Blutdruckmessungen

Am Ende der HFD wurde bei einer Auswahl an männlichen Mäusen der Blutdruck über eine Woche bestimmt. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen den KO-Mäusen und den Kontrollen festgestellt werden. Ein Vergleich mit den Blutdruckmessungen vor der HFD zeigt aber, dass der diastolische Blutdruck aufgrund der fetthaltigen Diät tendenziell erhöht ist (Abb. 34).

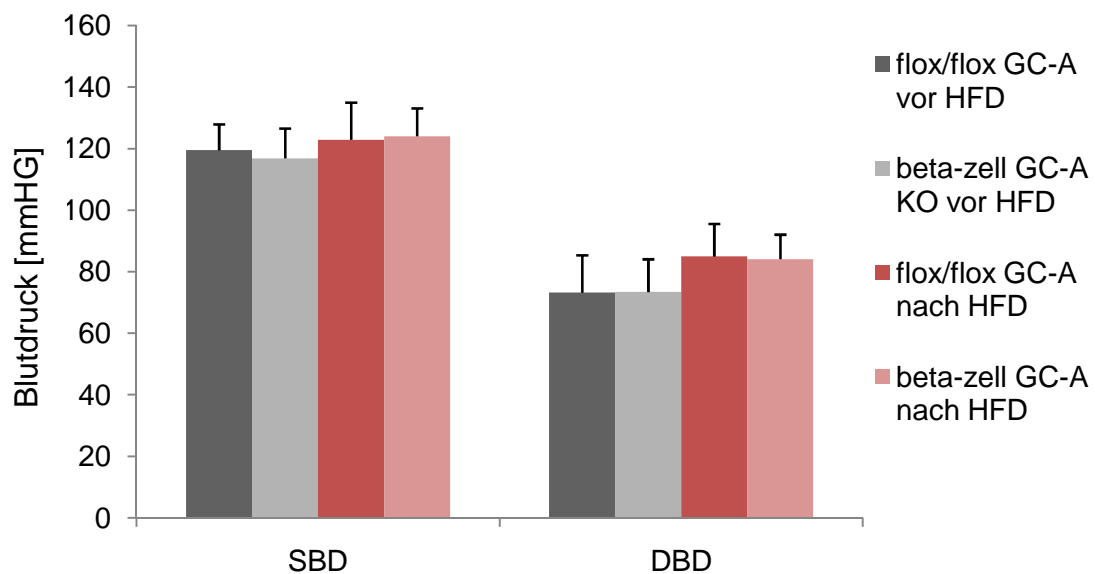


Abb. 34: Vergleich der Blutdruckmessungen vor und nach der HFD. SBD: systolische Blutdruck, DBD: Diastolische Blutdruck. Eine nicht-signifikante diastolische Blutdruckerhöhung ist nach der Diät sowohl bei Kontrolle als auch bei den KO-Mäusen erkennbar (n = 8).

3.2.2.5 Bestimmung der Herzgewichte

Es ist bereits bekannt, dass die Herzen von den β -Zell-GC-A-KO-Tieren unter normalen Bedingungen nicht hypertroph sind (vgl. 3.2.1.4). Um zu untersuchen, ob die fetthaltige Diät zu einer Herzhypertrophie bei den Kontrollen oder den KO-Tieren geführt hat, wurden die Herzen von jeweils 8 Tieren entnommen und gewogen. Das Körpergewicht der Tiere wurde zuvor bestimmt. Die Ratio von Herz-/Körpergewicht ist in Abb. 35 aufgeführt. Die fetthaltige Diät hat keine Herzhypertrophie ausgelöst.

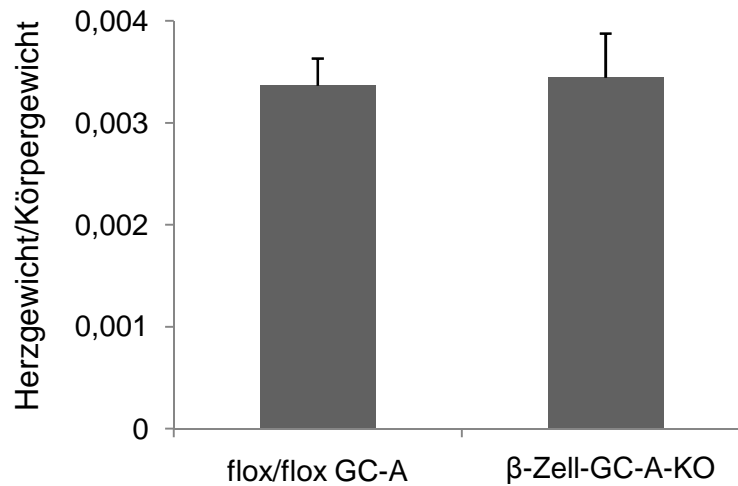


Abb. 35: Vergleich der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio zwischen den Kontroll- und KO-Tieren. Es besteht kein signifikanter Unterschied. n = 8.

3.2.2.6 Insulin-Sekretion

Nach Beendigung der dreimonatigen fettreichen Diät, wurden zwei männliche Mäuse aus der Kontroll- und KO-Gruppe ausgewählt, die in Gewicht und Verhalten im oGTT vergleichbar ähnlich waren. Den Mäusen wurde nach zervikaler Dislokation das Pankreas entnommen und die Inseln isoliert. Nach einer Inkubation mit 10^{-9} M ANP sowie entweder 6 mM Glukose oder 16 mM Glukose wurde der ausgeschüttete Insulingehalt mit einem Insulin-RIA gemessen. Bei der Inkubation mit 6 mM Glukose war die Insulinausschüttung aus den Inseln der KO-Mäuse signifikant erniedrigt (Abb. 36). Weitere Untersuchungen müssen noch durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob der Effekt durch die parallele Stimulation mit ANP hervorgerufen wird, oder ob die Inseln der KO-Tiere aufgrund der fettreichen Diät schwächer durch Glukose stimulierbar sind als die Inseln der Kontrollen.

Auch die Inkubation mit 16 mM Glukose führt bei den KO-Mäusen zu einer reduzierten Insulinausschüttung im Vergleich zu den Kontrollen.

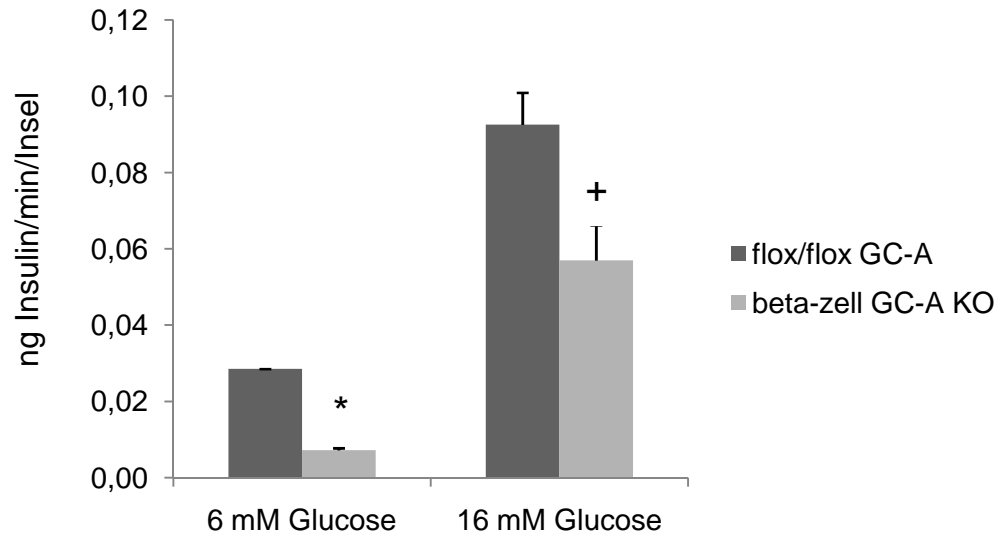


Abb. 36: Insulinsekretion nach 15 min Inkubation mit 10^{-9} M ANP sowie 6 mM oder 16 mM Glukose. Die Sekretion wurde an isolierten Inseln von flox/flox-GC-A- und β -Zell-GC-A-KO-Mäuse gemessen ($n = 4$, *: $p < 0.03$, +: $p = 0.056$).

3.2.2.7 Morphometrische Analyse von Langerhans-Inseln nach der HFD

Zur Überprüfung der Inselgröße und Anzahl der β -Zellen wurden die Pankreata von sechs Kontrollmäusen und sechs KO-Mäusen entnommen und in Formalin eingelegt. Die Organe wurden zu Rebecca Wagner, Toxikologie Tübingen, geschickt, welche daraus Gewebeschnitte angefertigt hat und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt hat.

Bei der morphometrischen Analyse wurden alle Inseln berücksichtigt, die auf den gefärbten Gewebeschnitten vorgefunden wurden. Insgesamt wurden 318 Inseln von Kontrolltieren und 275 Inseln von KO-Mäusen ausgewertet. Die durchschnittliche Anzahl der β -Zellen variierte nicht bei den Kontrollen und den KO-Mäusen (Kontrollen: 69,4 Zellen \pm 3,6 SEM; KO: 74,5 \pm 4,6 SEM). Die Inseln der KO-Mäuse wiesen aber eine durchschnittlich höhere Anzahl an α -Zellen auf (Kontrollen: 23,9 Zellen \pm 1,3 SEM; KO: 29,0 Zellen \pm 1,6 SEM; $p < 0.05$). Die durchschnittliche Inselfläche war bei den KO-Mäusen ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (Kontrollen: 95.927 Pixel \pm 5.304 SEM; KO: 123.333 Pixel \pm 8.017 SEM; $p < 0.001$). Auch die durchschnittliche Fläche der β -Zellen war bei den KO-Tieren leicht erhöht

(Kontrollen: 73.270 Pixel \pm 4.179 SEM; KO: 91.187 Pixel \pm 6.388 SEM; $p < 0.05$). Die durchschnittliche Fläche der α -Zellen variierte hingegen nicht zwischen den Kontrollen und den KO-Mäusen (Kontrollen: 16.022 Pixel \pm 3.263 SEM; KO: 19.194 Pixel \pm 1.243 SEM). Das Verhältnis von der β -Zellfläche zur Gesamtfläche der Insel ist signifikant erniedrigt bei den KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (Kontrollen: 0,76 \pm 0,005 SEM; KO: 0,71 \pm 0,006 SEM; $p << 0.0001$). Obwohl die Anzahl der β -Zellen nicht verändert war, so waren die einzelnen β -Zellen im Durchschnitt signifikant größer in den Inseln der KO-Mäuse (Kontrollen: 1.356 Pixel pro β -Zelle \pm 22 SEM; KO: 1.603 Pixel pro β -Zelle \pm 26 SEM; $p << 0.0001$). Die morphometrische Analyse deutet also auf einen Hypertrophie der β -Zellen in den KO-Mäusen hin.

4. Diskussion

4.1 Die dynamische Interaktion zwischen TRPC3/C6 und GC-A

Durch Ko-Immunpräzipitationen und FRET-Analysen konnte gezeigt werden, dass GC-A und TRPC3/C6 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen Komplex bilden und direkt miteinander interagieren. Es sind vermutlich kein weiterer Interaktionspartner für die Komplexbildung von GC-A und TRPC3/C6 nötig. Die Interaktion konnte nicht mit anderen Mitgliedern der TRPC-Familie, wie TRPC4 und TRPC5, nachgewiesen werden. Es scheint sich also um einen spezifischen Vorgang zwischen GC-A und TRPC3 bzw. C6 zu handeln.

Desweiteren wurde gezeigt, dass die Cyclase-Domäne der GC-A nicht verantwortlich für die Interaktion ist. Vermutlich spielt die Kinase-Homologe-(KH)- oder die Dimerisierungs-Domäne eine Rolle in der Komplexbildung von GC-A und TRPC3/C6. Bisher wurde noch keine Kinase-Aktivität für die KH-Domäne nachgewiesen (Potter 2005), ihre genaue Funktion ist noch nicht völlig geklärt. Allerdings ist bekannt, dass die KH-Domäne als Andockstelle für andere Proteine an die GC-A fungiert (Palczewski 2004). So bindet der *Heat shock protein* (HSP) 90-Komplex an die KH Domäne und beeinflusst dadurch die Stabilität und Aktivität der GC-A (Kumar 2001).

Die Expression von TRPC3/TRPC6 ist in HA-GC-A-überexprimierenden Mäusen vermindert. Es ist bereits bekannt, dass cGMP die Expression von TRPC6 negativ beeinflusst (Takahashi 2008). Daher ist die Expressionsverminderung von TRPC3/C6 vermutlich ein Effekt der Überexpression von HA-GC-A.

Die vorliegenden FRET-Ergebnisse bestätigen einen neuen cGMP-unabhängigen Signalweg für GC-A, da es zu keiner Änderung des FRET-Signales nach Zugabe von dem cGMP-Analogen 8-Br-cGMP kam. Eine Veränderung des Signals und damit ein Indiz für eine Konformationsänderung des GC-A-TRPC-Komplexes, war nur nach Zugabe von ANP messbar. Es wird daher angenommen, dass die aktivierte GC-A immer zu einer Aktivierung der TRPC3/C6-Kanäle führt, aber unter normalen Bedingungen phosphoryliert die durch cGMP stimulierte PKG I die TRPC3/C6-Kanäle, wodurch diese wieder inaktiviert werden.

In diesem Fall würde der neue cGMP-unabhängige Signalweg immer dann eine Rolle spielen, wenn in einer Zelle GC-A und TRPC3/C6 vorhanden sind und es nach Aktivierung der GC-A zu keiner cGMP-Bildung kommt bzw. wenn der cGMP/PKG I-Signalweg gestört wird. Es gibt verschiedene Szenarien, in denen genau dieser Fall eintreten kann. So kann der GC-A-Rezeptor kein cGMP mehr bilden, wenn er durch dauerhafte und hohe ANP-Spiegel desensibilisiert wird (Schröter 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die Desensibilisierung die Interaktion zwischen GC-A und TRPC3 beeinflusst. Trotz der Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors wurde ein FRET-Signal gemessen, was ein Indiz für die Konformationsänderung der Proteine zueinander ist. Die Desensibilisierung beeinflusst also nicht die Interaktion zwischen GC-A und TRPC3. Eine Desensibilisierung von GC-A tritt *in vivo* vor allem bei Patienten mit Herzhypertrophie oder mit Herzinsuffizienz auf, da bei diesen Patienten hohe ANP- und BNP-Spiegel gemessen werden (Kuhn 2004 B). Viele Menschen leiden an Herzinsuffizienz, was die Lebensqualität senkt und die Mortalität steigert. Zur Entwicklung von neuen Medikamenten und Therapiestrategien wäre es also von großem Vorteil, diesen Signalweg näher zu untersuchen. Das Vorhandensein von PKG I spielt für den neuen Signalweg eine ebenso wichtige Rolle. Einige Zelltypen haben ein sehr niedriges Expressionsniveau von PKG I, wie z.B. die mikrovaskulären Endothelzellen oder pankreatische β -Zellen (Kuhn 2003). Auch in diesen Zelltypen könnte der neue cGMP-unabhängige Signalweg von großer Bedeutung sein.

4.2 Generierung der β -Zell-spezifischen GC-A-KO-Mäuse

4.2.1 Vergleich des β -Zell-GC-A-KO-Mausmodells mit den globalen GC-A-KO-Mäusen

Es wurden bereits Untersuchungen zur Insulinhomöostase mit globalen GC-A-KO-Mäusen in der Arbeitsgruppe von Anna Ropero, unter der Leitung von Angel Nadal durchgeführt. So fanden Glukosetoleranztests und Insulintoleranztests bereits statt. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den Kontrollen und globalen KO-Tieren (Ropero 2010). Es traten keine spontanen Glukoseintoleranzen oder veränderte Insulinsensitivitäten *in vivo* auf

– allerdings konnte Ropero *in vitro* einige Unterschiede feststellen. So gab es *in vitro* bei den globalen KO-Tieren eine stärkere Glukose-induzierte Ca^{2+} -Antwort und eine geringere K_{ATP} -Kanal-Aktivität.

Insgesamt eignet sich das Mausmodell mit der globalen GC-A-Deletion aber wenig für Untersuchungen *in vivo*. Es gibt zu viele systemische Veränderungen wie Bluthochdruck, kardiale Hypertrophie und extrem hohe ANP-Plasmaspiegel, die die Insulinhomöostase beeinträchtigen können. Auch nur bezogen auf die Langerhans-Inseln könnte die globale Deletion erhebliche Auswirkungen haben. ANP beeinflusst z.B. positiv den Blutfluss in den Inseln (Carlsson 2001). Dieser positive Effekt fehlt bei den globalen KO-Mäusen. Außerdem kann mit dem globalen Mausmodell nicht untersucht werden, ob ANP auch als Inkretin wirkt. Es ist belegt, dass die humane Plasmakonzentration von ANP 30 Minuten nach einer Mahlzeit ansteigt. Bei Diabetikern ist dies nicht der Fall (Chattington 1998). ANP könnte also als ein Inkretin wirken, welches dann allerdings in der Magenschleimhaut anstatt dem Darm exprimiert wird (Qiu 2010).

Daher war es sinnvoll ein Mausmodell zu generieren, bei dem so wenig systemische Abweichungen auftreten wie möglich. Das neue Mausmodell mit der β -Zell-spezifischen GC-A-Deletion stellt eine optimale Alternative dar zur Untersuchung des Einflusses von ANP/GC-A auf die β -Zellen und auf den systemischen Insulinhaushalt.

4.2.2 Auswahl der Cre-Mauslinie für die Zucht

Zur Generierung einer β -Zell-spezifischen KO-Maus stehen verschiedene transgene Cre-Mauslinien zur Verfügung. Es besteht z.B. die Wahl zwischen PDX-1-Cre-, RIP-Cre-, RIP-CreER- und PDX-CreER-Mäuse, wobei innerhalb der Mauslinien wiederum unterschiedliche genetische Abstammungen auftreten können. Für die vorliegende Arbeit wurden *rat insulin II*-Promoter-(RIP)-Cre-Mäuse mit einem 129Sv/C57Bl6-Hintergrund aus der Herrera-Linie verwendet. Die RIP-Cre-Mäuse werden häufig in der Forschung eingesetzt, da sie eine hohe Expressionsrate an Cre-Rekombinase aufweisen und die Effizienz der Rekombination in den β -Zellen über 80% beträgt. Diese transgene Mauslinie wurde bereits in mindestens 21 Studien bzw. bei der Untersuchung von

mindestens 17 Genen verwendet (Lee 2006). Allerdings gibt es Belege dafür, dass die Cre-Rekombinase nicht nur in den β -Zellen, sondern auch im Hypothalamus exprimiert wird (Gannon 2000, Lin 2004). Es wurde bereits gezeigt, dass GC-A ebenfalls im Hypothalamus exprimiert wird (Jankowski 2004). Die um ANP konkurrierenden Rezeptoren GC-B und CNP weisen aber eine weitaus höhere Expression im Hypothalamus auf als der GC-A-Rezeptor (Langub 1995, Herman 1996). Trotzdem könnte eine murine Expression und eine spezifische Funktion von GC-A im Hypothalamus möglich sein. Es ist also nicht auszuschließen, dass in den generierten β -Zell-spezifischen GC-A-KO-Mäusen eine Deletion von GC-A im Hypothalamus vorliegt und diese Deletion eine Auswirkung auf den Phänotyp der KO-Mäuse hat.

Außerdem gibt es Evidenzen dafür, dass allein die Expression der Cre-Rekombinase in den β -Zellen zur Glukoseintoleranz führen kann (Lee 2006). So wurden in der Arbeitsgruppe von Lee einige der RIP-Cre-Mäuse, die von Jackson Laboratory bezogen wurden und einen reinen C57Bl6-Hintergrund besaßen, schon im Alter von 2 Monaten glukoseintolerant. Aber es gibt auch Studien bei denen es zu keiner Glukoseintoleranz bei den RIP-Cre-Mäusen kam (Fex 2007). Es wird vermutet, dass einzelne Unterschiede in den Mauslinien vorhanden sind, welche dazu führen, dass einige RIP-Cre-Mäuse die Intoleranz erwerben und andere nicht. Die hier verwendete Mauslinie stammt ursprünglich von Pablo Herrera (Medizinische Fakultät, Abteilung für genetische Medizin und Entwicklung, Universität Genf, Schweiz) und hat einen 129Sv/C57Bl6-Hintergrund. Bisher wurde in dieser Linie noch keine Glukoseintoleranz oder veränderte Insulinfreisetzung durch die Cre-Expression festgestellt. Aber es wäre von Vorteil, wenn zukünftig als Kontrollgruppe die reinen RIP-Cre-Mäuse mitgeführt werden würden.

4.2.3 GC-A-Expression in den β -Zell-GC-A-KO-Mäusen

Die generierten β -Zell-GC-A-KO-Mäuse sollen nur eine veränderte Expression von GC-A in den β -Zellen aufweisen. Westernblot-Analysen und immunhistochemische Vergleiche haben gezeigt, dass sich die Expression von GC-A in anderen Geweben erwartungsgemäß nicht verändert hat. Leider war es nicht möglich die GC-A-Expression im Hypothalamus und direkt in den β -

Zellen bzw. in den Langerhans-Inseln zu überprüfen. Diese Experimente hätten noch eine bedeutende Aussagekraft zur erfolgreichen Generierung gehabt. Aber die Expressionsrate von GC-A war in den Langerhans-Inseln zu niedrig um detektiert zu werden. Um ausreichend Material für mindestens 2 unabhängige Westernblot-Experimente zu erhalten, hätten zu viele Mäuse geopfert werden müssen, was ethisch nicht vertretbar war. Es wurden andere Experimente durchgeführt, um die Expression von GC-A in den Langerhans-Inseln zu überprüfen. So konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass die Expression von GC-A in den Langerhans-Inseln der KO-Mäuse niedriger ist, als in den Kontrollen. Auch wurde ein cGMP-RIA durchgeführt, der die Aktivität der GC-A in den Langerhans-Inseln misst. In den Langerhans-Inseln der KO-Mäuse kam es nach einer ANP-Inkubation zu einer niedrigeren cGMP-Bildung als in den Inseln der Kontrollen. Die cGMP-Bildung war in den KO-Inseln aber nicht völlig unterbunden. Auch dies war erwartungsgemäß, da die Inseln nicht nur aus β -Zellen bestehen. Die immunhistochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die GC-A-Expression besonders stark in den Kapillaren der Inseln vertreten ist (Abb. 25 B). Das gebildete cGMP der kapillaren GC-A-Rezeptoren wurde auch mit dem cGMP-RIA gemessen. Somit ist das erniedrigte cGMP-Signal aus den KO-Inseln ein weiteres Indiz für die erfolgreiche β -Zellspezifische Deletion der GC-A.

4.2.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Insulinsekretion

Basale Blutglukosemessungen haben ergeben, dass der Blutzuckerspiegel von älteren weiblichen β -Zell-GC-A-KO-Mäusen tendenziell erhöht ist im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dieser Effekt ist ausschließlich bei den weiblichen Mäusen aufgetreten; die basalen Blutzuckerspiegel von älteren männlichen KO-Mäusen waren identisch zu den Kontrollen.

Die Arbeitsgruppe von Soriano beschreibt 2009, dass 17β -Estradiol (E2) einen insulinotropen Effekt über den GC-A-Rezeptor ausübt. E2 inhibiert die K_{ATP} -Kanal-Aktivität und erhöht die Insulinfreisetzung. Dieser Effekt fehlt aber in globalen GC-A-KO-Mäusen. Daher muss E2 über GC-A interagieren bzw. GC-A einen Einfluss auf den Reaktionsweg nehmen. E2 wird als ein Estrogen vorwiegend in weiblichen Individuen produziert. Es erhöht die

Insulinbiosynthese und verstärkt die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) (Nadal 2009). Eigentlich müsste der Effekt in den jüngeren Weibchen deutlicher sein, da deren Estrogenspiegel höher ist als in den älteren Weibchen. Trotz allem ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Insulinhomöostase aufgrund des Hormonhaushaltes nicht auszuschließen.

Besonders in der Schwangerschaft spielen Estrogene eine bedeutende Rolle für die Insulinhomöostase. Während der Schwangerschaft steigt die Konzentration von Estrogenen im Blut um das 30fache an (Nadal 2009). Auch der Konzentrationsspiegel von anderen Hormonen ändert sich schwangerschaftsbedingt. Aufgrund des veränderten Hormonhaushaltes bildet sich eine periphere Insulinresistenz aus. Diese ist essentiell für den Fetus, denn dadurch erfolgt die Glukoseaufnahme der Mutter verzögert und die Versorgung des ungeborenen Kindes kann gewährleistet werden. Um trotzdem die Blutzuckerspiegel im physiologischen Bereich zu halten, müssen die Langerhans-Inseln die Insulinsekretion adaptieren. Die periphere Insulinresistenz führt daher zu einer erhöhten Insulinbiosynthese, einer verstärkten GSIS und einer Zunahme der β -Zellmasse. Erfolgt diese Anpassung der Inseln nicht, so kann Schwangerschaftsdiabetes auftreten (Nadal 2009). Dieses Beispiel soll verdeutlichen, weshalb eine geschlechtsspezifische Untersuchung der Insulinsekretion, so wie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen, sinnvoll ist. In anderen Arbeiten wurden z.B. ausschließlich weibliche Individuen verwendet (Ropero 2010), damit Abweichungen aufgrund des Geschlechtsunterschiedes die Ergebnisse nicht verfälschen.

4.3 Auswertung der *high fat diet*-Studie

4.3.1 Die Gewichtszunahme

Eine kontinuierliche Gewichtszunahme der Mäuse während der HFD war zu erwarten, da die Tieren aufgrund der fetthaltigen Diät mehr Kalorien aufgenommen haben, als sie für ihre physische Aktivität benötigen. Durch die Gewichtszunahme kam es vermutlich nicht nur zu einigen hormonellen

Umstellungen, laut mehreren Studien ist auch die Expression von GC-A bzw. die ANP-Ausschüttung verändert.

Es gibt eine inverse Korrelation zwischen dem Body Mass Index (BMI) und den NP-Konzentrationen (Sarzani 2008 A). Übergewichtige Mäuse setzen also weniger ANP bzw. BNP frei als normalgewichtige Mäuse. Bei einer fetthaltigen Diät ist außerdem die Expression von GC-A im Skelettmuskel und Fettgewebe herunterreguliert (Wang 2007). Die Expression von GC-A im weißen Fettgewebe wird zusätzlich noch reziprok reguliert durch eine vermehrte Insulinausschüttung (Nakatsuji 2010).

Auf der anderen Seite inhibiert ANP die Glukagonsekretion, dem Gegenspieler von Insulin (Verspohl 1996). Dies könnte ein Grund sein, weshalb globale GC-A-KO-Mäuse ein vermindertes Körpergewicht haben (Ropero 2010). Natürlich darf nicht außer Acht gelassen werden, dass globale GC-A-KO-Mäuse einen ausgeprägten Phänotyp besitzen, der durch genetisch bedingten hypervolämischen Bluthochdruck, kardiale Hypertrophie, hohe ANP-Plasmaspiegel und wahrscheinlich noch viele weitere Veränderungen gekennzeichnet ist. All diese physiologischen Veränderungen können Einfluss auf die Gewichtszunahme nehmen.

Die hier generierten β -Zell-GC-A-KO-Mäuse hatten zwar kein signifikant vermindertes Körpergewicht, aber auch sie waren tendenziell leichter als die Kontrollmäuse. Diese leichten Gewichtsunterschiede wurden auch außerhalb der HFD beobachtet (Daten hier nicht gezeigt). Es kann also vermutet werden, dass es sich hierbei bereits um einen kleinen Effekt der konditionellen Deletion handelt. Der genaue Mechanismus der verminderten Gewichtsentwicklung bleibt allerdings unklar. Eigentlich ist anzunehmen, dass die insulinotrope Wirkung des ANP/GC-A-Systems die Kontrollmäuse besser vor Gewichtsveränderungen schützt als die KO-Mäuse. Eine Untersuchung von einer größeren Kohorte könnte Aufschluss geben, ob die KO-Mäuse tatsächlich stets leichter sind als die Kontrolltiere.

4.3.2 Ausbildung der Insulinresistenz

Die oralen Glukosetoleranztests, welche während der HFD durchgeführt wurden, haben deutlich gezeigt, dass die fetthaltige Ernährung zu einer

verminderten Insulinwirkung geführt hat. Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass eine fetthaltige Diät in dem hier verwendeten Mausstamm (129/SVxC57BL6) zur Ausbildung einer Insulinresistenz führt (Nishikawa 2007). In der Studie ist die Insulinresistenz geschlechtsspezifisch besonders bei den Männchen aufgetreten. In der vorliegenden Arbeit gab es dagegen keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Ausbildung der Insulinresistenz. Die verminderte Insulinsensitivität ist bei den Kontrolltieren und den KO-Mäuse etwa gleichstark ausgebildet. Die β -Zell-spezifische GC-A-Deletion hat also weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die Ausbildung einer peripheren Insulinresistenz ausgeübt.

Die aufgrund der fettreichen Ernährung erworbene Insulinresistenz könnte aber mit ANP zu tun haben. Denn ANP spielt eine große Rolle in dem Lipidhaushalt. Es inhibiert das humane viszerale Adipozytenwachstum (Sarvani 2008 B). Sowohl ANP als auch BNP stimulieren cGMP-abhängig die Lipolyse und die Lipidmobilisierung durch Adipozyten (Sengenès 2003, Birkenfeld 2005). Die cGMP-Produktion in den Adipozyten führt zur Aktivierung der PKG I, die die hormonsensitive Lipase (HSL) phosphoryliert und somit zur Hydrolyse von Triacylglycerol zu nicht-veresterten Fettsäuren (NEFA) und Glycerol führt (Lafontan 2008). Das Fettgewebe wiederum übt eine wichtige endokrine Funktion aus durch die Sekretion verschiedener Adipokine und Zytokine wie IL-6, IL-8, TNF α , MCP1 oder RBP4. Diese proinflammatorischen Botenstoffe können die Insulinaufnahme in den Skelettmuskel inhibieren und spielen daher eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer Insulinresistenz. ANP senkt normalerweise die Sekretion von einigen dieser Substanzen (IL-6, TNF α , RBP; Moro 2007) und könnte so vor der Entwicklung einer Insulinresistenz schützen. Durch die fetthaltige Diät ist aber die Expression von GC-A im Fettgewebe herunterreguliert (Wang 2007) und die NP-Plasmaspiegel sind gesenkt (Sarvani 2008 A). Auch stehen niedrige BNP-Plasmaspiegel in Zusammenhang mit der Entwicklung von Insulinresistenzen und dem metabolischen Syndrom (Wang 2007, Khan 2011).

4.3.3 Veränderte Insulinausschüttung bei den β -Zell-GC-A-KO-Mäusen

Um zu überprüfen, ob die β -Zellen der konditionellen GC-A-KO-Mäuse eine verminderte Insulinsekretion ausüben, wurde nach Beendigung der HFD ein Insulin-RIA durchgeführt. Es wurde dabei die Insulinsekretion in Anwesenheit von 1 nM ANP und 6 mM Glukose gemessen. Die β -Zellen der konditionellen KO-Mäuse haben signifikant weniger Insulin ausgeschüttet als Zellen der Kontrolltiere. Das liegt vermutlich an dem insulinotropen Effekt von ANP, der nur in den Kontrollmäusen wirken konnte. Bei der Inkubation mit ANP und 16 mM Glukose gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den Inseln der KO-Mäuse. Eine Glukosestimulation dieser Größenordnung führt zur maximalen Insulinfreisetzung und vermutlich kommt es dann zu keiner weiteren Modulation der Sekretion durch andere Substanzen wie ANP.

Allerdings müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die verminderte Insulinausschüttung tatsächlich nur ein Effekt der ANP-Inkubation ist, oder ob die Inseln der KO-Mäuse generell weniger Insulin ausschütten. Denn bei der Inkubation mit 16 mM Glukose und ANP gab es zwar keinen signifikanten Unterschied, aber die Insulinsekretion der GC-A-KO- β -Zellen war tendenziell niedriger.

4.3.4 Adaption der β -Zellgröße

Die morphometrischen Analysen der Langerhans-Inseln nach der HFD haben ergeben, dass die KO-Mäuse größere Inseln mit weniger Anteil an β -Zellen aufweisen. Das geht einher mit anderen Studien, die belegen, dass der Anteil an β -Zellen im T2DM reduziert ist (Khan 2009). Weitere Studien haben gezeigt, dass ANP wichtig für die Proliferation der β -Zellen ist (You 2009). Und zwar zeigten Westernblot Analysen und quantitative RT-PCR, dass ANP die Proliferation der β -Zellen über die Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die Phosphorylierung von AKT und Foxo1a (Forkhead transcription factor) und über die Induktion des Transkriptionsfaktors *pancreatic and duodenal homeobox 1* (PDX1) steuert. Dadurch wird zyklisches D2 exprimiert,

ein G1-Phase Zyklin, welches für die β -Zell-Replikation in der postnatalen Entwicklung bedeutend ist (You 2009).

Trotz der geringeren β -Zellfläche, waren die einzelnen β -Zellen der KO-Mäuse deutlich größer im Vergleich zu den Kontrollen. Die Hypertrophie der β -Zellen könnte eine alternative Adaptation sein, da ohne GC-A-Rezeptor die Proliferation der β -Zellen vermindert stimuliert wird.

5. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen das Vorhandensein einer stabilen Proteinverbindung zwischen GC-A und TRPC3/C6, die für den neuen cGMP-unabhängigen Signalweg von GC-A ausschlaggebend ist. Mit diesen Erkenntnissen könnten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien gegen Herzinsuffizienz zu finden. Auch sollte zukünftig die Bedeutung der Interaktion zwischen TRPC3/C6 und GC-A für mikrovaskulären Endothelzellen oder pankreatische β -Zellen geklärt werden. Der neue cGMP-unabhängige Signalweg könnte wertvolle Erkenntnisse für die Grundlagenforschung dieser Zelltypen bringen.

Die β -Zell-GC-A-KO-Mäuse, welche für die vorliegende Arbeit gezüchtet wurden, bieten viele Vorteile gegenüber dem bisher verwendeten globalen GC-A-KO-Mausmodell. Die β -Zell-GC-A-KO-Mäuse haben weniger systemische Veränderungen wie Bluthochdruck oder Herzhypertrophie. Damit eignet sich das neue Mausmodell sehr gut für *in vivo*-Untersuchungen zur Bedeutung des ANP/GC-A-Systems für die Insulinausschüttung. Weitere Experimente sollte daher folgen, um die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet zu vervollständigen und eventuell neue Therapieansätze für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 zu erlangen.

6. Anhang

Literaturverzeichnis

Ashcroft SJ, Randle PJ (1968). Control of insulin release by glucose. *Proc.R.Soc.Med* 61: 814-815.

de Bold AJ, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M, Khoshbaten A (2001). The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 79:705-14.

Birkenfeld AL, Boschmann M, Moro C, Adams F, Heusser K, Franke G, Berlan M, Luft FC, Lafontan M, Jordan J (2005). Lipid mobilization with physiological atrial natriuretic peptide concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3622-8.

Carlsson PO, Andersson A, Jansson L (2001). Cardiac natriuretic peptides and pancreatic islet blood flow in anesthetized rats. *Horm Metab Res* 33:181-5.

Chattington PD, Anderson JV, Rees LH, Leese GP, Peters JR, Vora JP (1998). Atrial natriuretic peptide in type 2 diabetes mellitus: response to a physiological mixed meal and relationship to renal function. *Diabet Med* 15:375-9.

Chinkers M, Garbers DL (1989). The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* 245:1392-4.

Chinkers M, Wilson EM (1992). Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J Biol Chem* 267:18589-97.

Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, Shaknovich A, Pondolfino K, Clark M, Camargo MJ, Scarborough RM, Lewicki JA (1986). Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* 78:13.

Creutzfeldt W (2001). The entero-insular axis in type 2 diabetes - incretins as therapeutic agents. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 109 Suppl 2: S288-S303.

Cryer DR, Eccleshall R, Marmur J (1975). Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol* 12:39-44.

Currie MG, Geller DM, Cole BR, Boylan JG, YuSheng W, Holmberg SW, Needleman P (1983). Bioactive cardiac substances: potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science* 221:71-3.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML (2009). Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3 β /mTOR signaling pathway. *Basic Res Cardiol* 104:653-67.

Earley S, Brayden JE (2010). Transient receptor potential channels and vascular function. *Clin Sci (Lond)* 119:19-36.

Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC Jr (1988). Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 62:191-5.

Fex M, Wierup N, Nitert MD, Ristow M, Mulder H (2008). Rat insulin promoter 2-Cre recombinase mice bred onto a pure C57BL/6J background exhibit unaltered glucose tolerance. *J Endocrinol* 194:551-5.

Förster T (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik* 437:55.

Gannon M, Shiota C, Postic C, Wright CV, Magnuson M (2000). Analysis of the Cre-mediated recombination driven by rat insulin promoter in embryonic and adult mouse pancreas. *Genesis* 26:139-42.

Giani G, Janka HU, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A, Rathmann W, Rosenbauer J (2004). Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) - Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland.

Guney MA, Gannon M (2009). Pancreas cell fate. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87:232-48.

Henderson JR, Moss MC (1985). A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas. *Q J Exp Physiol* 70:347-56.

Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC Jr (1996). Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165-87.

Herrera PL (2000). Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127:2317-22.

Hien P, Böhm B (2007). *Diabetes-Handbuch - Eine Anleitung für Praxis und Klinik*. Springer, 5. Auflage: 91-117.

Holtwick R, Gotthardt M, Skryabin B, Steinmetz M, Potthast R, Zetsche B, Hammer RE, Herz J, Kuhn M (2002). Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7142-7.

Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M (2003). Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 111:1399-407.

Jankowski M, Reis AM, Wang D, Gutkowska J (2004). Postnatal ontogeny of natriuretic peptide systems in the rat hypothalamus. *Dev Brain Res* 152:39-46.

Jensen MV, Joseph JW, Ronnebaum SM, Burgess SC, Sherry AD, Newgard CB (2008). Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1287-97.

Kahn SE, Zraika S, Utzschneider KM, Hull RL (2009). The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality. *Diabetologia* 52:1003–1012.

Kerner W, Brückel J, Böhm BO (2004). Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) - Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus.

Khan AM, Cheng S, Magnusson M, Larson MG, Newton-Cheh C, McCabe EL, Coviello AD, Florez JC, Fox CS, Levy D, Robins SJ, Arora P, Bhasin S, Lam CS, Vasan RS, Melander O, Wang TJ (2011). Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies. *J Clin Endocrinol Metab* 96:3242-9.

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.

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 (2011). 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* 108:18500-5.

Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O, Rockman HA, Maeda N (2001). Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 107:975-84.

Kuhn M (2003). Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 93:700-9.

Kuhn M (2004 A). Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res Cardiol* 99:76-82.

Kuhn M, Voss M, Mitko D, Stypmann J, Schmid C, Kawaguchi N, Grabellus F, Baba HA (2004 B). Left ventricular assist device support reverses altered cardiac expression and function of natriuretic peptides and receptors in end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 64:308-14.

Kuhn M, Völker K, Schwarz K, Carbajo-Lozoya J, Flögel U, Jacoby C, Stypmann J, van Eickels M, Gambaryan S, Hartmann M, Werner M, Wieland T, Schrader J, Baba HA (2009 A). The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 119:2019-30.

Kuhn M (2009 B). Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handb Exp Pharmacol* 191:47-69.

Kumar R, Grammatikakis N, Chinkers M (2001). Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor by heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 276:11371-5.

Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenès C, Galitzky J (2008). Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. *Trends Endocrinol Metab* 19:130-7.

Langub MC Jr, Dolgas CM, Watson RE Jr, Herman JP (1995). The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 7:305-9.

Lee JY, Ristow M, Lin X, White MF, Magnuson MA, Hennighausen L (2006). RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic beta-cell function. *J Biol Chem* 281:2649-53.

Lin X, Taguchi A, Park S, Kushner JA, Li F, Li Y, White MF (2004). Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest* 114:908-16.

Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22:307-12.

Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A (1995). Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378:65-8.

Misono KS, Grammer RT, Fukumi H, Inagami T (1984). Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 123:444-51.

Mitchell P, Moyle J (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213:137-139.

Moro C, Klimcakova E, Lolmède K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, Bouloumié A, Galitzky J, Arner P, Langin D (2007). Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* 50:1038-47.

Nakatsuji H, Maeda N, Hibuse T, Hiuge A, Hirata A, Kuroda Y, Kishida K, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I (2010). Reciprocal regulation of natriuretic peptide receptors by insulin in adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun* 392:100-5.

Newgard CB, McGarry JD (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu.Rev.Biochem* 64: 689-719.

Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K (2007). Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim* 56:263-72.

Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* 25:5305-16.

Palczewski K, Sokal I, Baehr W (2004). Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1123-30.

Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M (2000). Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:931-6.

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 (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 17:3045-51.

Potter LR (2005). Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci* 10:1205-20.

Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27:47-72.

Puff R (2010). Neue zelluläre und molekulare Aspekte der Betazell-dysfunktion beim Typ-2-Diabetes mellitus. Diss. München.

Qiu ZX, Mei B, Wu YS, Huang X, Wang ZY, Han YF, Lu HL, Kim YC, Xu WX (2010). Atrial natriuretic peptide signal pathway upregulated in stomach of streptozotocin-induced diabetic mice. *World J Gastroenterol* 16:48-55.

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619-47.

Ropero AB, Fuentes E, Rovira JM, Ripoll C, Soria B, Nadal A (1999). Non-genomic actions of 17beta-oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol* 521:397-407.

Ropero AB, Soriano S, Tudurí E, Marroquí L, Téllez N, Gassner B, Juan-Picó P, Montanya E, Quesada I, Kuhn M, Nadal A (2010). The atrial natriuretic peptide and guanylyl cyclase-A system modulates pancreatic beta-cell function. *Endocrinology* 151:3665-74.

Rorsman P, Renstrom E (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045.

Sadoshima J, Izumo S (1993). Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73:413-23.

Sarzani R, Salvi F, Dessì-Fulgheri P, Rappelli A (2008 A). Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J Hypertens* 26:831-43.

Sarzani R, Marcucci P, Salvi F, Bordicchia M, Espinosa E, Mucci L, Lorenzetti B, Minardi D, Muzzonigro G, Dessì-Fulgheri P, Rappelli A (2008 B). Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. *Int J Obes (Lond)* 32:259-67.

Sauer B, Henderson N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5166–5170.

Schröter J, Zahedi RP, Hartmann M, Gassner B, Gazinski A, Waschke J, Sickmann A, Kuhn M (2010). Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *FEBS J* 277:2440-53.

Sengenes C, Bouloumie A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, Galitzky J (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278:48617-26.

Skryabin BV, Holtwick R, Fabritz L, Kruse MN, Veltrup I, Stypmann J, Kirchhof P, Sabrane K, Bubikat A, Voss M, Kuhn M (2004). Hypervolemic hypertension in mice with systemic inactivation of the (floxed) guanylyl cyclase-A gene by alphaMHC-Cre-mediated recombination. *Genesis* 39:288-98.

Soriano S, Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Quesada I, Gassner B, Kuhn M, Gustafsson JA, Nadal A (2009). Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17{beta}-estradiol in pancreatic {beta}-cells involves the estrogen receptor {beta} and the atrial natriuretic peptide receptor. *Mol Endocrinol* 23:1973-82.

Soualmia H, Barthélemy C, Masson F, Maistre G, Eurin J, Carayon A (1997). Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 29:605-11.

Stasch JP, Hirth-Dietrich C, Kazda S, Neuser D (1989). Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life Sci* 45:869-75.

Straub SG, Sharp GW (2002). Glucose-stimulated signaling pathway in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18:451-463.

Stryer L (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem* 47:819-46.

Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori MX, Honda A, Inoue R (2008). Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol* 586:4209-23.

Tsai EJ, Kass DA (2009). Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 122:216-38.

Verspohl EJ, Bernemann IK (1996). Atrial natriuretic peptide (ANP)-induced inhibition of glucagon secretion: mechanism of action in isolated rat pancreatic islets. *Peptides* 17:1023-9.

Wang TJ, Larson MG, Keyes MJ, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS (2007). Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory individuals. *Circulation* 115:1345-53.

Wilson EM, Chinkers M (1995). Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34:4696-701.

You H, Laychock SG (2009). Atrial natriuretic peptide promotes pancreatic islet beta-cell growth and Akt/Foxo1a/cyclin D2 signaling. *Endocrinology* 150:5455-65.

You H, Laychock SG (2011). Long-term treatment with atrial natriuretic peptide inhibits ATP production and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E435-44.

Publikation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstand folgende Veröffentlichung:

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 (2011). 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. Nov;108(45):18500-5.

* Geteilte Erstautorenschaft

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde folgende Posterpräsentation durchgeführt:

Dankworth B, Klaiber M, Hartmann M, Nikolaev VO, Gaßner B, Kuhn M (2011). A dynamic interaction between a transient receptor potential canonical channel (TRPC3) and guanylyl cyclase-A, the receptor for atrial natriuretic peptide. 90. Jahrestag der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG) in Regensburg.

Für diese Posterpräsentation wurde von der DPG der Posterpreis in der Kategorie „*Vascular signal transduction in physiology*“ vergeben.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalienliste mit Herstellern	24
Tabelle 2: Primär-Antikörper	25
Tabelle 3: Sekundär-Antikörper	25
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Plasmide	26
Tabelle 5: Auflistung der Primer für PCR-Experimente	29
Tabelle 6: Zyklusprogramm für die „Flox“ PCR (Primer MK115/MK116)	29
Tabelle 7: Zyklusprogramm für die „KO“ PCR (Primer MK116/MK117)	29
Tabelle 8: Zyklusprogramm für die „Cre“ PCR (Primer Cre800/Cre1200)	30
Tabelle 9: Anzahl der Versuchstiere, aufgeteilt nach Geschlecht und Genotyp	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Struktur eines funktionellen GC-A Rezeptor Dimers	10
Abb. 2:	Die cGMP Signalkaskade	12
Abb. 3:	Schema der Ang II-induzierten NFAT-Aktivierung in Kardiomyozyten	15
Abb. 4:	Schema zum GC-A/TRPC3/C6-vermittelten Ca ²⁺ -Einstrom in Kardiomyozyten.	16
Abb. 5:	Der zelluläre Mechanismus der Glukose-abhängigen Insulinsekretion	18
Abb. 6:	Cre/loxP-vermitteltes Ausschneiden von DNA	21
Abb. 7:	Primerposition von MK115/MK116 (orange) und MK117/MK116 (blau) auf dem geflochtenen GC-A Gen	29
Abb. 8:	Ko-IP von TRPC3 mit Flag-GC-A, Flag-GC-A _{D893A} und Flag-GC-A _{Δ863-1057} aus Membranlysat transfizierter HEK293-Zellen.	43
Abb. 9:	Ko-IP von TRPC6 mit Flag-GC-A, Flag-GC-A _{D893A} und Flag-GC-A _{Δ863-1057} aus Membranlysat transfizierter HEK293-Zellen	43
Abb. 10:	Ko-IP von TRPC4 und TRPC5 mit Flag-GC-A aus Membranlysat transfizierter HEK293-Zellen.	44
Abb. 11:	Westernblot mit 100 µg Herzlysat aus verschiedenen wildtyp und transgenen Mäusen.	45
Abb. 12:	Statistische Auswertung der Bandenintensität zu Abb. 11.	45
Abb. 13:	Ko-Immünpräzipitation von TRPC3/C6 mit HA-GC-A aus transgenem Herzgewebe.	46
Abb. 14:	Repräsentative Kurve von FRET Signalen in GC-A-CFP und TRPC3-YFP kotransfizierten HEK293-Zellen unter basalen Bedingungen und bei Inkubation mit 8-Br-cGMP und ANP.	47
Abb. 15:	Konzentrationsabhängige Effekte von ANP auf die FRET Signale in GC-A-CFP und TRPC3-YFP kotransfizierten HEK293-Zellen.	48
Abb. 16:	Schematische Darstellung der exprimierten Proteine und die Lage ihres Fluorophor-Anhanges.	48
Abb. 17:	FRET-Experimente mit einem trunkierten GC-A-Protein führen ebenfalls zu einer ANP-abhängigen Veränderung des Signals	49
Abb. 18:	Repräsentatives FRET-Experiment mit Kontrollzellen und desensitisierten Zellen.	50

Abb. 19:	PCR mit genomischer DNA aus Geweben von β -Zell-GC-A-KO Mäusen.	51
Abb. 20:	PCR mit genomischer DNA aus Inseln von β -Zell-GC-A-KO Mäusen und flox/flox-Mäusen.	52
Abb. 21:	Westernblot-Analyse von Inselzelllysat und Nierenlysat von GC-A +/+, β -Zell-GC-A-KO- und GC-A -/- Mäusen.	53
Abb. 22A:	Westernblot-Analyse des Lungengewebes von β -Zell-GC-A-KO- und flox/flox-GC-A Mäusen.	54
Abb. 22B:	Westernblot-Analyse des Nierengewebes von β -Zell-GC-A-KO- und flox/flox-GC-A Mäusen.	54
Abb. 23:	Statistische Auswertung der Bandenintensität des Lungen- und Nierengewebes (Abb. 22).	54
Abb. 24:	HE-Färbung von Pankreasschnitten mit Fokus auf eine Langerhans-Insel (x400).	55
Abb. 25:	HE-Färbung von Lungengewebe.	56
Abb. 26:	Blutdruckmessungen an flox/fox-GC-A Mäusen (n = 8) und β -Zell-GC-A-KO Mäusen (n = 7).	57
Abb. 27:	Statistische Auswertung der Herzgewicht/Körpergewicht Messung.	58
Abb. 28:	Basale Glukosespiegel nach 14 h fasten.	59
Abb. 29:	Basale Glucosespiegel nach 14 h fasten.	59
Abb. 30:	Statistische Auswertung des cGMP-RIAs mit Inseln aus flox/flox GC-A- und β -Zell-GC-A-KO Mäusen.	60
Abb. 31:	Murine Gewichtsveränderung innerhalb der <i>high fat diet</i> -Studie.	62
Abb. 32:	Ergebnisse der oralen Glukosetoleranztests (oGTT) an männlichen Kontroll- und KO-Mäusen während der HFD.	64
Abb. 33:	Ergebnisse der oralen Glukosetoleranztests (oGTT) an weibliche Kontroll- und KO-Mäuse während der HFD.	65
Abb. 34:	Vergleich der Blutdruckmessungen vor und nach der HFD.	66
Abb. 35:	Vergleich der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio zwischen Kontroll- und KO-Tiere.	67
Abb. 36:	Insulinsekretion nach 15 min Inkubation mit 10^{-9} M ANP sowie 6 mM oder 16 mM Glukose.	68

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretische Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
Br	Brom
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
Cre	<i>cyclization recombination</i>
DAG	Diacylglycerol
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> („und andere“)
evtl.	eventuell
FCS	Fetales Kälberserum
fmol	femtomol
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAPDH	Gylzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-A	Guanylyl Cyclase A
GLUT2	Glukosetransporter Typ 2
GSIS	Glukose-stimulierte Insulinsekretion
HA	Humanes Influenza-Hemagglutinin
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
IP	Immunpräzipitation
K	Kalium
KO	<i>knock out</i>
l	Liter
loxP	locus of x-over of P1
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i>
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
oGTT	orale Glukosetoleranztest
PBS	<i>Phosphat-buffered Saline</i>

pcmv	Cytomegalie-Virus-Promoter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
Prof.	Professor
RIA	Radioimmunassay
RIP	<i>rat insulin II promoter</i>
RGS2	<i>regulator of G protein signaling</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEM	Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TRPC	<i>transient receptor potential canonical channel</i>
U	Unit
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Endvolumen
w/v	Masse pro Endvolumen
YFP	<i>Yellow-fluoreszierendes Protein</i>
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Ich danke Prof. Michaela Kuhn für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation am Institut für Physiologie I sowie für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Prof. Thomas Müller möchte ich mich für die unkomplizierte Vertretung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bedanken.

Ganz besonders danke ich Heike Oberwinkler für ihre Hilfsbereitschaft bei den unzähligen Experimenten, bei denen sie mich tatkräftig unterstützt hat.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Gisela Drews und Dr. Martina Düfer (Institut für Pharmakologie, Universität Tübingen) für ihre guten wissenschaftlichen Ratschläge und der kompetenten Beratung von offenen Fragen.

Rebecca Wagner (Institut für Pharmakologie, Universität Tübingen) danke ich herzlich für die Anfertigung der Pankreas-Gewebeschnitte sowie der mühevollen Dokumentation der Langerhans-Inseln.

Dr. Viacheslav Nikolaev (Abteilung für Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen) danke ich für die Unterstützung bei den FRET-Experimenten und für die angenehme Zusammenarbeit.

Bei Prof. Hideo Baba (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen) bedanke ich mich für die Anfertigung der Immunhistochemischen Gewebeschnitte.

Birgit Gaßner danke ich für die Durchführung der RIA-Experimente sowie für die freundliche Hilfe im Labor und im Tierstall.

Weiterhin danke ich allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppen Kuhn, Friebe und Schuh für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Beatrice Dankworth
Geburtsdatum: 07.07.1984
Geburtsort: 38820 Halberstadt
Familienstand: ledig

Werdegang

Sep. 1995 – Jul. 2004: Käthe-Kollwitz-Gymnasium Halberstadt

Allgemeine Hochschulreife

**Okt. 2004 – Dez. 2009: Studium „Molecular Life Science“ an der
Universität zu Lübeck**

Sep. 2007: Bachelor of Science

Thema: „Molekulargenetische Analysen zum Cornelia de Lange Syndrom: RNA-Analyse von potentiellen Spleißstellen-Mutationen im humanen *NIPBL* Gen“. Durchgeführt am Institut für Humangenetik, Universität zu Lübeck.

Feb. 2010: Master of Science

Thema: „Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der Guanylyl Cyclase A, dem Rezeptor für das Herzormon ANP“. Durchgeführt am Institut für Physiologie I, Universität Würzburg.

**Jan. 2010 – Jan. 2013: Anfertigung der naturwissenschaftlichen
Dissertation**

Thema: „Charakterisierung der dynamischen Interaktion des Guanylyl Cyclase-A (GC-A)-Rezeptors mit den *Transient Receptor Potential Canonical Type 3* und *Type 6* (TRPC3/C6)-Kanälen und Generierung von β -Zell-spezifischen GC-A-*knock-out*-Mäusen sowie die Analyse der Bedeutung von ANP für die Insulin-Homöostase unter pathophysiologischen Bedingungen.“ Durchgeführt am Institut für Physiologie I, Universität Würzburg.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Würzburg, Februar 2013

Beatrice Dankworth