

**Aus dem Physiologischen Institut Lehrstuhl I
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professorin Dr. med. M. Kuhn



**Die endothelialen Effekte des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) sind
an der akuten Regulation des arteriellen Blutdrucks und des
Blutvolumens beteiligt**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Börner

aus Schönbrunn

Würzburg, November 2012

Referentin: Prof. Dr. med. M. Kuhn
Koreferentin: Prof. Dr. rer. nat. E. Butt
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2013

Der Promovend ist Arzt

Meinen lieben
Eltern und Großeltern
gewidmet

Dein wahrer Freund ist nicht,
wer dir den Spiegel hält der Schmeichelei,
worin dein Bild dir selbst gefällt.
Dein wahrer Freund ist,
wer dich sein lässt deine Flecken
und sie dir tilgen hilft,
eh´Feinde sie entdecken.

Friedrich Rückert

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
I Abkürzungsverzeichnis	I
II Abbildungsverzeichnis.....	II
III Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Die natriuretischen Peptide.....	1
1.1.1 Synthese und Freisetzung der natriuretischen Peptide mit Fokus auf das atriale natriuretische Peptid	4
1.1.2 Natriuretische Peptidrezeptoren und deren Signaltransduktion	6
1.1.3 Physiologische Effekte des atrialen natriuretischen Peptids	9
1.1.4 Abbau und Inaktivierung.....	12
1.2 Zielsetzungen der vorliegenden Dissertationsarbeit	12
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Geräte.....	15
2.2 Chemikalien und Enzyme	16
2.3 Tierhaltung und Genehmigung der Tierversuche.....	19
2.4 Genetische Mausmodelle	19
2.5 Anästhetika und Narkose.....	19
2.6 Katheterisierung.....	20
2.6.1 Implantation eines arteriellen Katheters und invasive Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks	20
2.6.2 Implantation eines venösen Katheters	21
2.6.3 Intravenöse Substanzapplikation durch Infusion	21
2.7 Retrobulbäre Blutentnahme und Hämatokritbestimmung	22
2.8 Organentnahme.....	22
2.9 Herstellung von Homogenaten aus isolierten Organen.....	23
2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay	24
2.11 Immunoblot-Analysen	24
2.11.1 Zielproteine und verwendete Antikörper.....	24
2.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.11.3 Transfer der Proteine aus den Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot).....	26
2.11.4 Detektion von immunreaktiven Proteinen.....	26
2.11.5 Entfernung der Antikörper von der Nitrocellulosemembran.....	27
2.11.6 Quantifizierung der Proteinanalyse	28
2.12 Intravitalmikroskopie am Musculus Cremaster (Mus Muskulus)	28

2.12.1	Aufreinigung des FITC-BSA	28
2.12.2	Cremasterpräparation	29
2.12.3	Permeabilitätsmessung an postkapillären Venolen und Datenanalyse	31
2.13	Statistische Methoden.....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Ausgangsparameter der verwendeten transgenen Mausmodelle	35
3.2	Die endotheliale GC-A ist an der akuten Regulation des arteriellen Blutdrucks durch ANP beteiligt	36
3.3	ANP bewirkt über die endotheliale GC-A eine akute Steigerung des Hämatokrits.....	40
3.4	Durch die Aktivierung der endothelialen GC-A mittels ANP wird die mikrovaskuläre Permeabilität für Albumin erhöht.....	43
3.5	ANP stimuliert die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)	46
3.6	Die Interaktion von ANP mit dem GC-B-Rezeptor ist nicht für den Abfall des Hämatokrits bei den EC GC-A KO Mäuse verantwortlich	48
3.7	Durch die Aktivierung des NPR-C mittels cANP (4-23) wird der Hämatokrit gesenkt	49
3.8	Stimulation des natriuretischen Peptidrezeptors C (NPR-C) mittels cANP (4-23) ändert nicht akut den Blutdruck.....	50
4	Diskussion	53
4.1	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und Fazit	53
4.2	Problematik der Blutdruckmessungen an narkotisierten Tieren.....	53
4.3	Endotheliale Effekte von ANP sind an der akuten Regulation des arteriellen Blutdrucks beteiligt	55
4.3.1	Die akuten hypotensiven Effekte von ANP sind an den EC GC-A KO Mäusen aufgehoben	55
4.3.2	Die akuten hypovolämischen Effekte von ANP sind an den EC GC-A KO Mäusen aufgehoben	57
4.4	Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Mikrozirkulation am Musculus cremaster zeigen, dass ANP die Extravasation von Albumin in postkapillären Venolen erhöht	59
4.5	Die Phosphorylierung von VASP könnte an den permeabilitätssteigernden Effekten von ANP beteiligt sein.....	61
4.6	Besitzt ANP auch antiphlogistische Eigenschaften?	66

4.7 An EC GC-A KO Mäusen führt ANP über den NPR-C zur „paradoxen“ Abnahme der endothelialen Permeabilität und des Hämatokrits	69
4.8 Implikationen.....	71
5 Zusammenfassung.....	73
6 Literaturverzeichnis	74
7 Anhang.....	101
Quelltext Permutationstest.....	101
Danksagung	102
Lebenslauf.....	103

I Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cANP (4-23)	zyklisches ANP (4-23)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g (KG)	Gramm (Körpergewicht)
GC-A	Guanylyl Cyclase A
GC-A -/-	globaler GC-A KO
GC-B	Guanylyl Cyclase B
Hkt	Hämatokrit
i.p.	intraperitoneal
KO	engl. knock out
M.	Musculus
NPR-A	A-Rezeptor für Natriuretische Peptide
NPR-B	B-Rezeptor für Natriuretische Peptide
NPR-C	Clearance-Rezeptor für Natriuretische Peptide
P-VASP _{Ser159}	VASP durch die PKA am Ser 159 phosphoryliert
P-VASP _{Ser239}	VASP durch die PKG-1 am Ser 239 phosphoryliert
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
RL	Ringer-Lactat-Lösung
SBD	systolischer arterieller Blutdruck
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozessierung, Aminosäuresequenz und Vorkommen humaner natriuretischer Peptide (geändert nach ²⁸).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkung verschiedener Stimuli auf die Sekretion von Pro-ANP (nach ⁴⁰).....	5
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der natriuretischen Peptidrezeptoren und ihre Ligandenpräferenz (nach ²⁸).....	7
Abbildung 4: cGMP-abhängige Effektorproteine (geändert nach ²⁸).....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Cremasterpräparation an narkotisierten Mäusen (nach ¹⁷⁰).....	30
Abbildung 6: Auswertung der Permeabilitätsmessung	32
Abbildung 7: Systolischer arterieller Blutdruck der Floxed GC-A Mäuse unter Vehikel- bzw. ANP-Infusion	37
Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf des SBD von GC-A -/- Mäusen unter Vehikel- und ANP-Infusion	38
Abbildung 9: Systolischer arterieller Blutdruck der EC GC-A KO Mäuse unter Vehikel- oder ANP-Infusion	39
Abbildung 10: Zusammenfassung der SBD von Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäuse unter ANP-Infusion	39
Abbildung 11: Hämatokrit-Werte (%) von Floxed GC-A, EC GC-A KO und GC-A -/- Mäusen während der Vehikel-Infusion zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min und 60 min (Börner, Schreier et al., Endocrinol 2008).....	41
Abbildung 12: Messung des Hämatokrits (%) der Floxed GC-A, EC GC-A KO und GC-A -/-Mäusen vor (0 Minuten), während (30 Minuten) und nach (60 Minuten) der ANP-Infusion (Börner, Schreier et al., Endocrinol 2008)	42
Abbildung 13: Intravital-Mikroskopie am M. cremaster: Permeabilitätsmessungen an Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäusen unter ANP-Infusion ..	45
Abbildung 14: P-VASP Western Blot: Proteinextrakte aus Milzgewebe von Kontroll- und EC GC-A KO Mäusen nach 60 min Vehikel- bzw. ANP-Infusion	47
Abbildung 15: Hämatokritwerte (%) der GC-A -/- Mäuse vor (0 min) und während (30 min, 60 min) der CNP-Infusion	48
Abbildung 16: Effekte von cANP (4-23) auf den Hämatokrit von Floxed GC-A, GC-A -/- und EC GC-A KO Mäusen (Börner, Schreier et al., Endocrinol 2008)	50
Abbildung 17: Verlauf des SBD von Floxed GC-A, GC-A -/- und EC GC-A KO Mäusen unter Vehikel- bzw. cANP (4-23)-Infusion.....	52

Abbildung 18: Box-Plot-Darstellung der normierten Blutdruckwerte von Floxed GC-A Mäusen unter Vehikel- bzw. ANP-Infusion	55
Abbildung 19: Ergebnisse der Intavitalmikroskopie am Modell der Rückenhautkammer von Floxed GC-A, EC GC-A KO, GC-A +/+ und GC-A -/- Mäusen unter Vehikel- bzw. ANP-Infusion (Börner, Schreier et al., Endocrinol 2008)	61
Abbildung 20: Hypothese zur Erhöhung des onkotischen Drucks durch Albumin in den parazellulären Spalten ¹⁹⁰	65
Abbildung 21: Schematische Darstellung der angenommenen intrazellulären Signaltransduktion zur Steigerung der endothelialen Permeabilität durch ANP im mikrovaskulären System.....	66
Abbildung 22: Vorstellung über die Interaktion des ANP/GC-A-Systems mit den Phosphodiesterasen 2 und 3 (geändert nach ⁹⁷)	67
Abbildung 23: Modell der intrazellulären Signaltransduktion des NPR-C zur Verminderung der endothelialen Permeabilität.....	71

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte	15
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme.....	16
Tabelle 3: Zusammensetzung des Anästhetikums	20
Tabelle 4: Infundierte Substanzen, Dosierung und Infusionsrate	22
Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Homogenisierung	23
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper	24
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper	24
Tabelle 8: Puffer und Lösungen zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine.....	25
Tabelle 9: Puffer und Lösungen für den Transfer der Proteine.....	26
Tabelle 10: Lösungen zur Blockierung der Membran und Entwicklung nach Immundetektion.....	27
Tabelle 11: Puffer zur Entfernung der Antikörper von der Nitrocellulosemembran	28
Tabelle 12: Puffer und Lösungen für die Intravitalmikroskopie	31
Tabelle 13: Durchschnittswerte (MW \pm SEM) des Alters, Gewichts, Hämatokrits und systolischen arteriellen Blutdrucks der verwendeten Versuchstiere	36

1 Einleitung

1.1 Die natriuretischen Peptide

Bereits vor der Benennung der natriuretischen Peptide wurden Granula in atrialen Myozyten des Herzens durch elektronenmikroskopische Analysen entdeckt¹. Anschließend wurde durch ihr Erscheinungsbild und physiologische Beobachtungen postuliert, dass das Herz eine Art endokrine Drüse ist, die die Nierenfunktion reguliert^{1,2}.

Erst 25 Jahre später gelang es de Bold, dem Inhalt dieser Speichergranula eine Funktion zuzuschreiben. Dazu injizierte er Ratten intravenös aufgereinigte atriale Myokardextrakte und beobachtete eine schnelle natriuretische Reaktion³. Weitere Jahre vergingen bis die Aufreinigung und Charakterisierung des für diesen Effekt verantwortlichen Peptidhormons gelang. Aufgrund des mehrfach beschriebenen natriuretischen Effekts und des Vorkommens in den Atria wurde es als das atriale natriuretische Peptid (ANP, Abbildung 1) bezeichnet⁴⁻⁷.

Kurz darauf wurde das dazugehörige kodierende Gen auf dem Chromosom 1 entdeckt und sequenziert. Weitere molekularbiologische Untersuchungen der verschiedenen Herzkompartimente zeigten die physiologische RNA- und Proteinexpression des ANP in beiden Atria⁸. Diese variiert jedoch im Verlauf der Entwicklung. Dabei zeigt sich die höchste Expression im fetalen und neonatalen Stadium. Nach der Geburt sinkt die ANP-Expression allmählich ab⁹. Nun wurde auch in anderen Geweben nach der Expression von ANP gesucht und es in der Lunge, dem Nebennierenmark, der Niere, verschiedenen ZNS-Arealen, z. B. im Hypothalamus, und dem Gefäßgewebe nachgewiesen¹⁰⁻¹².

1988 wurde ein zweites Familienmitglied der natriuretischen Peptide in geringen Mengen im ZNS des Schweins entdeckt und isoliert. Begründet durch den Fundort wurde es als „brain“ natriuretisches Peptid (BNP, Abbildung 1) benannt^{13, 14}. Jedoch konnte zwei Jahre später gezeigt werden, dass dieses Peptidhormon überwiegend in den Kardiomyozyten der Ventrikel synthetisiert wird¹⁵. Weiterhin wurde eine Expression, wenn auch in geringeren Konzentrationen, sowohl in den Kardiomyozyten der Atria¹⁶ als auch in kardialen Fibroblasten beschrieben¹⁷.

Es lassen sich somit einige Unterschiede zwischen ANP und BNP in Bezug auf ihre Ursprungskompartimentierung, die Expressionsregulation und die gebildete Menge erkennen. Hierbei liegt unter physiologischen Bedingungen eine geringere kardiale Expression von BNP im Vergleich zu ANP vor, welches sich

letztlich in einer geringeren, physiologisch kaum detektierbaren, Plasmakonzentration widerspiegelt¹⁸. Aus diesem Grund dient ANP, nicht aber BNP, im Gesunden zur Kommunikation zwischen Herz und Niere.

Als drittes Gruppenmitglied wurde Urodilatin aus humanem Urin isoliert¹⁹. Es entsteht aus dem ANP-Gen durch alternatives splicing und wird überwiegend in der Niere synthetisiert und freigesetzt, weshalb diesem Peptidhormon lokale auto- bzw. parakrine Effekte zugeschrieben werden²⁰⁻²².

Das letzte humane natriuretische Peptid wurde wie BNP im Schweinegehirn entdeckt und als C-Typ natriuretisches Peptid (CNP, Abbildung 1) bezeichnet²³. Erst einige Zeit später wurde die höchste Expression in Endothelzellen und Chondrozyten nachgewiesen²⁴⁻²⁶. Im Plasma sind sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen nur geringe Konzentrationen vorhanden, da es genau wie Urodilatin meist eine auto- bzw. parakrine Wirkung besitzt²⁷.

Jedoch trifft die Bezeichnung „natriuretisches Peptid“ nicht auf alle Familienmitglieder zu, da nur ANP (mit sehr geringer Wirkung auch BNP) über die Aktivierung der Guanylyl Cyclase A (GC-A) sowie Uroguanylin, ein intestinales Peptid, das die Guanylyl Cyclase C (GC-C) stimuliert, auf die Niere natriuretisch wirken²². Aufgrund ihres Syntheseorts werden ANP und BNP zusammenfassend als kardiale natriuretische Peptide bezeichnet.

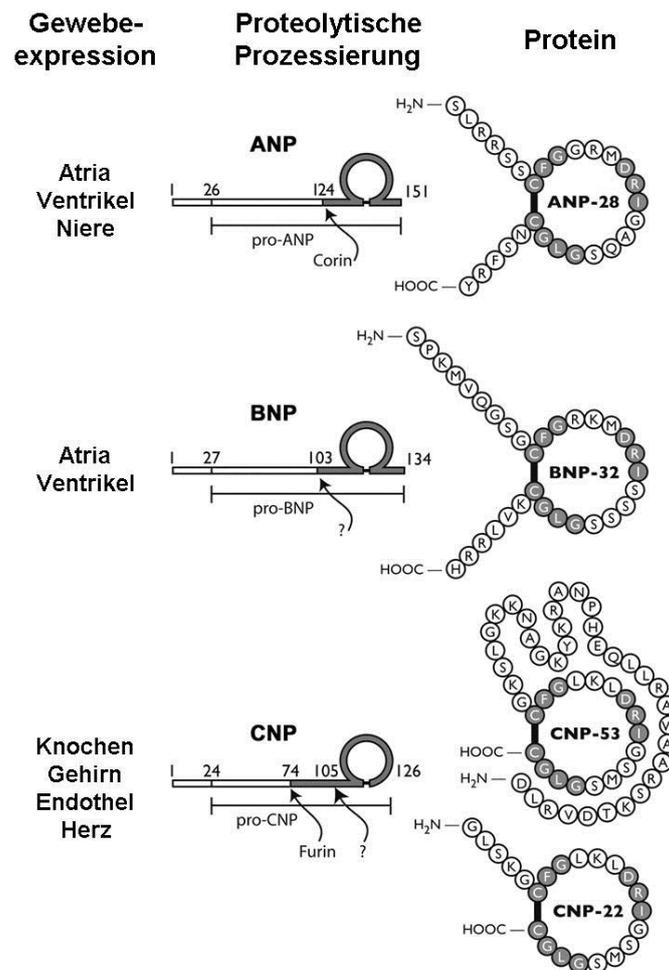


Abbildung 1: Prozessierung, Aminosäuresequenz und Vorkommen humaner natriuretischer Peptide (geändert nach ²⁸)

ANP, BNP und CNP werden in den aufgeführten Geweben als Prä-Prohormon synthetisiert und anschließend in das dazugehörige Pro-Hormon gespalten. Zur Aktivierung erfolgt eine weitere proteolytische Spaltung von Pro-ANP durch Corin bzw. Pro-CNP durch Furin (CNP-53) und ein weiteres unbekanntes Enzym (CNP-22) zu ANP bzw. CNP. Das verantwortliche Enzym zur Spaltung von Pro-BNP zu BNP ist ebenfalls noch unbekannt. Alle natriuretischen Peptide besitzen eine konservierte Ringstruktur aus 17 Aminosäuren (grau unterlegt), die über eine Disulfidbrücke (mit schwarz markiert) geschlossen wird und für die biologische Aktivität verantwortlich ist.

Bis auf Urodilatin besitzt jedes Gruppenmitglied ein eigenes kodierendes Gen, das sich auf unterschiedlichen Chromosomen befindet ²⁹. Dabei findet sich die höchste Homologieabdeckung zwischen den Säugetierspezies, wobei BNP die größten Abweichungen aller natriuretischen Peptide aufweist ¹⁴. Dennoch besitzen alle Peptidhormone untereinander eine strukturelle Ähnlichkeit sowohl auf genetischer als auch auf Peptidebene, worauf sich der Begriff natriuretische Peptide bezieht (Abbildung 1). Jedes besitzt eine konservierte Ringstruktur mit 17 Aminosäuren, die durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert wird. Durch diesen Aminosäurering erfolgt die Rezeptorerkennung und ist somit essentiell für die biologische Aktivität dieser Hormongruppe ³⁰. Außerhalb der

Ringstruktur besitzen die Peptidhormone spezifisch lange carboxy- und aminoterminalen Ketten ²⁹.

1.1.1 Synthese und Freisetzung der natriuretischen Peptide mit Fokus auf das atriale natriuretische Peptid

Durch Translation des humanen ANP-Gens, das sich mit drei Exons auf dem ersten Chromosom befindet, entsteht das Prä-Pro-ANP. Dieses besitzt eine spezifische Länge von 149 bis 153 Aminosäuren und wird durch Spaltung in zwei Fragmente geteilt ³¹⁻³⁴. Zum einen entsteht dabei das Signalpeptid, das für die Translokation des Prä-Pro-Hormons vom Ribosomen über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums verantwortlich ist und zum anderen das Pro-Peptid (Pro-ANP₁₋₁₂₆, Abbildung 1). Diese Hauptspeicherform wird anschließend über den Golgi-Apparat in sekretorischen Granula gespeichert, die sich überwiegend in den Kardiomyozyten des Atriums befinden ³⁵. Durch eine vermehrte Volumenbelastung und der damit verbundenen Dehnung des atrialen Myokards kommt es zur Sekretion des Pro-ANP aus den Granula ^{12, 36-38}.

Während des Sekretionsprozesses erfolgt eine proteolytische Spaltung des Pro-ANP durch die transmembranäre Serin-Protease Corin in zwei Fragmente, dem ANP₁₋₉₈ und ANP₉₉₋₁₂₆ ³⁹. Dabei stellt das ANP₉₉₋₁₂₆, das sich am carboxyterminalen Ende des Pro-ANP befindet, das klassische biologisch aktive Peptid-Hormon dar ⁵.

In analoger Weise erfolgt die Synthese von BNP und CNP, deren carboxyterminale Enden ebenfalls die biologisch aktiven Formen darstellen (Abbildung 1). Jedoch gibt es Unterschiede bezüglich der Sekretionsstimulation.

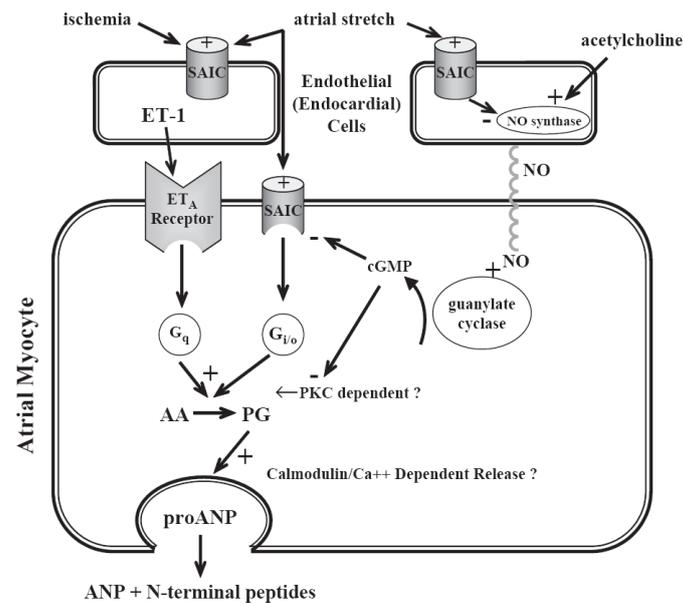


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkung verschiedener Stimuli auf die Sekretion von Pro-ANP (nach ⁴⁰)

Stimulation der ANP-Sekretion wird sowohl durch ET-1 als auch eine gesteigerte Wanddehnung der atrialen Kardiomyozyten vermittelt, wohingegen Acetylcholin (NO) diesen Effekt antagonisiert. Durch Bindung von ET-1 an den ET_A -Rezeptor wird eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, dadurch die Aktivierung der PKC und letztendlich die vermehrte Freisetzung von ANP, beschrieben ^{41, 42}. Durch Acetylcholin wird in den Endothelzellen vermehrt NO aus L-Arginin synthetisiert, das durch Aktivierung der löslichen Guanylyl Cyclase den intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht und dadurch die Sekretion von ANP vermindert ^{43, 44}.

Die Dehnung des atrialen Myokards stellt für die Sekretion von ANP den wichtigsten Reiz dar (Abbildung 2) ^{36, 45-47}. Jedoch wird zusätzlich zur Sekretion ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration benötigt ⁴⁸. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl durch die Blockierung dehnungsabhängiger Ionenkanäle ⁴⁹ als auch durch Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum die ANP-Sekretion vermindert wird ^{50, 51}. Auch die Hemmung der Proteinkinase C und die Inhibition von Ca^{2+} -Calmodulin führen zu einer Verminderung der ANP-Freisetzung auf den Dehnungsreiz ⁵²⁻⁵⁴. Weiterhin ist die Sekretionsrate von ANP durch Hypoxie ^{55, 56} und möglicherweise durch eine erhöhte Herzrate ⁵⁷, einen erhöhten Sympathikus-Tonus oder metabolische Faktoren gesteigert ¹².

Endothelin-1 (ET-1), ein potenter Vasokonstriktor der glatten Gefäßmuskulatur, induziert eine gesteigerte Sekretion von ANP sowohl durch eine erhöhte Wanddehnung ⁵⁸ als auch direkt über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (Abbildung 2) ^{59, 60}.

Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel oder Endokard antagonisiert diesen Effekt und dient somit einer gezielten Modulation der ANP-Sekretion durch Volumenbelastung (Abbildung 2) ^{61, 62}.

Neben diesen Substanzen steigern auch Katecholamine¹², Acetylcholin⁶³, Angiotensin II, Vasopressin, Prostaglandine^{12, 64}, Glucocorticoide, Mineralcorticoide^{65, 66} und Schilddrüsenhormone¹¹ den ANP-Plasmaspiegel. Jedoch wirkt Angiotensin II nicht ganz so stark wie Endothelin-1 auf die ANP-Freisetzung bei Volumenbelastung⁶⁴.

Weitere Möglichkeiten zur Regulation der ANP-Sekretion ist die negative Rückkopplung von ANP über die GC-A und Adrenomedullin, was zu einer verminderten Freisetzung führt^{67, 68}.

Die Freisetzung von BNP wird überwiegend durch endokrine Faktoren, wie beispielsweise Angiotensin II, Endothelin-1 oder Katecholamine gesteigert⁶⁹⁻⁷¹. Eine Gemeinsamkeit der ANP- und BNP-Freisetzung ist die Vermittlung der Sekretion durch die jeweiligen Stimuli über die Proteinkinase C^{41, 42, 72}. Aber durch diese wird auch die BNP-Synthese geregelt⁷³.

CNP wird dagegen durch die Wirkung der Zytokine TGF β , TNF α oder Interleukin 1 α aus Endothelzellen sezerniert⁷⁴.

1.1.2 Natriuretische Peptidrezeptoren und deren Signaltransduktion

In Säugetieren sind bislang drei Rezeptoren für die natriuretischen Peptide bekannt (NPR-A, NPR-B, NPR-C, Abbildung 3). Häufig werden sie auch als GC-A, GC-B und Clearance-Rezeptor bezeichnet. Dabei stellen der NPR-A (GC-A) und NPR-B (GC-B) zwei der insgesamt sieben im Säugetier^{22, 75} bzw. der fünf im Menschen vorkommenden membrangebundenen Guanylyl Cyklasen dar⁷⁶.

Eine hohe Expression der GC-A-mRNA wird im vaskulären System (Endothelzellen, glatte Muskelzellen), der Lunge (Endothelzellen), Milz, den Nieren (Mesangiumzellen), Nebennieren, Hoden, dem zentralen Nervensystem (Hypophyse, Area postrema, Cerebellum), Fettgewebe, terminalen Ileum und Herz (endokardiale Endothelzellen, Kardiomyozyten) gefunden⁷⁷⁻⁸⁰.

Dagegen stellt die GC-B den vorherrschenden Rezeptorsubtyp im zentralen Nervensystem dar²⁸. Eine m-RNA-Expression wurde in den Regionen des limbischen Systems, Bulbus olfactorius, Hippocampus, Amygdala, Hypophyse und Hypothalamus nachgewiesen⁸¹⁻⁸³. Weiterhin sind hohe Konzentrationen in Fibroblasten, der Lunge, den Nieren und Nebennieren entdeckt worden^{79, 80, 84}.

Beide Rezeptoren ähneln in ihrem Aufbau den Rezeptoren von Wachstumshormonen und Zytokinen⁷⁶. Sie sind aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, die aus 450 Aminosäuren besteht, einer 20 – 25 Aminosäuren langen hydrophoben Transmembranregion und einem intrazellulären Rezeptoranteil mit einer Länge von ca. 570 Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 3). Letzterer setzt sich aus einer ca. 250 Aminosäuren langen Kinase-homologen Domäne, einer Region zur Dimerisierung des Rezeptors und einer carboxyterminalen, aus rund 250 Aminosäuren bestehenden katalytischen Domäne zusammen^{85, 86}.

Die extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne der GC-A besitzt für die einzelnen natriuretischen Peptide unterschiedliche Affinitäten mit der Reihenfolge ANP > BNP >> CNP^{80, 87}. Hingegen zeigt die Bindungsdomäne der GC-B eine hohe Affinität für CNP und bindet nur im geringen Maß ANP und BNP⁸⁸.

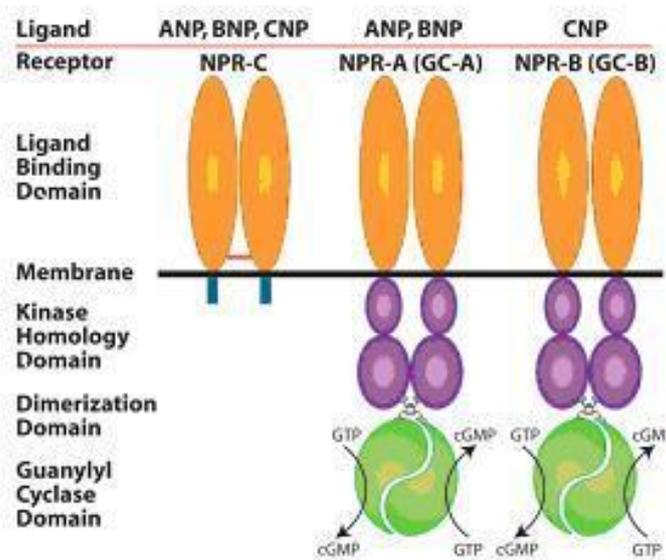


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der natriuretischen Peptidrezeptoren und ihre Ligandenpräferenz (nach²⁸)

ANP und BNP binden an die GC-A, CNP an die GC-B. Hingegen können alle drei natriuretischen Peptide mit unterschiedlicher Affinität (ANP > CNP > BNP) an den NPR-C binden. GC-A und GC-B sind membranständige Guanylyl Cyclasen, die aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne (orange), einer hydrophoben Transmembranregion und einer intrazellulären Domäne bestehen. Die intrazelluläre Domäne setzt sich wiederum aus einer Kinase-homologen- (lila), einer Dimerisierungs- (lila) und einer carboxyterminalen Guanylyl Cyclasedomäne (grün) zusammen. Dabei wird für die katalytische Domäne eine Dimerisierung zur Aktivierung angenommen. Die extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne des NPR-C ist zu ca. 30 % mit der von GC-A und GC-B homolog⁸⁹. Jedoch besitzt dieser Rezeptor nur eine kurze intrazelluläre Domäne mit 37 Aminosäuren (blau).

Bereits ohne eine Ligandenbindung bilden sowohl die GC-A als auch die GC-B Homodimere bzw. Homotetramere, die in phosphorylierter Form vorliegen und

eine geringe Guanylyl Cyclase Aktivität besitzen. Durch die Bindung der jeweiligen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und Aktivierung der Guanylyl Cyclase, wodurch der sekundäre Botenstoff cGMP aus GTP gebildet wird⁹⁰. Durch den Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration werden nun verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert (Abbildung 4). Zum einen kann die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), eine Serin/Threonin-Kinase, aktiviert werden^{91, 92}. Von dieser sind bisher zwei Subtypen bekannt, eine zumeist zytoplasmatisch exprimierte Form (PKG I) z. B. in Kardiomyozyten oder glatten Muskelzellen, und eine überwiegend membranständige Variante (PKG II), die unter anderem in Knochen und im Darmeptihel exprimiert wird⁹³. Weiterhin können durch den steigenden cGMP-Spiegel auch cGMP-abhängige Ionenkanäle oder cGMP-abhängige Phosphodiesterase aktiviert werden⁹⁴⁻⁹⁶. Aufgrund neuerer Ergebnisse wird eine konzentrationsabhängige Aktivierung bzw. Inaktivierung der Phosphodiesterasen postuliert. So deuten die durchgeführten Versuche darauf hin, dass die PDE2 durch hohe cGMP-Konzentrationen aktiviert und die PDE3 durch niedrige cGMP-Konzentrationen inhibiert wird⁹⁷.

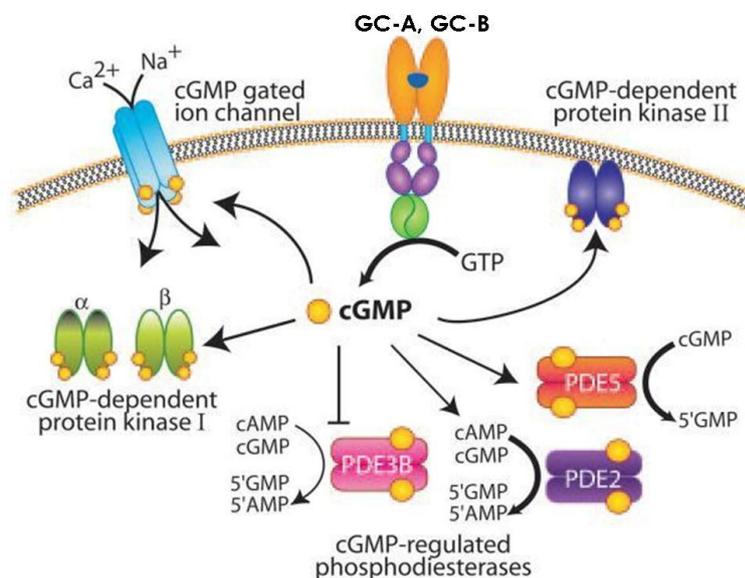


Abbildung 4: cGMP-abhängige Effektorproteine (geändert nach²⁸)

Die durch cGMP hervorgerufenen Effekte werden durch die Bindung des sekundären Botenstoffs an drei bekannte Klassen von Proteinen vermittelt. Dazu gehören die cGMP-abhängige Proteinkinase (Typ I oder II), Phosphodiesterasen und cGMP-abhängigen Kationenkanäle. Durch die Bindung von cGMP an verschiedene Mitglieder der PDEs können unterschiedliche Effekte erzeugt werden. So wird beispielsweise durch die Aktivierung der PDE5 der Abbau von cGMP gesteigert, durch die PDE2 vermehrt cAMP zu 5'AMP gespalten oder durch Inhibition der PDE3 die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesteigert.

Der Clearance-Rezeptor (NPR-C, Abbildung 3) weist eine hohe mRNA-Expression in der Plazenta, Aorta (glatte Muskelzellen, Endothelzellen), den Atria des Herzens, Lungen, Nieren, Nebennieren und Venen auf ^{79, 81, 98}. Im Myokard und mit ca. 94 % in kultivierten Endothelzellen stellt er sogar den vorherrschenden aller natriuretischen Peptidrezeptoren dar ^{99, 100}.

Die extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne des Clearance-Rezeptors besteht aus 496 Aminosäuren und ist mit denen der anderen natriuretischen Peptidrezeptoren zu ca. 30 % identisch ^{98, 101}. Aber im Gegensatz zu diesen besitzt der NPR-C einen aus lediglich 37 Aminosäuren bestehenden intrazellulären Anteil, der keine Guanylyl Cyclaseaktivität besitzt ⁹⁸. Es wurde jedoch ein 17 Aminosäure langer Anteil aus dem mittleren Abschnitt identifiziert, der möglicherweise mit G-Proteinen interagiert ¹⁰².

Alle natriuretischen Peptide besitzen die Fähigkeit, an die extrazelluläre Domäne des NPR-C zu binden ⁸⁷. Jedoch unterscheidet sich die Bindungsaffinität der einzelnen Liganden in der Reihenfolge ANP > CNP > BNP ^{18, 103}. Seit 1978 existiert auch das synthetisch hergestellte ANP-Analogon cANP (4-23), das einen spezifischen Liganden für den Clearance-Rezeptors darstellt ¹⁰⁴.

Nach Bindung der natriuretischen Peptide an den Clearance-Rezeptor folgt die Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes und eine lysosomale Hydrolyse des Liganden. Anschließend wird der Rezeptor wieder erneut in die Zellmembran integriert ^{105, 106}. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung des Rezeptors nicht von der Ligandenbindung abhängig ist, sondern konstitutiv über Clathrin-umhüllte Vertiefungen der Membran vermittelt wird ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Mit Hilfe von cANP (4-23) konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des NPR-C eine Hemmung der Adenylatzyklase über G_i-Proteine zur Folge hat und letztlich die intrazelluläre cAMP-Konzentration in vielen Zellen reduziert wird ¹⁰⁹. Dieser Effekt konnte durch Pertussis-Toxin inhibiert werden, wodurch eine Beteiligung von G_i- bzw. G_o-Proteinen an der Signaltransduktion bewiesen wurde ¹¹⁰. Weiterhin wurde eine G-Protein-abhängige Aktivierung der PKC nach Stimulation des Clearance-Rezeptors nachgewiesen ¹¹¹.

1.1.3 Physiologische Effekte des atrialen natriuretischen Peptids

ANP bewirkt in den Nieren eine Steigerung der glomerulären Filtrationsrate sowie eine Inhibition der Salz-Wasser-Resorption und Reninfreisetzung ¹¹².

Diese Effekte werden ausschließlich über die GC-A vermittelt, da sie in GC-A KO Mäusen komplett ausgeschaltet sind ¹¹³. Durch die Dilatation der Vasa afferentia und Kontraktion der Vasa efferentia wird der glomeruläre Filtrationsdruck erhöht und die Diurese gesteigert ¹¹⁴. Die Erhöhung der Natriuresis wird durch die Inhibition der AT II-induzierten Salz-Wasser-Rückresorption im proximalen Tubulus und der Blockade eines Amilorid-sensitiven Kationenkanals im Verbindungstubulus hervorgerufen ¹¹⁵⁻¹¹⁷. Weiterhin wird durch die ANP-vermittelte Inhibition des Renin-Angiotensin II-Aldosteronsystems und der ADH-Freisetzung zum einen die Antidiurese antagonisiert und zum anderen der Blutdruck gesenkt ^{118, 119}.

Mäuse mit einem kompletten knock out (KO) der ANP- bzw. GC-A-Expression besitzen eine salzunabhängige Hypertonie im Vergleich zu den Wildtypen ^{113, 120}. Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einer konstitutiven Überexpression des ANP einen um 20 – 30 mmHg niedrigeren Blutdruck als die Wildtypen ¹²¹. Durch diese Daten konnte die enorme Bedeutung des ANP/GC-A-Systems für die Blutdruckregulation gezeigt werden, wobei dieser Prozess eine Kombination aus der Steigerung der Natriuresis und Diurese, Veränderung des intravasalen Volumens, Senkung des Sympathikotonus, Inhibition des Renin-Angiotensin II-Aldosteronsystems sowie der Vasorelaxation darstellt ¹²².

Ein Anstieg des Hämatokrits in Wildtyp-Mäusen wurde erstmals von de Bold et al. nach intravenöser Injektion aufgereinigter atrialer Myokardextrakte beschrieben ³. Dabei scheint die Verminderung des intravasalen Volumens unabhängig von der gesteigerten Natriuresis und Diurese zu sein, da dies ebenfalls in nephrektomierten Mäusen nachgewiesen wurde ¹²³. Zusätzliche Experimente zur Klärung dieses Effekts deuten auf eine Steigerung des hydrostatischen Drucks in den Kapillaren und Erhöhung der endothelialen Permeabilität für Makromoleküle wie Albumin hin ^{124, 125}. Mäuse mit einer endothelspezifischen Deletion der GC-A (EC GC-A KO) besitzen genau wie Mäuse mit einer globalen GC-A-Deletion eine salzunabhängige Hypertonie und ein erhöhtes intravasales Volumen, aber in einem geringeren Ausmaß. Weiterhin ist bei diesen Mäusen die ANP-induzierte gesteigerte Extravasation von radioaktivem Albumin inhibiert ¹²⁶. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ANP zusätzlich zur inhibitorischen Wirkung auf Aldosteron und ADH, einer gesteigerten Natriuresis, Diurese sowie eines vermehrten Lymphabflusses, möglicherweise durch eine Steigerung der endothelialen Permeabilität für Albumin an der Regulation des Blutvolumens beteiligt ist.

Ein weiterer Mechanismus zur Senkung des Blutdruckes ist die PKG I vermittelte vasorelaxierende Wirkung von ANP auf die glatten Gefäßmuskelzellen¹²⁷. Dabei wurde durch eine spezifische Deletion der GC-A in glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt, dass das ANP/GC-A-System für die akute, jedoch nicht für die chronische Blutdrucksenkung von Bedeutung ist¹²⁸.

Ebenfalls wird der GC-A Rezeptor im Gehirn exprimiert. Durch Injektion von ANP in das Ventrikelsystem konnte nachweislich das Verlangen nach Flüssigkeit und der Salzappetit gesenkt werden^{129, 130}. Ein weiterer Wirkmechanismus von ANP ist die Senkung des Sympathikustonus im Hirnstamm¹³¹. Dabei werden vor allem afferente vagale Fasern sensitiviert und arterielle Barorezeptoren gedämpft, Effekte die letztlich zur Abnahme des Blutdrucks und der Herzfrequenz führen^{132, 133}.

Neben den beschriebenen Effekten auf die Volumen- und Blutdruckregulation besitzt ANP auch eine direkte parakrine kardiale Wirkung. Mäuse, die keine Expression der GC-A bzw. des ANP besitzen, zeigen eine Hypertrophie des Herzens im Vergleich zu Wildtypen, wohingegen Mäuse mit einer Überexpression des ANP kleinere Herzen besitzen^{120, 121, 134}. Durch eine selektive Deletion der GC-A an Kardiomyozyten konnte der Hypertonus als alleinige Ursache für die Hypertrophie der Herzen ausgeschlossen werden¹³⁵. In folgenden Experimenten konnte für ANP eine antifibrotische und antihypertrophe Funktion nachgewiesen werden¹³⁵⁻¹³⁷. Weiterhin deuten einige Experimente darauf hin, dass das ANP/GC-A-System das druckinduzierte kardiale Remodeling inhibiert^{135, 136}.

Die Lunge stellt einen weiteren Wirkungsort des ANP dar. Dort stimuliert es die Dilatation der pulmonalen Atemwege sowie der Blutgefäße¹²⁷.

Des Weiteren konnte bei Primaten ein Effekt von ANP auf Fettzellen entdeckt werden¹³⁸. Da diese eine höhere GC-A zu NPR-C-Ratio als andere Spezies besitzen, wurde angenommen, dass der lipolytische Effekt ausschließlich bei Primaten vorkommt. Jedoch wurde durch neuere Arbeiten an kultivierten Rattenadipozyten gezeigt, dass ANP auch auf diese Zellen wirkt¹³⁹. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um die cAMP-unabhängige Stimulation der Lipolyse durch die Aktivierung der PKG I^{138, 140} und einer gesteigerten Synthese von Adiponectin¹⁴¹.

Antiinflammatorische Effekte von ANP auf das Immunsystem wurden bis jetzt besonders in Makrophagen und dendritischen Zellen beobachtet. Durch ANP wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie z. B. TNF- α , IL-12 und Adipokine vermindert sowie die Synthese von IL-10 erhöht^{142, 143}. Weiterhin

wird durch ANP die Migration der neutrophilen Granulozyten und die Aktivierung von NF- κ B durch I κ B- α inhibiert^{144, 145}.

1.1.4 Abbau und Inaktivierung

Die durchschnittliche Plasmahalbwertszeit von ANP in Menschen beträgt zwei bis fünf Minuten und die metabolische Clearance 14 bis 25 ml/min/kg (KG)^{11, 146}. Der Abbau der natriuretischen Peptide erfolgt vermutlich auf zwei Wegen – zum einen durch die wie bereits beschriebene Internalisierung mittels NPR-C und zum anderen durch den darauf folgenden lysosomalen Abbau sowie durch enzymatische Degradierung^{147, 148}. Dabei stellt die neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11.) das Hauptabbauenzym dar, das sowohl in den Glomerula, den glatten Muskelzellen der Niere und Gefäße als auch in hohen Konzentrationen auf den Ausstülpungen der Membran des proximalen Tubulus sowie der Lung exprimiert wird. Der Abbau der natriuretischen Peptide mittels NEP erfolgt durch die hydrolytische Spaltung der ringbildenden Disulfidbrücken^{149, 150}. Durch eine Inhibition dieser Zink-Metalloprotease mittels SCH 39.370 konnte die Wirkung bzw. Wirkdauer der natriuretischen Peptide vervielfacht werden¹⁵¹. Jedoch ist die Effektivität der NEP auf die einzelnen Familienmitglieder verschieden. So wird BNP langsamer als ANP degradiert, da es eine längere C-terminale Aminosäurekette besitzt¹⁵². Diese Hypothese wird durch die Resistenz von DNP gegenüber der NEP bestätigt, da es eine noch längere Kette am C-Terminus besitzt¹⁵³.

1.2 Zielsetzungen der vorliegenden Dissertationsarbeit

Dass ANP eine wichtige Funktion an der chronischen und akuten Regulation des arteriellen Blutdrucks besitzt, ist seit vielen Jahren bekannt³. Mäuse mit einer globalen Deletion der Guanylyl Cyclase A (GC-A^{-/-}) weisen eine signifikante chronische Hypertonie auf, wohingegen transgene Mäuse mit erhöhten ANP-Plasmakonzentrationen einen signifikant verminderten arteriellen Blutdruck im Vergleich zu den Kontrolltieren besitzen^{113, 121}. Auch für den Menschen konnte bereits mehrfach die enorme Bedeutung des ANP/GC-A-Systems an der Blutdruckregulation gezeigt werden. Für dieses ist eine Vielzahl von Polymorphismen in den Genen für die GC-A und ANP beschrieben, die eine Hypertonie durch verminderte Aktivität der GC-A bzw. reduzierte Sekretion von ANP zu Folge haben¹⁵⁴.

Um die GC-A mediierten endothelialen Effekte von ANP auf den Blutdruck und das Blutvolumen genauer zu analysieren, wurden in der AG von Prof. Kuhn Mäuse mit einer endothelspezifischen Deletion des GC-A Gens (EC GC-A KO) generiert. Obwohl der vasorelaxierende Effekt von ANP vollständig erhalten war, wiesen die EC GC-A KO Mäuse einen chronischen arteriellen Hypertonus und eine Hypervolämie auf ¹²⁶. Weiterhin wurde mittels Stoffwechselläufigen und unterschiedlichem Futter nachgewiesen, dass dieser Phänotyp trotz eines unveränderten Trinkverhaltens und einer gleichgebliebenen Diurese sowie unabhängig von einer salzarmen Ernährung bestand. Indirekte Messungen mit iodiertem Albumin an Floxed GC-A Mäusen (Kontrolltiere) ließen vermuten, dass ANP die endotheliale Permeabilität von Makromolekülen stimuliert und somit den transvaskulären Flüssigkeitsaustausch reguliert, da diese Effekte in den EC GC-A KO Mäusen aufgehoben waren.

Deshalb sollte mit dieser Arbeit unter Zuhilfenahme der Cremasterpräparation und Intravitalmikroskopie (mit FITC-BSA) geprüft werden, ob die Aktivierung der endothelialen GC-A durch ANP die mikrovaskuläre Permeabilität für Albumin an postkapillären Venolen erhöht. Durch den Austritt von Albumin in das Interstitium würde sich das onkotische Druckverhältnis zwischen dem Intra- und Extravasalraum verschieben, wodurch letztlich Wasser entlang des onkotischen Gradienten aus dem Gefäßsystem entweichen würde. Aus diesem Grund bestand gleichzeitig die Fragestellung, ob somit dieser Prozess möglicherweise an der akuten Regulation des Blutvolumens beteiligt ist und einen weiteren essentiellen Mechanismus zur akuten Regulation des Blutdruckes durch ANP darstellt. Diese Sachverhalte wurden zum einen durch intravasale Blutdruckmessungen und zum anderen durch Hämatokritbestimmungen, die ein indirektes Maß für eine Volumenverschiebung darstellen, unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Infusionen) geprüft.

Bislang wurde für die Extravasation von Makromolekülen wie Albumin ein Caveolin vermittelter transzellulärer sowie parazellulärer Transport beschrieben ¹⁵⁵. Ein Jahr später publizierte Smolenski et al., dass ANP an HUVECs die Phosphorylierung von VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) durch die cGMP-abhängige PKG I stimuliert. Dieses Protein ist an der Zellmembran lokalisiert ¹⁵⁶ und ist in der Lage mit Mikrofilamenten (Aktin) und Zell-Zell-Kontakten (VE-Cadherin, Tight junctions) zu interagieren ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Somit lässt dies einen parazellulären Transportmechanismus von Albumin aus dem Gefäßsystem in das Interstitium vermuten. Ebenfalls konnte an diesem Zellsystem gezeigt werden, dass durch hohe ANP- und somit auch hohe cGMP-

Konzentrationen die PDE 2 (Phosphodiesterase 2) stimuliert wird⁹⁷. Dies würde eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration bzw. eine verminderte Phosphorylierung von VASP durch die cAMP-abhängige PKA zur Folge haben und dadurch ebenfalls die parazelluläre endotheliale Permeabilität für Albumin steigern. Um diese Sachverhalte *in vivo* zu überprüfen und einen Anhaltspunkt zu dem Mechanismus der permeabilitätssteigernden Signalwege zu erhalten, sollte zum Schluss dieser Arbeit nach Infusion von verschiedenen Substanzen der Phosphorylierungszustand von VASP an Floxed GC-A vs. EC GC-A KO Mäusen mittels Western Blot an homogenisierten Organen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Biofuge fresco Rotor #3324 Ø 85 mm	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Brückenmessverstärker Mio-0501 DC	Alfos	Biel-Benken, Deutschland
Cell [^] TM Foto- und Auswertungsprogramm	Olympus	Hamburg, Deutschland
Digital pH-Meter	WTW	Weilheim, Deutschland
Elektrophoresekammer	Eigene Herstellung, Physiologisches Institut	Würzburg, Deutschland
Gelkammer	Eigene Herstellung, Physiologisches Institut	Würzburg, Deutschland
Feinwaage TE214S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Hämatokritzentrifuge Rotor Ø 173 mm	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
IDEAL-Gasvorwärmer	H. Wösthoff KG	Bochum, Deutschland
Infusionspumpe	Harvard Apparatus	South Natick, USA
Kamera OBS MegaView	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX 41	Olympus	Hamburg, Deutschland
Magnetrührer IKA Combimag RET	Janke & Kunkel	Staufen, Deutschland
Mikro-Dismembrator U	Sartorius	Göttingen, Deutschland
MS 3 Digital Vortexer	IKA Works	Wilmington, USA
Objektiv UPlan FI 20x/0.5 W	Olympus	Hamburg, Deutschland

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Operationstisch	Eigene Herstellung, Physiologisches Institut	Würzburg, Deutschland
Pumpe für die Intravitalmikroskopie	H. Wösthoff	Bochum, Deutschland
Seralpur DELTA Reinstwassersystem	Erich Althäuser	Ransbach-Baumbach, Deutschland
Strom- und Spannungsquelle E802 für Elektrophorese	Consort nv	Turnhout, Belgien
Temperature-Control-Module TKM-0903	Alfos	Biel-Benken, Deutschland
Transferkammer Whatmann	Biometra®	Göttingen, Deutschland
Viktor ² _{TM} 1420 Multilabel Counter	Wallac	Waltham, USA
Waage 1219 MP	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Haake	Karlsruhe, Deutschland
WK-480R Graph zur Zeichnung der Blutdruckkurve	Alfos	Biel-Benken, Deutschland

2.2 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 40 (19:1)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
ANP (1-28, rat)	Bachem	Bubendorf, Schweiz
β-Mercaptoethanol	SIGMA-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
BC (Bicinchoninic Acid) Assay Reagent A	Interchim	Montlucon Cedex, Frankreich

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Bromphenolblau	Fluka Chemie	Buchs, Schweiz
BSA (MW ca. 68 kDa)	GERBU Biotechnik	Gaiberg, Deutschland
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck	Darmstadt, Deutschland
cANP (4-23)	Bachem	Bubendorf, Schweiz
CNP	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Coomassie G-250	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
EDTA	Merck	Darmstadt, Deutschland
EGTA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (100 %)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol (80 %)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Fentanyl [®] (0.05 mg/ml)	Janssen-Cilag	Neus, Deutschland
FITC-BSA	SIGMA-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
Fixierer Vision GV 60	Röntgen Bender	Baden-Baden, Deutschland
Futter R/M-H	SSNIFF	Soest, Deutschland
Glucose (D+)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycerin (etwa 87 %)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck	Darmstadt, Deutschland
HCl (0.1 N, 1 N)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium (25000 I.E.)	Ratiopharm	Ulm, Deutschland
Histamin	SIGMA-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland
Magermilch	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Domitor [®] (0.5 mg/ml)	Orion Corporation	Espoo, Finnland

Produkt	Hersteller	Firmensitz
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck	Darmstadt, Deutschland
Dormicum [®] (5 mg/ml)	Roche Pharma	Grenzach-Wyhlen, Deutschland
NaCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₃	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaOH-Plättchen	Merck	Darmstadt, Deutschland
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
89 % Ortho- Phosphorsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Inhibitoren Phos-Stop	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
Protease-Inhibitoren Complete Mini	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Ringer-Lactat-Lösung	DeltaSelect	Pfullingen, Deutschland
Röntgen Rapid Entwickler	Adefo-Chemie	Nürnberg, Deutschland
Saccharose	Merck	Darmstadt, Deutschland
SDS	Serva	Heidelberg, Deutschland
TEMED	SIGMA-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
Triton X-100	SIGMA-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
Trizma Base (MW 121.4)	SIGMA-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
Tween [®] 20	SIGMA-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland

2.3 Tierhaltung und Genehmigung der Tierversuche

Im Tierstall des Physiologischen Instituts, Lehrstuhl I, wurde die Haltung und Kreuzung der Tiere durchgeführt. Die Haltung der Mäuse erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 22°C und Luftfeuchtigkeit von 55 % mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden. Zudem besaßen sie freien Zugang zu Futter (Ratte/Maus-Haltung) und Trinkwasser.

Für die Durchführung der in dieser Arbeit angewendeten Tierversuche und Organentnahmen lagen alle erforderlichen behördlichen Genehmigungen vor (Aktenzeichen 22/05 und 22/07).

2.4 Genetische Mausmodelle

Zur Generierung des endothelspezifischen GC-A KO Mausmodells wurde das Cre-Rekombinase/LoxP System verwendet ¹⁶¹. Hierzu wurden als erstes in der AG Prof. Kuhn LoxP-Sequenzen in nicht-kodierende Regionen (vor die Promotorregion und in das erste Intron) des murinen GC-A Gens inseriert ¹²⁸. Die sogenannten floxed GC-A Mäuse wurden anschließend mit transgenen Mäusen, die eine endothelspezifische Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Tie2-Promotors (Tie2-Cre^{tg}) besitzen, gekreuzt ¹⁶². Durch die Cre-medierte Rekombination der LoxP-Sequenzen wurde die Promotorregion und das Exon 1 deletiert, woraus die EC GC-A KO Mäuse resultierten ¹²⁶.

Die EC GC-A KO Mäuse wurden mit den floxed GC-A Mäusen (Kontrollgruppe) sowie GC-A ^{-/-} Mäusen (globale Deletion der GC-A) verglichen. Letztere wurden wie beschrieben mittels Insertion einer Neomycin-Kassette in das Exon 4, das für einen Teil der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne codiert, generiert ¹¹³ und der AG Prof. Kuhn von Herrn Prof. D. L. Garbers (University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, USA) zur Verfügung gestellt.

2.5 Anästhetika und Narkose

Vor den Versuchen wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Fentanyl, Midazolam (Dormicum[®]) und Medetomidin (Domitor[®]) narkotisiert (Tabelle 3). Dafür wurden zu Beginn die Versuchstiere gewogen und pro g Körpergewicht 10 µl des Anästhetikums in eine 1 ml Spritze mittels 27 G Kanüle aufgenommen. Nun wurden die Mäuse am Nacken gehalten und das Narkosemittel intraperitoneal appliziert. Nach 10 min Einwirkzeit wurde die Wirkung des Anästhetikums durch Schmerz- und Druckreize an der

Schwanzspitze sowie zwischen den Krallen überprüft. Zeigten sich darauf eine partiell persistierende Reaktion, wurde den Mäusen nochmals die Hälfte der anfänglich verwendeten Narkosemenge verabreicht. Nach weiteren 10 min Wartezeit und einer erneuten Reflexprüfung konnte mit den Versuchen begonnen werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Anästhetikums

Narkosemittel	Zusammensetzung	Dosis für i.p. Narkose
3er Narkose (10 µl/g (KG))	0.0089 mg/ml Fentanyl	Fentanyl 0.089 µg/g (KG)
	0.89 mg/ml Midazolam	Midazolam 8.89 µg/g (KG)
	0.089 mg/ml Medetomidin	Medetomidin 0.89 µg/g (KG)
	in 2 % (w/v) BSA + RL verdünnt	

2.6 Katheterisierung

2.6.1 Implantation eines arteriellen Katheters und invasive Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks

Nach der Narkose (siehe 2.5) wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (37°C) mit Klebestreifen fixiert und die zu operierende Stelle mit 0.9 % (w/v) NaCl-Lösung befeuchtet. Dann wurde die oberflächliche Haut medial rechts im oberen Drittel des Halses mit einer Schere geöffnet. Danach wurden die umliegenden Faszien lateral rechts der Trachea entfernt und die Arteria carotis communis frei präpariert. Das weitere Vorgehen entspricht der Implantation eines venösen Katheters (siehe 2.6.1). Aufgrund des höheren Drucks wurden für diese Operation 1.5 metric Seidenfäden verwendet und der kaudale Faden durch eine Klemme beschwert, wodurch der Blutstau gewährleistet wurde. Die 2 % (w/v) BSA + RL-Lösung im Katheter wurde zusätzlich mit 500 U/ml Heparin versetzt, um eine Okklusion des Katheters durch Thromben zu vermeiden ¹⁶³.

Der arterielle Katheter war mit einem Druckaufnehmer verbunden, der über einen Brückenmessverstärker auf einem Graphen den systolischen Blutdruck aufzeichnete. Vor jedem Messtag wurde die Anlage überprüft und geeicht.

2.6.2 Implantation eines venösen Katheters

Den Versuchstieren wurde zur Infusion der unterschiedlichen Substanzen ein intravenöser PE-Katheter implantiert¹²⁸. Zu Beginn wurde eine 1 ml Spritze mit 2 % (w/v) BSA + Ringer-Lactat-Lösung (Tabelle 4) aufgezogen, mit dem Katheter verbunden und die Luft entfernt. Als nächstes wurden die Mäuse narkotisiert (siehe 2.5) und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit 37°C fixiert. Nun wurden die sich im Operationsbereich befindlichen Haare mit 0.9 % (w/v) NaCl-Lösung befeuchtet. Anschließend wurde die Haut parasternal rechts am oberen Drittel des Halses mit einer Schere eröffnet und mit mikrochirurgischen Pinzetten die Vena jugularis frei präpariert. Anschließend wurden drei Ligaturen in Form von Schlingen um die Vene gelegt und die kranial gelegene Schlaufe zur Blutstauung sofort zugezogen. Nun wurde mit einer mikrochirurgischen Schere das Gefäß inzidiert und der Katheter eingeführt. Danach wurde der Katheter als erstes durch die kaudal gelegene Schlinge und als zweites durch die mediale Schlaufe befestigt. Um die Stabilität des Katheters bei Abnahme des Bluts zur Hämatokritbestimmung zu erhöhen, wurde dieser zusätzlich mit dem kranial gelegenen Faden verknotet.

2.6.3 Intravenöse Substanzapplikation durch Infusion

Vor den Versuchen wurden die zu testenden synthetischen Peptide frisch in einer 2 % (w/v) BSA + Ringer-Lactat-Lösung verdünnt und in eine 1 ml Spritze mit einer 23-G-Kanüle aufgezogen (Tabelle 4). Anschließend wurde die während der Implantation am Katheter befestigte Spritze entfernt und die Flüssigkeit aus dem oberen Ende des Katheters mit einer leeren 1 ml Spritze und 27-G-Kanüle abgesaugt. Nun wurde die zu infundierende Substanz ohne Luftblaseneinschluss in den Katheter gefüllt und anschließend die Spritze mit diesem verbunden. Als letztes wurde die Spritze in die Infusionspumpe gespannt und mit dem Versuch begonnen. Dabei wurde die gleiche Dosierung für die ANP-Infusion gewählt, wie sie bereits von Lopez et al. verwendetet wurde¹⁶⁴. Anschließend wurden alle weiteren Dosierungen an diese angepasst, damit jede Substanz in der gleichen Konzentration infundiert werden konnte.

Tabelle 4: Infundierte Substanzen, Dosierung und Infusionsrate

Substanz	Dosierung	Infusionsrate
ANP	500 ng/kg (KG)/min	4 µl/g (KG)/h
cANP (4-23)	250 ng/kg (KG)/min	4 µl/g (KG)/h
CNP	500 ng/kg (KG)/min	4 µl/g (KG)/h
Vehikel (2 % BSA + RL)	2 % (w/v)/min	4 µl/g (KG)/h

2.7 Retrobulbäre Blutentnahme und Hämatokritbestimmung

Vor den Versuchen wurden die Mäuse intraperitoneal narkotisiert (siehe 2.6) und zur Infusion ein Katheter in die Vena jugularis implantiert (siehe 2.7). Nun wurde das linke untere Augenlid mit einer Glaskapillare hinter den Glaskörper gedrängt und das Hämatokrit-Röhrchen an diesem vorbei nach dorsonasal geschoben. Dort wurde durch drehende Bewegung die Vena angularis inzidiert und das Blut gewonnen. Anschließend wurden die Röhrchen auf der Entnahmeseite mit Versiegelungskitt verschlossen und bei 595 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nun konnte der Hämatokrit an den zentrifugierten Kapillaren abgelesen werden. Dieser prozentuale Wert setzt sich aus dem Quotienten der korpuskulären Bestandteile (zu 99 % sind dies Erythrozyten) zum gesamten Blutvolumen zusammen und ermöglicht somit die indirekte Erfassung einer akuten Plasmavolumenverschiebung.

Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch die Operation und Katheterisierung zu vermeiden sowie eine systemische Verteilung der infundierten Lösung zu garantieren und lokale Effekte durch einen venösen Rückstau auszuschließen, wurde die Blutentnahme immer auf der operierten gegenüberliegenden Seite durchgeführt.

2.8 Organentnahme

Nach der intraperitonealen Narkose (siehe 2.5) und 60-minütiger Vehikel- bzw. ANP-Infusion wurden die Versuchstiere durch eine zervikale Dislokation getötet und das Abdomen eröffnet. Anschließend wurden die Milz entnommen, die Organe in Eppendorf-Caps gegeben und das Feuchtgewicht mit einer Feinwaage bestimmt. Nun konnten die Proben zuerst in flüssigem Stickstoff und danach bei -80°C gelagert werden.

2.9 Herstellung von Homogenaten aus isolierten Organen

Die tiefgefrorenen Organe (siehe 2.9) wurden mit einem Mörser grob zerkleinert und ein Teil in ein auf -80°C vorgekühltes Teflongefäß gegeben. Danach wurden $100\ \mu\text{l}$ Homogenisierungslösung (Tabelle 5) und eine Metallkugel hinzugegeben. Das Teflongefäß wurde nun in einen Mikro-Dismembrator eingespannt und die Organe mit $1500\ \text{rpm}$ für $1.5\ \text{min}$ bei Raumtemperatur pulverisiert. Anschließend wurde das Gewebepulver in ein $1.5\ \text{ml}$ Eppendorf-Cap überführt und mit weiteren $400\ \mu\text{l}$ Homogenisierungslösung (Tabelle 5) versetzt. Nach ausreichendem Vortexen wurde die Suspension mit einer $5\ \text{ml}$ Spritze und 24-G-Kanüle geschert und mit $10000\ \text{g}$ für $10\ \text{min}$ bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden $200\ \mu\text{l}$ des Überstands mit $200\ \mu\text{l}$ $3\times$ Lämmli ¹⁶⁵ gemischt und für $5\ \text{min}$ bei 95°C im Thermocycler gekocht. Weiterhin wurden $50\ \mu\text{l}$ des Homogenats mit $50\ \mu\text{l}$ $0.2\ \text{N}$ NaOH zur Proteinbestimmung versetzt und ebenfalls für $5\ \text{min}$ bei 95°C gekocht. Nun wurden die mit $3\times$ Lämmli verdünnten Proben bei -20°C eingefroren und die Proteinkonzentration mittels BCA-Verfahren mit den NaOH versetzten Gewebesuspensionen bestimmt.

Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Homogenisierung

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer	250 mM Saccharose 20 mM EDTA 3 mM EGTA 20 mM Tris-HCl pH 7.5
Homogenisierungslösung	10 ml Homogenisierungspuffer 1 Tablette Protease-Inhibitoren (Complete Mini) 1 Tablette Phosphatase-Inhibitoren (Phos-Stop) 1 % Triton X-100
Lämmli-Puffer (3x)	200 mM Tris-HCl 6 % (w/v) SDS 15 % (v/v) Glycerol 0.1 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) Mercaptoethanol, pH 6.8

2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Die Proteinkonzentration der Gewebesuspension wurde durch das BCA-Verfahren bestimmt ¹⁶⁶. Eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) wurde zur Erstellung der Standardkurve verwendet. Als erstes wurden je 15 µl der Standards und 15 µl Wasser als Leerwert auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen. Anschließend wurden je 3 µl der Proben und der Homogenisierungslösung auf die Platte pipettiert. Nun wurden 294 µl des BCA Reagenz A mit 6 µl 4 % (w/v) Kupfersulfat-Lösung in jedes gefüllte Loch gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37°C im Wasserbad. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte die Proteinkonzentration über die Absorption bei 562 nm im Photometer bestimmt werden.

2.11 Immunoblot-Analysen

2.11.1 Zielproteine und verwendete Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper

Zielprotein (Größe)	Generierungs-spezies	Verdünnung des AK	Hersteller, Firmensitz
GAPDH (36 kDa)	Kaninchen	1:10000 in Magermilch-Lösung	Cell Signaling Technology; Boston, USA
Gesamt-VASP und P-VASP _{Ser 157} (46 bzw. 50 kDa)	Kaninchen	1:1000 in Magermilch-Lösung	immunoGlobe; Himmelstadt, Germany
P-VASP _{Ser 239} (46 bzw. 50 kDa)	Maus	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology; Boston, USA

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundäre Antikörper	Generierungs-spezies	Verdünnung des AK	Hersteller; Firmensitz
Anti-Maus IgG (HRP)	Kaninchen	1:10000	Bio Rad; Hercules, USA
Anti-Kaninchen IgG (HRP)	Ziege	1:10000	Bio Rad; Hercules, USA

2.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen aus den Homogenaten wurde durch denaturierende und diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen durchgeführt. Das verwendete Gelsystem bestand aus einem 5 % (w/v Acrylamid/Bisacrylamid) Sammelgel und einem 9 % (w/v Acrylamid/Bisacrylamid) Trenngel (Tabelle 8) ¹⁶⁷.

In eine Gelspur wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard aufgetragen und die verbleibenden Gelspuren mit je 30 µg Proteinmenge der Gewebehomogenate beladen. Danach wurde die Elektrophorese in einer senkrechten Elektrophoresekammer mit 110 V gestartet. Nach dem Übertritt der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Die SDS-PAGE wurde beendet, nachdem die 27 kDa-Bande des Markers aus dem Gel herausgelaufen war.

Tabelle 8: Puffer und Lösungen zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Laufpuffer	25 mM Trizma Base 0.2 % (w/v) SDS 192 mM Glycin
Sammelgel (5 %)	13 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) 11.6 % (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 74 % (v/v) Aqua bidest. 0.1 % (v/v) SDS 0.05 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin 0.1 % (v/v) Ammoniumpersulfat
Trenngel (9 %)	23.17 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) 37.34 % (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 8.8) 37.47 % (v/v) Aqua bidest. 0.1 % (v/v) SDS 0.05 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin 0.1 % (v/v) Ammoniumpersulfat

2.11.3 Transfer der Proteine aus den Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot)

Nachdem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt wurden, erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran^{168, 169}. Hierzu wurden die Nitrocellulosemembran und vier Schichten Whatman-Papier in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurden zwei Schichten Whatman-Papier und darauf die Membran in die Blotkammer gelegt. Auf diese wurde das kurz in Transferpuffer gewaschene Gel und zwei Schichten Whatman-Papier platziert. Für einen erfolgreichen Transfer wurden nun die Luftblasen entfernt. Anschließend wurde der elektrophoretische Transfer nach der Semidry-Methode für 55 min bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 2 mA/cm² Nitrocellulosemembran gestartet. Nach dem erfolgten Blot wurde die Membran mit Ponceau S Lösung (Tabelle 9) gefärbt, um den Erfolg des Transfers zu kontrollieren. Die Membran wurde nun mit TBS-T 0.1 entfärbt und für den immunologischen Nachweis eingesetzt.

Tabelle 9: Puffer und Lösungen für den Transfer der Proteine

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Ponceau S Lösung	5 % (v/v) Essigsäure 0.1 % (w/v) Ponceau S
TBS (10x)	198 mM Trizma Base 946 mM NaCl pH 7.4
TBS-T 0.1	0.1 % (v/v) Tween ^R 20 in TBS
Transferpuffer	25 mM Trizma Base 20 % (v/v) Methanol 192 mM Glycin

2.11.4 Detektion von immunreaktiven Proteinen

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Transfer für 60 min in Magermilch-Lösung oder BSA-Lösung inkubiert (Tabelle 10). Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in dieser Lösung verdünnt und bei 4°C über Nacht leicht geschüttelt (Tabelle 6). Anschließend wurde die Membran dreimal je 10 min mit

TBS-T 0.1 gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nun wurde die Nitrocellulosemembran mit dem Sekundärantikörper in Magermilch- oder BSA-Lösung für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (Tabelle 7). Nach Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T 0.1 gewaschen und entwickelt.

Für die Visualisierung der Proteine wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion genutzt, in der das Substrat ECL durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase, welches an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, umgesetzt wird. Anschließend wurde die Membran über 1 Minute mit diesem Gemisch inkubiert und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Nun wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und nach ca. zwei bis fünf Minuten Belichtungszeit in der Entwicklerlösung geschwenkt. Nachdem der Film in der Fixierlösung geschwenkt und luftgetrocknet wurde, konnten die Banden des Markers übertragen und der Blot ausgewertet werden.

Tabelle 10: Lösungen zur Blockierung der Membran und Entwicklung nach Immundetektion

Lösungen	Zusammensetzung
BSA-Lösung	5 % (w/v) BSA in TBS-T 0.1
Entwicklerlösung	103 mM Teil 1 (Hydrochinon) 987 mM Teil 2 (Na ₂ CO ₃)
Fixierlösung	20 % (v/v) Fixierer
Magermilchlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T 0.1

2.11.5 Entfernung der Antikörper von der Nitrocellulosemembran

Nach der Immundetektion wurden die Primär- und Sekundärantikörper wieder von der Nitrocellulosemembran gewaschen, um ein weiteres Protein bzw. das gleiche Protein mit einem anderen Antikörper detektieren zu können. Dazu wurde die mit Antikörper gesättigte Membran 20 min in TBS-T 0.1 gewaschen und danach weitere 20 min bei Raumtemperatur im Antikörper-Entfernungspuffer (Tabelle 11) auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Membran zweimal je 10 min mit TBS-T 0.1 gewaschen. Zum Schluss wurde die Nitrocellulosemembran erneut für 30 min mit BSA- bzw. Magermilch-Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert (Tabelle 10) und der neue Primärantikörper in dieser verdünnt (Tabelle 6). Nun

wurde die Membran mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Tabelle 11: Puffer zur Entfernung der Antikörper von der Nitrocellulosemembran

Puffer	Zusammensetzung
Entfernungspuffer	50 mM Glycin 2 M Harnstoff 3.33 mM NaCl; pH 2.7

2.11.6 Quantifizierung der Proteinanalyse

Die Proteinexpression und -phosphorylierung wurde über die Schwarz-Weiß-Intensität mit ImageJ quantifiziert. Zur Relativierung der unterschiedlichen Blots wurde das unspezifische Hintergrundsignal von den jeweiligen Signalen subtrahiert und die Signalintensitäten der immunreaktiven Zielproteine über einen Quotienten auf das dazugehörige GAPDH-Signal normiert.

2.12 Intravitalmikroskopie am *Musculus Cremaster* (*Mus Muskulus*)

2.12.1 Aufreinigung des FITC-BSA

Es wurden 10 mg FITC-BSA in einem kleinen Reagenzglas mit einer Feinwaage abgewogen und in 500 µl 0.9 % (w/v) NaCl-Lösung gelöst. Währenddessen wurde der Lagerpuffer aus der Aufreinigungssäule (Illustra NAPTM Columns; GE Healthcare, UK) abgelassen und diese dreimal mit 3 ml 0.9 % (w/v) NaCl-Lösung äquilibriert. Anschließend wurden die 500 µl FITC-BSA-Lösung auf die Säule gegeben, wodurch der ungebundene Fluoreszenzfarbstoff über einen Größenausschluss aus der FITC-BSA-Lösung entfernt wurde. Nachdem die Lösung vollständig in die Säule eingelaufen war, wurde nochmals 1 ml 0.9 % (w/v) NaCl-Lösung auf diese gegeben. Mit dem ersten gelblich gefärbten Tropfen wurde die FITC-BSA-Lösung in einem neuen Glasröhrchen aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung abgedunkelt im Kühlschrank gelagert.

2.12.2 Cremasterpräparation

Da der M. cremaster der Maus nach Präparation im Durchschnitt $175 \pm 15 \mu\text{m}$ dick ist und mit einem Mikroskop vollständig durchleuchtet werden kann¹⁷⁰, eignet sich dieses Modell besonders gut zur Visualisierung der arteriellen und venösen Blutversorgung bis hin zu den finalen Aufzweigungen in die Endstrombahnen (präkapilläre Arteriolen, Kapillargefäße und postkapilläre Venolen; Saeger, HD et al., 2006). Aus diesem Grund wurde die Cremasterpräparation zur Analyse der endothelialen Permeabilitätsänderung an postkapillären Venolen durch ANP verwendet.

Nach der Narkose (siehe 2.5) wurden die Mäuse am Scrotum und der Inguinalregion rasiert. Anschließend wurden sie in Rückenlage auf den Operationstisch platziert und ein Venenkatheter zur Substanzapplikation implantiert (siehe 2.6). Während des Experiments wurde die Temperatur des Operationstisches durch ein Wasserbad konstant auf 37°C gehalten. Um eine Dehydrierung der Versuchstiere und damit verbundene Änderungen des intravasalen Volumens zu verhindern, wurde schon vor der Operation die Infusion über den Jugularis-Katheter mit 2 % BSA (w/v) + RL und einer Infusionsrate von $4 \mu\text{l/g (KG)/h}$ gestartet.

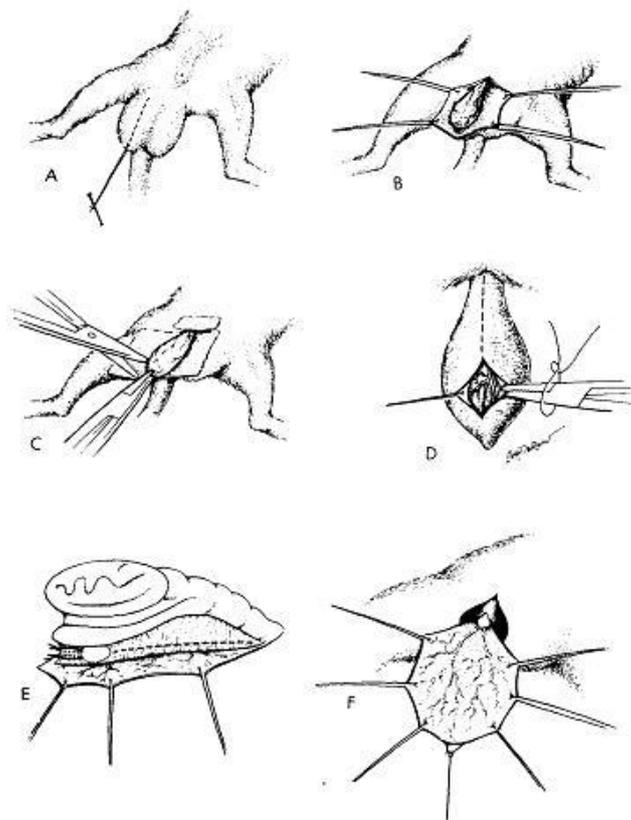


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Cremasterpräparation an narkotisierten Mäusen (nach 170)

Mit einer Pinzette oder einem Faden wurde das Scrotum auf der rechten Seite glatt gezogen (A). Durch einen kleinen Schnitt an der Spitze wurde dieses anschließend von kaudal nach kranial bis zum Inguinalspalt geöffnet (B). Nun wurden die Fascia spermatica externa und Teile der Fascia cremasterica entfernt und der M. cremaster mit einer chirurgischen Pinzette nach außen gezogen (C). Nachdem der Muskel mit einem Faden am kaudalen Ende fixiert und die Reste der Fascia cremasterica beseitigt wurden, konnte dieser longitudinal eröffnet werden (D). Anschließend wurde der Nebenhoden und Hoden vom Muskel gelöst und in die Bauchhöhle reponiert (E). Mit drei Fäden auf jeder Seite wurde nun der Musculus cremaster auf dem Operationstisch aufgespannt und die Fascia spermatica interna vorsichtig entfernt (F).

Anschließend wurde auf den Operationsbereich die Krebs-Ringerlösung superfundiert (Tabelle 12) und das Scrotum auf der rechten Seite mit einer spitzen Pinzette glatt gezogen (Abbildung 5A). Danach wurde die Haut des Hodensacks mit einer kleinen Schere von der Spitze bis zum Inguinalspalt eröffnet (Abbildung 5B). Jetzt wurden die darunter liegende Fascia spermatica externa sowie Teile der Fascia cremasterica vorsichtig entfernt und der Muskel mit einer spitzen Pinzette herausgezogen (Abbildung 5C). An das untere Ende wurde ein 6/0 Faden verknotet und der Muskel nach oben gespannt. Nun konnten auch die letzten Reste der Fascia cremasterica vorsichtig entfernt werden. Anschließend wurde der M. cremaster longitudinal auf den Operationstisch gespannt und von kaudal nach kranial eröffnet (Abbildung 5D). Danach wurde der Nebenhoden und Hoden vom Muskel gelöst und durch den

Anulus inguinalis superficialis in die Bauchhöhle reponiert (Abbildung 5E). Als letztes wurde der Muskel zu jeder Seite mit 3 Fäden flächig aufgespannt und die Fascia spermatica interna entfernt¹⁷⁰.

Tabelle 12: Puffer und Lösungen für die Intravitalmikroskopie

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Krebs-Ringer-Lösung (Superfusionspuffer)	120 mM NaCl 4.7 mM KCl 1.2 mM KH ₂ PO ₄ 1.2 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O 12.5 mM NaHCO ₃ 11.0 mM Glucose 2.5 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O Ad 1 l Aqua bidest pH 7,4 mit NaHCO ₃ einstellen für mindestens 30 min mit 5 % CO ₂ und 95 % N ₂ (Stickstoff) begasen (p = 1 bar)

2.12.3 Permeabilitätsmessung an postkapillären Venolen und Datenanalyse

Nach der Cremasterpräparation wurde zur Erholung des Gewebes und Verbesserung des Blutflusses der Muskel 30 min mit 1.2 ml/min Krebs-Ringer-Lösung superfundiert. Anschließend wurde den Mäusen 50 µl der aufgereinigten FITC-BSA-Lösung retrobulbär injiziert und dies unter dem Mikroskop mit monochromatischem Licht ($\lambda = 495$ nm) angeregt, wodurch die Endstrombahnen im M. cremaster sichtbar gemacht wurden. Währenddessen wurden 3 verschiedene Gefäßausschnitte mit einem postkapillären Abflussgebiet (Gefäßdurchmesser 20 – 40 µM; Saeger, HD et al., 2006) fotografiert und anschließend die intravenöse ANP-Infusion mit einer Konzentration von 500 ng/kg (KG)/min¹⁶⁴ und einer Rate von 4 µl/g (kg)/h für 60 min gestartet (Tabelle 4). Alle 10 min wurden erneut dieselben drei Gefäßausschnitte fotografiert. Nach abgeschlossener ANP-Infusion wurde die Permeabilität der Gefäße durch eine 20-minütige lokale Histaminsuperfusion mit einer Konzentration von 80 µM und einer Rate von 3 ml/h zusätzlich gesteigert¹⁷¹.

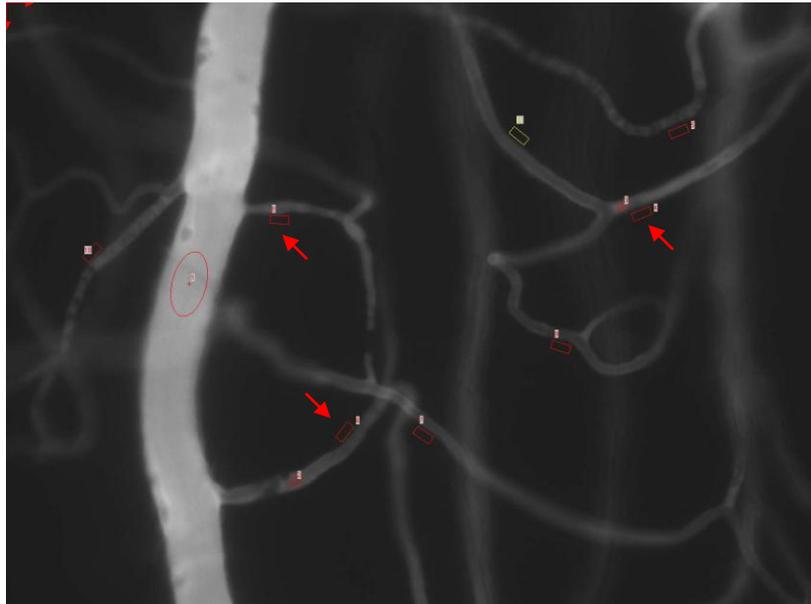


Abbildung 6: Auswertung der Permeabilitätsmessung

Nach der chronologischen Sortierung der Gefäßausschnitte sowie der Übertragung von Helligkeit und Kontrast des Ausgangsbildes auf die folgenden Bilder wurden mit dem Computer die Grauintensitäten des Extravasalraums bestimmt. Hierzu wurden Rechtecke (Umfang ca. $45 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$), die den interstitiellen Messbereich eingrenzen, an verschiedene Venolen gesetzt (rote Pfeile). Um eine mögliche Überlagerung der Messareale mit der Gefäßfluoreszenz und dem daraus folgenden Fehler zu vermeiden sowie die räumliche Nähe zu den Gefäßen zu gewährleisten, wurden nur kleine Rechtecke bzw. Messbereiche gewählt. Die entstandenen Werte wurden nun normiert und statistisch ausgewertet (näheres siehe Text, 2.13).

Nach Beendigung des Versuchs wurden die aufgenommenen Bilder am Computer mit dem Programm CellTM ausgewertet (Abbildung 6). Hierzu wurden als erstes zur Normierung die Helligkeit und der Kontrast des ersten Bildes eines der drei Gefäßausschnitte auf die folgenden Bilder übertragen. Anschließend wurden gleiche Gefäßausschnitte chronologisch geordnet und die Grauintensitäten im Extravasalraum an mindestens 8 verschiedenen Stellen unterschiedlicher Venolen gemessen.

Zur Auswertung der interstitiellen Fluoreszenz wurde zuerst der Mittelwert ($M_{A0 \text{ min}}$) aus den mindestens 8 Grauintensitäten eines Gefäßausschnittes (A) vor Beginn der ANP-Infusion (0 min) bestimmt. Anschließend wurden ebenfalls die jeweiligen Mittelwerte ($M_{A10 \text{ min}}$ bis $M_{A80 \text{ min}}$) der chronologisch folgenden Bilder desselben Gefäßausschnittes gebildet. Diese wurden nun zum Ausgangswert $M_{A0 \text{ min}}$ über einen Quotienten normiert (z. B. $M'_{A10 \text{ min}} = M_{A10 \text{ min}}/M_{A0 \text{ min}}$). Auf gleiche Weise wurden die Berechnungen für die anderen zwei Gefäßausschnitte wiederholt ($M'_{B0 \text{ min}}$ bis $M'_{B80 \text{ min}}$, $M'_{C0 \text{ min}}$ bis $M'_{C80 \text{ min}}$). Aus den drei einzelnen normierten Mittelwerten eines Zeitpunktes (z. B. $M'_{A10 \text{ min}}$, $M'_{B10 \text{ min}}$, $M'_{C10 \text{ min}}$) wurde nun der gesamt Mittelwert (z. B. $MG_{10 \text{ min}}$) für das Versuchstier zu diesem Zeitpunkt gebildet. Nachdem die Auswertung mit

diesem Verfahren für alle Mäuse eines Genotyps unter ANP-Infusion durchgeführt wurde, konnten diese zusammengefasst werden. Hierzu wurden nun aus allen Mittelwerten eines Zeitpunktes (z. B. $MG_{10 \text{ min}}$) ein gesamter Mittelwert und der Standardfehler für diesen berechnet.

2.13 Statistische Methoden

Mit „n“ wurde die Anzahl der verwendeten Versuchstiere beziehungsweise der Proben bezeichnet. Aus den Ergebnissen der Versuche wurde das arithmetische Mittel (MW) gebildet, die dazugehörige Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Aufgrund der großen Varianz der basalen Werte innerhalb einer Versuchsgruppe wurden die statistischen Berechnungen zu den Blutdruckwerten und der Intravitalmikroskopie an normierten Werten durchgeführt. Hierfür wurden die Werte der verschiedenen Messzeitpunkte über einen Quotienten (Werte der Intravitalmikroskopie) bzw. über eine Differenz (Blutdruckwerte) zu den entsprechenden Ausgangswerten normiert. Hingegen wurden die statistischen Analysen der Hämatokritwerte an den Messdaten durchgeführt, da diese Werte nur eine geringe Streuung besaßen. Anschließend wurden die Signifikanzen aufgrund der geringen Größen der Versuchsgruppen mit Verfahren der nichtparametrischen Datenverteilung berechnet, was zuvor durch Probability Plots getestet wurde.

Dabei wurden zur Beschreibung mehrerer abhängiger Variablen die Signifikanzen mittels Friedmann-Anova berechnet und als Post-Hoc-Test für zwei voneinander abhängigen Variablen der Wilcoxon-Test verwendet.

Um die Signifikanz mehrerer unabhängiger Parameter zu berechnen, wurde die Kruskal-Wallis-Anova genutzt. Anschließend wurde der Mann-Whitney-U-Test als Post-Hoc-Test angewandt. Da letzterer bei einer kleinen Versuchszahl auch bei bestehender Signifikanz negativ ausfallen kann, wurden die Daten mittels Box-Plots überprüft. Zeigten sich dabei tendenzielle Unterschiede zwischen den zu analysierenden Gruppen, wurden die Daten nochmals von Stefan Englert (Lehrstuhl für Statistik, Universität Würzburg) mit einem Permutationstest (siehe Anhang) überprüft.

Ein p-Wert kleiner als 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet. Auf eine Bonferroni-Korrektur (durch den Bonferroni-Hol-Test) wurde verzichtet, da es bei einer geringen Anzahl von Experimenten durch die drei aufeinander folgenden Tests zu einem Verlust der Signifikanzen kommen könnte. Alle der

genannten Berechnungen wurden mit dem Programm STATISTICA (StatSoft®) angefertigt.

3 Ergebnisse

Durch vergleichende Untersuchungen an Floxed GC-A (Kontroll-), GC-A -/- und EC GC-A KO Mäusen wurde in dieser Arbeit die Beteiligung des vaskulären Endothels an den akuten hypotensiven und hypovolämischen Effekten des atrialen natriuretischen Peptids analysiert. Dafür wurde zum einen invasiv der Blutdruck in der A. carotis communis gemessen und zum anderen die kurzfristige Änderung des intravasalen Volumens indirekt mittels Hämatokritmessung erfasst. Anschließend wurde die für diese Effekte möglicherweise ursächliche Veränderung der endothelialen Permeabilität für FITC-Albumin durch die Cremasterpräparation und Intravitalmikroskopie analysiert. Letztlich wurde ein dafür infrage kommendes Protein der zugrunde liegenden Signalkaskade mittels Western Blot untersucht.

3.1 Ausgangsparameter der verwendeten transgenen Mausmodelle

Die nachfolgende Tabelle schildert das durchschnittliche Alter und Gewicht sowie den gemittelten Hämatokrit und systolischen arteriellen Blutdruck der verwendeten Mäuse (Tabelle 13).

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Mausmodellen in Bezug auf die durchschnittlichen Hämatokritwerte. Dabei besaßen die Floxed GC-A den höchsten (46.01), die EC GC-A KO den mittleren (44.57) und die GC-A -/- Mäuse den niedrigsten Hämatokrit (41.77). Dadurch wird ein signifikant erhöhtes intravasales Volumen bei den EC GC-A KO und GC-A -/- Mäusen im Vergleich zu den Floxed GC-A Mäusen angedeutet (siehe 2.7 und 4.4). Des Weiteren unterscheiden sich auch die Hämatokritwerte der EC GC-A KO Mäuse signifikant von denen der GC-A -/- Mäusen, was eine noch stärker ausgeprägte Hypervolämie bei den GC-A -/- im Vergleich zu den EC GC-A KO Mäusen implizieren könnte.

Ebenfalls ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Mausmodellen bezüglich ihres Gewichts, wobei die Floxed GC-A (31.61 g) und EC GC-A KO Mäuse (29.61 g) ein signifikant höheres Gewicht als die GC-A -/- Mäuse (26.25) besaßen. Möglicherweise kann dies auf eine reduzierte Synthese von Adiponectin in den Adipozyten der GC-A -/- Mäuse durch ANP und der dadurch gesteigerten Lipolyse bzw. verminderten Speicherung von Triacylglycerinen zurückgeführt werden.

Hingegen konnten unter der Narkose (2.5) keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der basalen systolischen arteriellen Blutdrücke zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt und die bereits von Lopez et al. sowie Sabrane et al. publizierten Daten nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass die Narkose offensichtlich einen großen Einfluss auf den systolischen arteriellen Blutdruck besitzt.

Tabelle 13: Durchschnittswerte (MW \pm SEM) des Alters, Gewichts, Hämatokrits und systolischen arteriellen Blutdrucks der verwendeten Versuchstiere

Genotyp/Anzahl	Gewicht in g	Alter in Monaten	Hämatokrit in %	systolischer BD in mmHg
Floxed GC-A (= Kontrollen)	31.61 \pm 1.09	7.4 \pm 0.32	46.01 \pm 0.3	116.52 \pm 5.71
▪ 25 Weibchen				
▪ 13 Böcke				
EC GC-A KO	29.61 \pm 1.1	6.8 \pm 0.32	44.57 \pm 0.26 *	115.48 \pm 5.57
▪ 25 Weibchen				
▪ 13 Böcke				
GC-A -/-	26.25 \pm 0.82 ^{*,§}	7.8 \pm 0.14 [§]	41.77 \pm 0.25 ^{*,§}	117.93 \pm 2.95
▪ 24 Weibchen				
▪ 3 Böcke				

p <0.05 * vs. Floxed GC-A, § vs. EC GC-A KO

3.2 Die endotheliale GC-A ist an der akuten Regulation des arteriellen Blutdrucks durch ANP beteiligt

Um die akuten endothelabhängigen Effekte von ANP auf den Blutdruck zu überprüfen, wurde der arterielle Blutdruck von Floxed GC-A (Kontroll-), EC GC-A KO und GC-A -/- Mäuse unter Vehikel- und ANP-Infusion gemessen. Dafür wurden die Versuchstiere intraperitoneal mittels Fentanyl, Midazolam und Medetomidin narkotisiert (siehe 2.5) und ihnen anschließend auf der rechten Seite ein Katheter zur Substanzapplikation in die Vena jugularis und ein zweiter Katheter zur Blutdruckmessung in die Arteria carotis communis implantiert (siehe 2.6). Nach dem operativen Eingriff wurde über 50 min die Infusion mit

2 % (w/v) BSA + RL bzw. ANP gestartet und alle 5 min der systolische Blutdruck bestimmt (Abbildungen 7 – 10). Für die graphischen Darstellungen wurden die Differenzen der systolischen Blutdruckwerte zum Ausgangswert vor Infusionsbeginn (Zeitpunkt 0 min) gegen die Zeit aufgetragen.

Dabei zeigten die Floxed GC-A Mäuse bereits unter Vehikel-Infusion in den ersten 30 min einen ausgeprägten Abfall des systolischen Blutdrucks um 29 mmHg, der sich anschließend stabilisierte (Abbildung 7). Unter der ANP-Infusion (500 ng/kg (KG)/min) wurde im Vergleich zur Vehikel-Infusion ein stärkerer systolischer Blutdruckabfall beobachtet. Dabei sank der SBD unter ANP in den ersten 30 min bereits um 52 mmHg und stabilisierte sich dann ebenfalls. Durch den ANP-induzierten stärkeren Blutdruckabfall waren im statistischen Vergleich zwischen den beiden Blutdruckkurven zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 45 min und 50 min signifikante Unterschiede vorhanden.

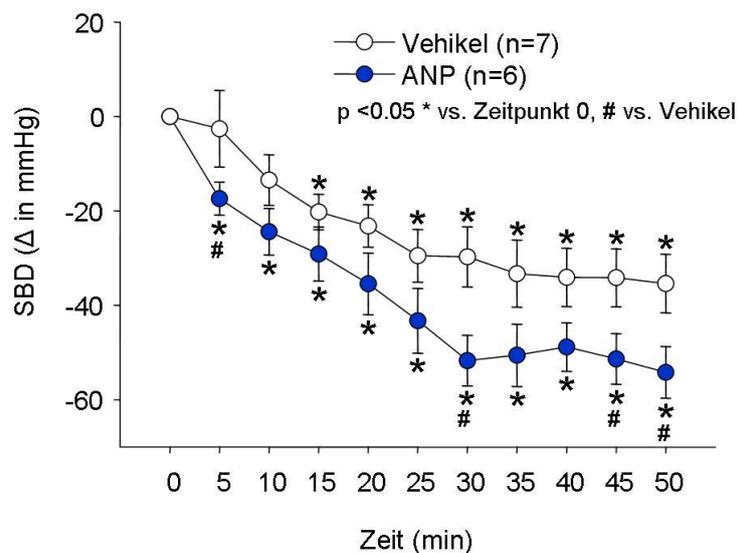


Abbildung 7: Systolischer arterieller Blutdruck der Floxed GC-A Mäuse unter Vehikel- bzw. ANP-Infusion

Nach der Narkose und Implantation eines venösen und eines arteriellen Katheters wurden alle 5 min die systolischen Blutdruckwerte während der Vehikel- bzw. ANP-Infusion bestimmt. Unter ANP-Infusion (500 ng/kg (KG)/min) war der Abfall des SBD stärker ausgeprägt als unter Vehikel-Infusion. Im statistischen Vergleich des SBD beider Genotypen mittels Permutationstest ergaben sich zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 45 min und 50 min signifikante Unterschiede.

Auch die GC-A $-/-$ Mäuse zeigten bereits unter Vehikel-Infusion einen milden systolischen Blutdruckabfall von 24 mmHg (Abbildung 8). Dagegen unterschied sich der systolische arterielle Blutdruckverlauf der GC-A $-/-$ Mäuse im Vergleich

zu den Floxed GC-A Mäusen unter ANP-Infusion deutlich, da der dort beobachtete verstärkte Blutdruckabfall unter ANP bei den GC-A $-/-$ Mäusen komplett aufgehoben war. Im Mittel sank der SBD durch die ANP-Infusion lediglich um 31 mmHg und unterschied sich dadurch nicht signifikant von der Vehikel-Infusion.

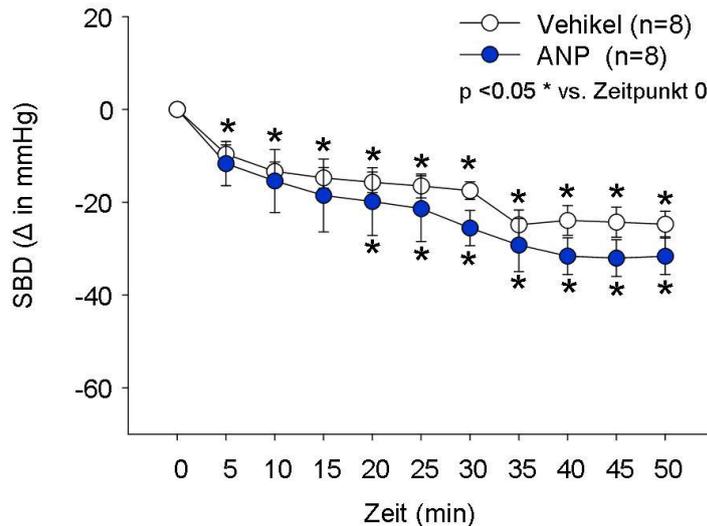


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf des SBD von GC-A $-/-$ Mäusen unter Vehikel- und ANP-Infusion

Unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei den Floxed GC-A Mäusen wurden die Blutdruckmessungen an GC-A $-/-$ Mäusen durchgeführt. Bei diesem Genotyp fiel ebenfalls der systolische Blutdruck unter Vehikel-Infusion ab. Jedoch blieb der an den Kontroll-Mäusen beobachtete stärkere Blutdruckabfall unter ANP-Infusion (500 ng/kg (KG)/min) aus. Es zeigte sich hingegen ein gleichermaßen ausgeprägter Abfall des systolischen Blutdrucks sowohl unter Vehikel- als auch ANP-Infusion.

Um die Beteiligung des Endothels an den hypotensiven Effekten des ANP zu analysieren, wurden nun die EC GC-A KO Mäuse mit der Vehikel- bzw. ANP-Infusion behandelt. Dabei sank auch bei diesem Genotyp der SBD bereits unter basalen Bedingungen um 27 mmHg (Abbildung 9). Genau wie die GC-A $-/-$ Mäuse reagierten die EC GC-A KO Mäuse im Vergleich zu den Floxed GC-A Mäusen auf die ANP-Infusion mit einem deutlich abgeschwächten bzw. an einigen Zeitpunkten (5 min, 20 min, 50 min) komplett aufgehobenen Blutdruckabfall. Dabei sank der SBD unter ANP-Infusion im Mittel lediglich um 34 mmHg ab und unterschied sich deshalb nicht signifikant von den Blutdruckwerten unter Vehikel-Infusion. Auch der statistische Vergleich mit den GC-A $-/-$ Mäusen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Genotypen.

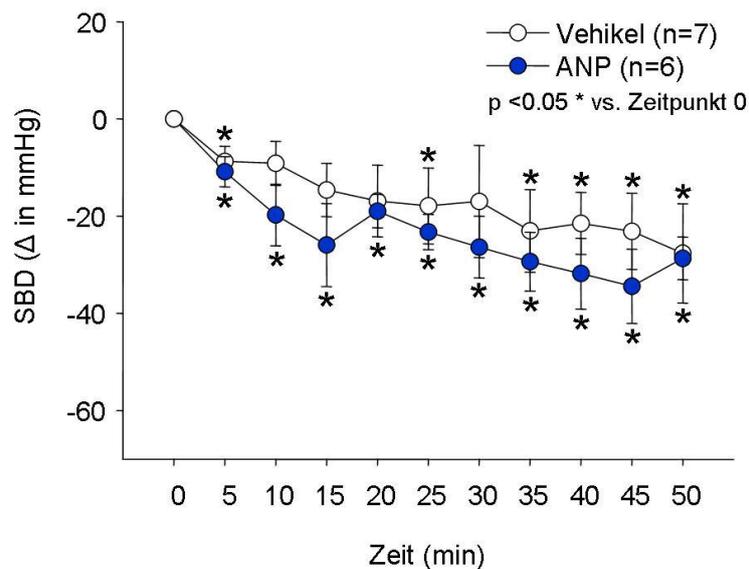


Abbildung 9: Systolischer arterieller Blutdruck der EC GC-A KO Mäuse unter Vehikel- oder ANP-Infusion

Im Anschluss an die operativen Katheterimplantationen wurde den Mäusen 2 % (w/v) BSA + RL bzw. ANP (500 ng/kg (KG)/min) mit einer Rate von 4 μ l/g (KG)/h infundiert und alle 5 min der SBD gemessen. Auch bei diesen Experimenten war ein leichter Blutdruckabfall unter der Vehikel-Infusion zu erkennen.

Jedoch war ein signifikanter Unterschied zwischen den Blutdruckwerten der EC GC-A KO Mäuse unter ANP-Infusion und denen der Floxed GC-A KO Mäuse unter ANP-Infusion ab der zwanzigsten Minute zu erkennen (Abbildung 10).

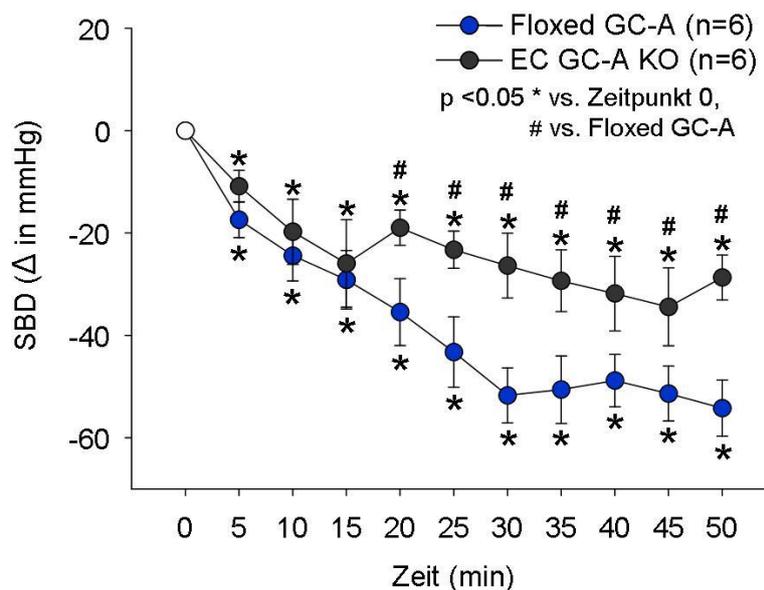


Abbildung 10: Zusammenfassung der SBD von Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäuse unter ANP-Infusion

Bereits nach 20 min ANP-Infusion waren signifikante Unterschiede zwischen den Blutdruckwerten der Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäuse vorhanden.

Im Ergebnis zeigten diese Versuche, dass der akute hypotensive Effekt von ANP an EC GC-A KO Mäusen im Vergleich zu den Floxed GC-A Mäusen aufgehoben ist, obwohl die direkte vasorelaxierende Wirkung von ANP bei diesem Genotyp vollständig erhalten geblieben ist¹²⁶. Daraus kann geschlossen werden, dass die endotheliale Guanylyl Cyklase-A an den akuten hypotensiven Effekten von ANP beteiligt ist. Aus diesem Grund muss neben der direkten vasorelaxierenden Wirkung noch ein zweiter Mechanismus zur akuten Blutdruckregulation durch ANP existieren.

3.3 ANP bewirkt über die endotheliale GC-A eine akute Steigerung des Hämatokrits

Als Ursache für den verminderten Blutdruckabfall der EC GC-A KO Mäuse unter ANP-Infusion wurde eine verminderte Reduktion des Plasmavolumens postuliert. Dies wurde nun indirekt mittels Hämatokritmessungen unter Vehikel- und ANP-Infusion an Floxed GC-A, EC GC-A KO und GC-A -/- Mäusen untersucht. Hierzu wurden die Versuchstiere intraperitoneal narkotisiert (2.5) und ein Katheter in die Vena jugularis implantiert (siehe 2.6). Anschließend wurde über diesen die Infusion mit 2 % (w/v) BSA + RL bzw. ANP (500 ng/kg (KG)/min) mit einer Rate von 4 µl/g (KG)/h für 60 min gestartet und zu den Zeitpunkten 0 Minuten (vor Infusionsbeginn), 30 Minuten und 60 Minuten der Hämatokrit in einer retrobulbär entnommenen Blutprobe bestimmt (Abbildung 11 und Abbildung 12).

Bei den Floxed GC-A Mäusen stieg der Hämatokrit unter der Vehikel-Infusion nach 30 min signifikant um 2.3 % an. Auch die GC-A -/- und EC GC-A KO Mäuse reagierten auf die Vehikel-Infusion nach 30 min mit einer leichten Änderung des Hämatokrits. Hierbei stieg der Hämatokrit bei den GC-A -/- Mäusen um 0.16 % und bei den EC GC-A KO Mäusen um 0.58 % an (Abbildung 11). Jedoch waren diese milden Hämatokritänderungen nach 60 min reversibel und normalisierten sich wieder auf die Ausgangswerte. Im Ergebnis zeigten somit die Hämatokritwerte aller Genotypen unter Vehikel-Infusion einen ähnlichen Verlauf und wurden durch diese nicht wesentlich beeinflusst. Da die initialen Hämatokritwerte der EC GC-A KO Mäuse deutlich niedriger als die der Floxed GC-A Mäuse waren, unterschieden sich diese beiden Genotypen zu den Messzeitpunkten 0 Minuten und 30 Minuten signifikant voneinander. Ebenfalls konnten aus diesem Grund auch signifikante Unterschiede zwischen den

Floxed GC-A und den GC-A $-/-$ Mäusen zu allen Messzeitpunkten festgestellt werden.

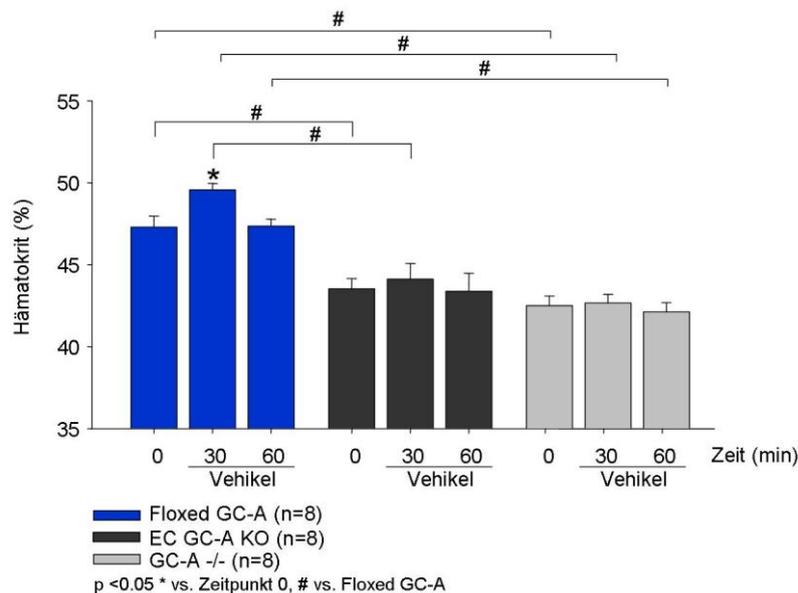


Abbildung 11: Hämatokrit-Werte (%) von Floxed GC-A, EC GC-A KO und GC-A $-/-$ Mäusen während der Vehikel-Infusion zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min und 60 min (Börner, Schreier et al., *Endocrinol* 2008)

Nach der Narkose und Katheterimplantation in die Vena jugularis wurde die 2 % (w/v) BSA + RL Infusion (4 μ l/g (KG)/h) gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde retrobulbär Blut zur Hämatokritbestimmung entnommen. Alle drei Genotypen zeigten nach 30 min einen milden Anstieg des Hämatokrits, der aber nach 60 min Infusion reversibel war. Im statistischen Vergleich waren die Hämatokritwerte der EC GC-A KO Mäuse zu den Zeitpunkten 0 Minuten und 30 Minuten sowie der GC-A $-/-$ Mäuse zu allen Messzeitpunkten gegenüber denen der Floxed GC-A Mäuse signifikant niedriger.

In der nächsten Versuchsreihe wurden Mäuse aller drei Genotypen ANP mit einer Dosis von 500 ng/kg (KG)/min und einer Rate von 4 μ l/g (KG)/h infundiert und der Hämatokrit bestimmt (Abbildung 12). Jedoch gab es bei dieser Versuchsreihe nur zwischen den Ausgangswerten (vor Infusionsbeginn) der Floxed GC-A und GC-A $-/-$ Mäuse einen signifikanten Unterschied, nicht aber zwischen denen der Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäuse. Durch die ANP-Infusion stieg der Hämatokrit der Floxed GC-A Mäuse bereits nach 30 min signifikant um 6.24 % an und verblieb auch nach 60 min konstant auf diesem Wert erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten die GC-A $-/-$ Mäuse unter der ANP-Infusion nach 30 min einen signifikanten Abfall des Hämatokrits um 2.59 % bzw. nach 60 min Infusion um 4.91 % und unterschieden sich deshalb zu diesen Zeitpunkten signifikant von den Floxed GC-A Mäusen.

Zur Analyse der Bedeutung der endothelialen GC-A für die akuten Veränderungen des Hämatokrits wurden anschließend EC GC-A KO Mäuse mit

ANP infundiert. Auch dieser Genotyp reagierte auf die ANP-Infusion mit einem signifikanten Abfall des Hämatokrits um 2.54 % nach 30 min und um weitere 1.89 % nach 60 min Infusion. Aufgrund der bereits basal erhöhten Hämatokritwerte der EC GC-A KO Mäuse im Vergleich zu den GC-A -/- Mäusen unterschieden sich diese Genotypen zu allen Messzeitpunkten signifikant voneinander. Des Weiteren ergaben sich ab der 30. Minute signifikante Unterschiede zwischen den Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäusen, da ihre Hämatokritwerte gegensätzliche Verläufe aufwiesen.

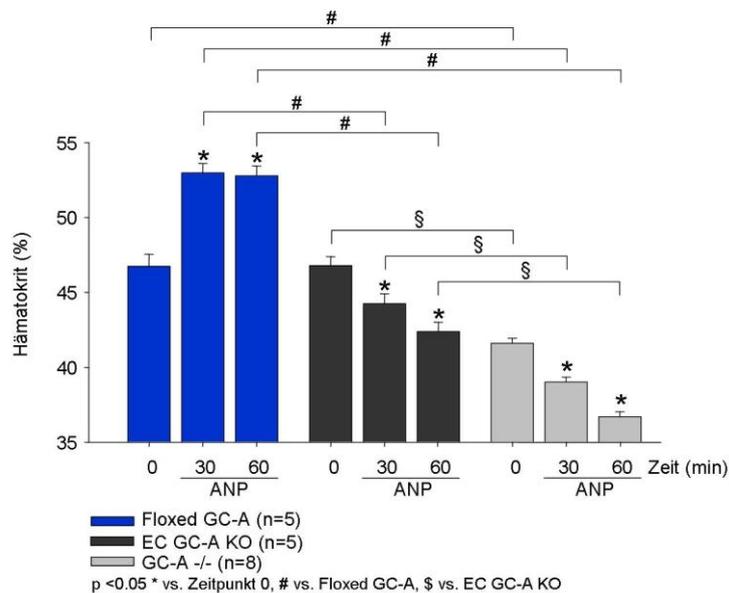


Abbildung 12: Messung des Hämatokrits (%) der Floxed GC-A, EC GC-A KO und GC-A -/-Mäusen vor (0 Minuten), während (30 Minuten) und nach (60 Minuten) der ANP-Infusion (Börner, Schreier et al., Endocrinol 2008)

Die Mäuse wurden narkotisiert und ein venöser Zugang in die Vena jugularis zur Infusion implantiert. Während der Substanzapplikation (4 µl/g (KG)/h) wurde in 30-minütigen Abständen der Hämatokrit im retrobulbär entnommenen Blut bestimmt. Dabei zeigten die Floxed GC-A Mäuse bereits nach 30 min ANP-Infusion (500 ng/kg (KG)/min) einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits. Hingegen wiesen die GC-A -/- und EC GC-A KO Mäuse einen durchgängig signifikanten Abfall des Hämatokrits bis zur 60. Minute auf.

Im Ergebnis wurde durch diese Versuche ein Anstieg des Hämatokrits der Floxed GC-A Mäuse unter ANP-Infusion gezeigt. Paradoxerweise war dieser Effekt an den GC-A -/- und den EC GC-A KO Mäusen nicht nur aufgehoben bzw. vermindert, sondern sie reagierten sogar mit einem signifikanten Abfall des Hämatokrits auf die ANP-Infusion. Aus diesen Beobachtungen lässt sich vermuten, dass die endotheliale GC-A über eine Reduktion des Plasmavolumens an dem hypotensiven Effekt des ANP beteiligt ist. Im Gegensatz dazu führt ANP möglicherweise bei den GC-A -/- und EC GC-A KO Mäusen über einen zweiten, noch unbekanntem, Mechanismus zu einer

endothelvermittelten Zunahme des intravasalen Volumens, wodurch der ausgebliebene Blutdruckabfall unter ANP bei diesen beiden Genotypen (siehe 3.2) erklärt werden könnte.

3.4 Durch die Aktivierung der endothelialen GC-A mittels ANP wird die mikrovaskuläre Permeabilität für Albumin erhöht

Die zuvor geschilderten Versuche belegen, dass endotheliale Effekte an den akuten hypotensiven und hypovolämischen Wirkungen von ANP beteiligt sind. Indirekte Beobachtungen von Sabrane et al., 2005 ließen vermuten, dass ANP die endotheliale Permeabilität für Makromoleküle wie Albumin stimuliert. Darüber könnte das intravasale Plasmawasser entlang eines onkotischen Gradienten in das Interstitium entweichen und das Plasmavolumen vermindern. Dieser Mechanismus würde in einem Anstieg des Hämatokrits resultieren (siehe 3.3) und den systolischen arteriellen Blutdruck senken (siehe 3.2).

Um dieser Hypothese nachzugehen wurde bei Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäusen nach Narkose und Katheterimplantation in die V. jugularis (siehe 2.5 und 2.6) der M. cremaster präpariert und mittels Intravitalmikroskopie die Extravasation von FITC-BSA an postkapillären Venolen während der 60-minütigen ANP-Infusion (500 ng/kg (KG)/min, mit 4 µl/g (KG)/h, i.v.) analysiert (Abbildung 13). Anschließend wurde die Infusion gestoppt und Histamin (80 µM) auf den Muskel mit einer Rate von 3000 µl/h superfundiert, um die Funktionsfähigkeit der Gefäße mittels weiterer Permeabilitätssteigerung zu überprüfen (siehe 2.12).

In Abbildung 13A sind Ausschnitte aus der Intravitalmikroskopie beider Genotypen zu den Zeitpunkten 0 min (vor Infusionsbeginn), 20 min, 60 min (während der ANP-Infusion) und 80 min (nach Histaminsuperfusion) dargestellt. Unter der ANP-Infusion war bei den Floxed GC-A Mäusen ein milder Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz (als Hinweis für die Extravasation von FITC-Albumin) zu erkennen, der durch die anschließende optische und statistische Auswertung bestätigt werden konnte (Abbildung 13B). Dagegen blieb dieser Effekt bei den EC GC-A KO Mäusen aus. Es schien sogar, dass die Fluoreszenz im Interstitium unter der ANP-Infusion abnahm. Hingegen war bei beiden Genotypen ein ähnlich starker Fluoreszenzanstieg im interstitiellen Raum während der Histaminsuperfusion zu beobachten.

Zur graphischen Auswertung wurden die Intensitäten des Extravasaalraums mittels Quotienten auf den Zeitpunkt vor Infusionsbeginn normiert und im zeitlichen Verlauf dargestellt. Dabei bestätigte die Messung der Intensitäten den optischen Eindruck aus den Aufnahmen der Intravitalmikroskopie. Die Floxed GC-A Mäuse zeigten bereits nach 20 min ANP-Infusion einen leichten Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz um ca. 5 %, die sich bis zum Ende der Infusion nicht weiter veränderte. Hingegen wurde für die EC GC-A KO Mäuse vermutet, dass der permeabilitätssteigernde Effekt von ANP bei diesem Genotyp fehlte. Jedoch reagierten die Versuchstiere bereits nach 10 min ANP-Infusion sogar mit einem milden Abfall der extravasalen Fluoreszenz um 4.5 %. Auch diese Abnahme verblieb bis zum Versuchsende auf einem relativ konstanten Level. Aufgrund der gegenläufigen Effekte von ANP an den beiden Genotypen ergaben sich bereits nach 10 min, 20 min, 40 min und 50 min signifikante Unterschiede zwischen den Effekten von ANP. Auf die anschließende Permeabilitätssteigerung mittels Histaminsuperfusion reagierten beide Genotypen mit einem starken Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz. Dieser betrug im Durchschnitt bei den Floxed GC-A Mäusen 12.9 % und bei den EC GC-A KO Mäusen 12.3 %, weshalb während der Histaminsuperfusion kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Populationen beobachtet werden konnte.

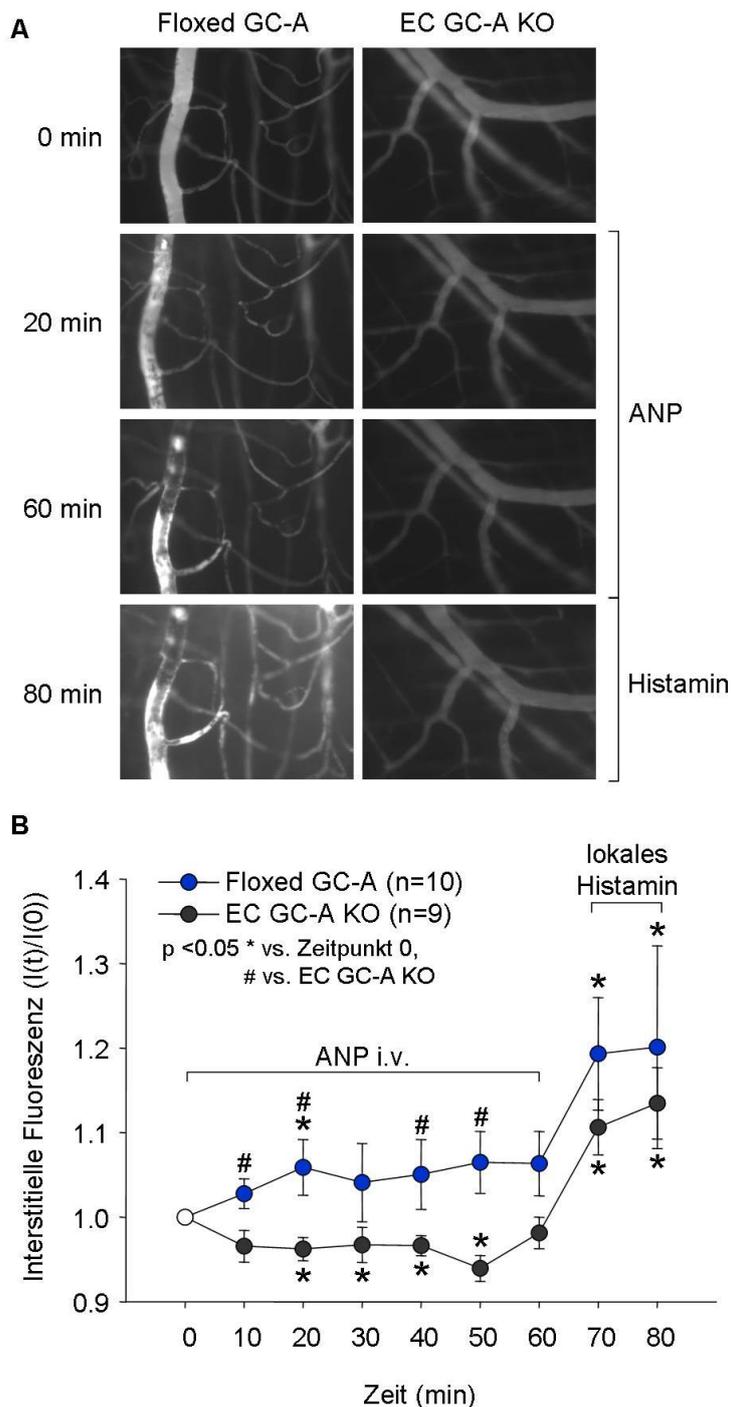


Abbildung 13: Intravital-Mikroskopie am M. cremaster: Permeabilitätsmessungen an Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäusen unter ANP-Infusion

A Durch die ANP-Infusion wurde bei den Kontrolltieren die Permeabilität für FITC-BSA an den postkapillären Venolen gesteigert, wohingegen die basal vorliegende Permeabilität bei den EC GC-A KO Mäusen gesenkt wurde. Durch die anschließende Histaminsuperfusion wurde die Permeabilität bei beiden Genotypen prompt und gleichermaßen erhöht.

B Bereits nach 20 min zeigte sich in den Floxed GC-A Mäusen ein signifikanter Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz, der bis zum Versuchsende erhöht blieb. Dagegen war bei den EC GC-A KO Mäusen nach 20 min ein signifikanter Abfall der Fluoreszenz zu beobachten. Auch diese Veränderung blieb bis zum Versuchsende (60 min ANP-Infusion) erhalten. Auf die anschließende Histaminsuperfusion reagierten beide Genotypen mit einem ähnlich starken Austritt des FITC-BSA

Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass durch ANP die endotheliale Permeabilität für Albumin an den postkapillären Venolen der Floxed GC-A Mäuse gesteigert wird. Dagegen reagierten die EC GC-A KO Mäuse paradoxerweise mit einer Abnahme der interstitiellen Fluoreszenz unter ANP-Infusion, ein Effekt der auf eine Verminderung der an diesem Gefäßbereich physiologisch vorkommenden Permeabilität für Albumin schließen lässt.

3.5 ANP stimuliert die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)

Aus bereits publizierten *in vitro* Daten von Smolenski et al., 2000 entstand die folgende Hypothese zur intrazellulären Signaltransduktion für die beobachteten endothelialen Effekte von ANP. Hierbei wurde postuliert, dass durch die steigende cGMP-Konzentration die cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (PKG-1) aktiviert wird. Diese phosphoryliert wiederum VASP, welches die Eigenschaft besitzt, mit Bestandteilen des Membranskeletts (Plaqueproteinen, wie z. B. Vincullin oder Zyxin) und des Zytoskeletts (wie z. B. Aktinfasern) zu interagieren, so dass dadurch möglicherweise die parazelluläre Permeabilität der Endothelzellen erhöht wird.

Für die Milz wurde bereits eine hohe VASP-Expression¹⁷² und eine um ca. 20 – 30 % verminderte Albuminextravasation bei den EC GC-A KO Mäusen nach ANP-Infusion¹²⁶ nachgewiesen. Aus diesen Gründen wurde zur Überprüfung der zuvor aufgeführten Hypothese nach Vehikel- und ANP-Infusion (500 ng/kg (KG)/min) mit einer Rate von 4 µl/g (KG)/h die Milz sowohl bei den Floxed GC-A als auch EC GC-A KO Mäusen entfernt. Anschließend wurde diese homogenisiert und mittels selektiver Antikörper die PKG- (Ser 239) und Proteinkinase A- (PKA)-spezifische (Ser 159) Phosphorylierungsstellen von VASP mittels Western Blot dargestellt (Abbildung 14A). Zur anschließenden graphischen Quantifizierung und Darstellung der Blots wurden die Signalstärken der P-VASP-Banden auf die der jeweiligen GAPDH-Banden normiert (Abbildung 14B).

Im Western Blot zeigte sich bei den Kontroll-Mäusen eine signifikant erhöhte PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP nach ANP-Infusion als nach Vehikel-Infusion (Abbildung 14A und B). Gleichzeitig war aber auch erstaunlicherweise die PKA-spezifische Phosphorylierungsstelle nach ANP-Infusion im Vergleich zur Vehikel-Infusion signifikant stärker phosphoryliert. Dagegen war dieser Effekt bei den EC GC-A KO Mäusen nicht nur vermindert bzw. aufgehoben, sondern sogar entgegengesetzt. An Tieren dieses Genotyps waren sowohl die PKG- als auch die PKA-abhängigen Phosphorylierungen von VASP nach ANP-Infusion im Vergleich zur Vehikel-Infusion signifikant vermindert. Da die Western Blots der PKA- und PKG-abhängigen Phosphorylierung auf unterschiedlichen Filmen entwickelt wurden, konnte der basale Phosphorylierungszustand von VASP in den Milzhomogenaten aus Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäusen nicht verglichen werden.

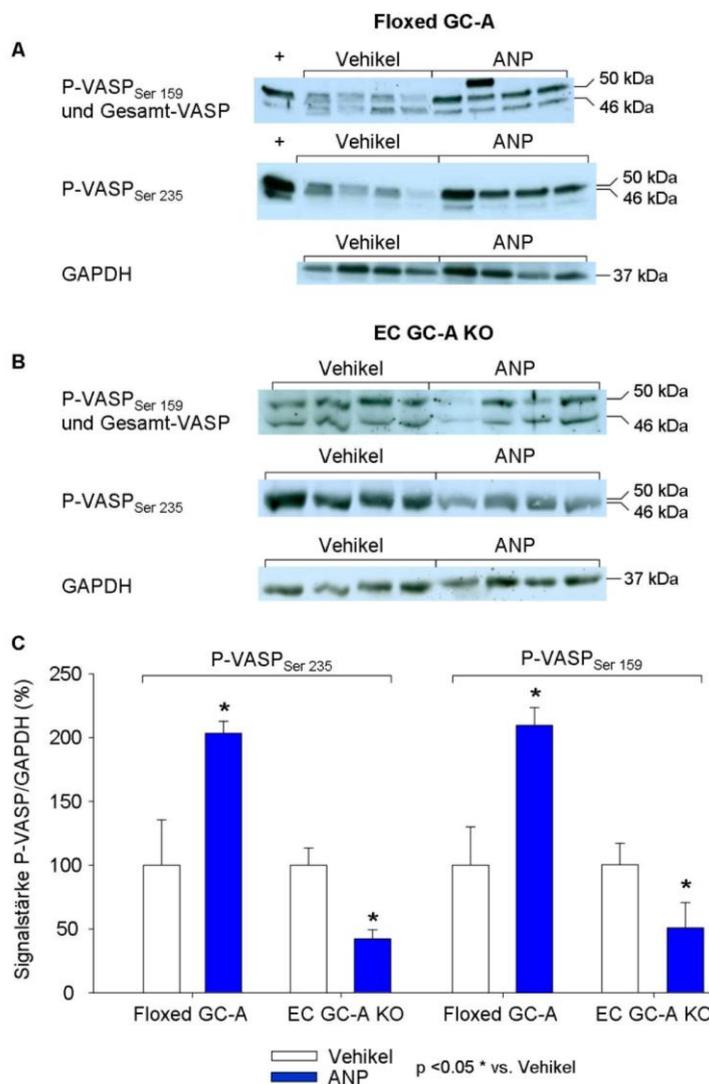


Abbildung 14: P-VASP Western Blot: Proteinextrakte aus Milzgewebe von Kontroll- und EC GC-A KO Mäusen nach 60 min Vehikel- bzw. ANP-Infusion

Nach Vehikel- bzw. ANP-Infusion wurde die Milz von Kontroll- und EC GC-A KO Mäusen entfernt. Anschließend wurde mittels Western Blot der Phosphorylierungszustand von VASP als ein möglicher Bestandteil der intrazellulären Signalkaskade dargestellt (**A, B**) und graphisch quantifiziert (**C**). Dabei zeigten die Kontroll-Mäuse nach ANP-Infusion eine signifikante Erhöhung der PKG- und PKA-abhängigen Phosphorylierung von VASP im Vergleich zur Vehikel-Infusion (**A**). Paradoxe Weise zeigten die EC GC-A KO Mäuse sogar eine signifikante Verminderung der PKG- und PKA-abhängigen VASP-Phosphorylierung unter der ANP-Behandlung im Vergleich zur Vehikel-Infusion (**B**). Als Positivkontrolle (+) wurden Proteinextrakte aus NO-stimulierten Plättchen verwendet.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass durch ANP die Proteinkinase G I-abhängige (PKG I) Phosphorylierung von VASP gesteigert wird. Gleichzeitig erfolgt aber auch durch einen zweiten unbekanntem Mechanismus eine verstärkte Proteinkinase A-vermittelte (PKA) Phosphorylierung von VASP. Unerwarteterweise wird bei den EC GC-A KO Mäusen hingegen sowohl die PKA- als auch PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP in der Milz mittels ANP vermindert.

3.6 Die Interaktion von ANP mit dem GC-B-Rezeptor ist nicht für den Abfall des Hämatokrits bei den EC GC-A KO Mäuse verantwortlich

Wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben, hatte ANP gegensätzliche Effekte auf den Hämatokrit von Floxed GC-A Mäusen (Hkt-Anstieg) und von EC GC-A KO bzw. GC-A $-/-$ Tieren (Hkt-Abfall), wobei letzteres u. a. durch eine akute Zunahme des intravasalen Flüssigkeitsvolumens hervorgerufen werden könnte. Da ANP in hohen Konzentrationen auch zu einem geringen Maß an die Guanylyl Cyklase B (GC-B, Rezeptor für CNP) binden kann ⁸⁷, wurde nun den GC-A $-/-$ Mäusen unter gleichen Versuchsbedingungen CNP (500 ng/kg (KG)/min) mit einer Rate von 4 μ l/g (KG)/h infundiert. Dadurch sollte die Bedeutung der GC-B für den beobachteten Hämatokritabfall unter ANP-Infusion untersucht werden. Während der Infusion wurde alle 30 min der Hämatokrit nach retrobulbärer Blutentnahme bestimmt (Abbildung 15).

Nach dem Start der CNP-Infusion war ein sehr milder, aber nicht signifikanter Abfall des Hämatokrits zu beobachten. Dabei sank dieser nach 30 min um 1.6 % und nach 60 min um weitere 1.4 % ab. Aufgrund des milden, aber nicht signifikanten, Hämatokritabfalls unter der CNP-Infusion und den bereits etwas niedrigeren, aber ebenfalls nicht signifikanten, Basalwerten im Vergleich zu den mit der Vehikel-Infusion behandelten GC-A $-/-$ Mäusen ließ sich zu den Zeitpunkten 30 Minuten und 60 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Behandlungen erkennen. Somit konnte im Ergebnis durch diese Experimente gezeigt werden, dass die GC-B keinen eigenständigen signifikanten Effekt auf den Hämatokrit besitzt.

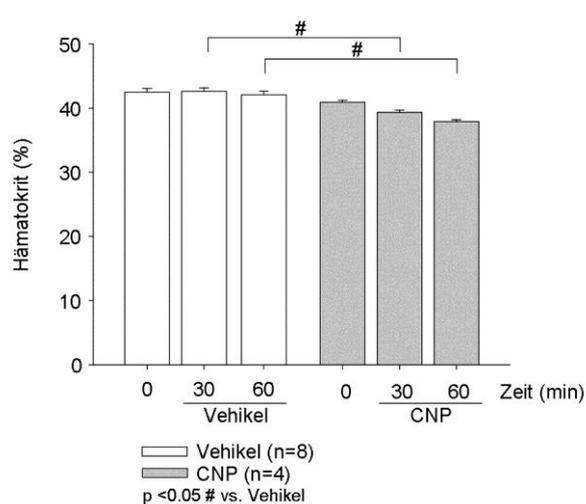


Abbildung 15: Hämatokritwerte (%) der GC-A $-/-$ Mäuse vor (0 min) und während (30 min, 60 min) der CNP-Infusion

Nach Narkose und Katheterimplantation in die Vena jugularis zur Substanzinfusion wurde die CNP-Infusion (500 ng/kg (KG)/min) gestartet und währenddessen der Hämatokrit mittels retrobulbärer Blutentnahme bestimmt. Es zeigte sich, dass CNP keinen signifikanten Effekt auf den Hämatokrit besitzt.

3.7 Durch die Aktivierung des NPR-C mittels cANP (4-23) wird der Hämatokrit gesenkt

Mittels des vorherigen Abschnittes konnte eine Beteiligung der GC-B an den hämatokritsenkenden Effekten von ANP bei den GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäuse ausgeschlossen werden. Da ANP auch mit hoher Affinität an einen zweiten Rezeptor, den natriuretischen Peptidrezeptor C (NPR-C, siehe 1.1.2) binden kann, wurde nun die Aktivierung dieses Rezeptors als Ursache dieser „paradoxen“ Effekte unter ANP-Infusion vermutet. Um der Bedeutung des NPR-C nachzugehen, wurde in dieser Versuchsreihe den Tieren der selektive NPR-C-Ligand cANP (4-23) in einer Dosis von 250 ng/kg (KG)/min infundiert, da dieser mit ca. 1.5 kDa nur die Hälfte des Molekulargewichts von ANP (ca. 3 kDa) besitzt.

Dazu wurden die Versuchstiere narkotisiert (siehe 2.5) und ein Katheter in die Vena jugularis zur Substanzapplikation implantiert (siehe 2.6). Anschließend wurde die cANP (4-23) Infusion mit einer Infusionsrate von 4 μ l/g (KG)/h gestartet und der Hämatokritwert in retrobulbär gewonnenem Blut gemessen (siehe 2.7).

Wie in Abbildung 16 gezeigt, wurde der Hämatokrit sowohl bei den Floxed GC-A und EC GC-A KO als auch den GC-A $-/-$ Mäusen durch die cANP (4-23)-Infusion signifikant vermindert. Der Hämatokrit sank bei den Floxed GC-A Mäusen nach 30 min um 1.26 % und nach 60 min um weitere 1.99 % signifikant ab. Dieser Effekt war bei den EC GC-A KO Mäusen deutlich stärker ausgeprägt. Bereits nach 30 min cANP (4-23)-Infusion war der Hämatokrit schon um 3.44 % und nach 60 min um insgesamt 7.11 % signifikant gesunken. Den stärksten Hämatokritabfall unter cANP zeigten jedoch die GC-A $-/-$ Mäuse. Bei diesen fiel der Hämatokrit bereits nach 30 min um 3.8 % signifikant und nach 60 min um weitere 2.29 % signifikant ab. Statistisch unterschieden sich die Hämatokritwerte der Floxed GC-A Mäuse zu den Zeitpunkten 30 min und 60 min signifikant von denen der EC GC-A KO Tiere sowie zu allen Messzeitpunkten von denen der GC-A $-/-$ Mäuse, da bei diesen Genotypen der Hämatokritabfall deutlich stärker ausgeprägt war. Auch im Vergleich zu den GC-A $-/-$ Mäusen waren signifikante Unterschiede der EC GC-A KO Mäuse zu den Zeitpunkten 0 min und 30 min vorhanden. Weiterhin unterschieden sich die basalen Hämatokritwerte vor Infusionsbeginn bereits deutlich voneinander. Bei den GC-A $-/-$ Mäusen war der Hämatokrit signifikant niedriger als bei den EC

GC-A KO sowie Floxed GC-A Mäusen und auch die Verminderung des Hämatokrits war bei den GC-A $-/-$ Mäusen in den ersten 30 min stärker ausgeprägt.

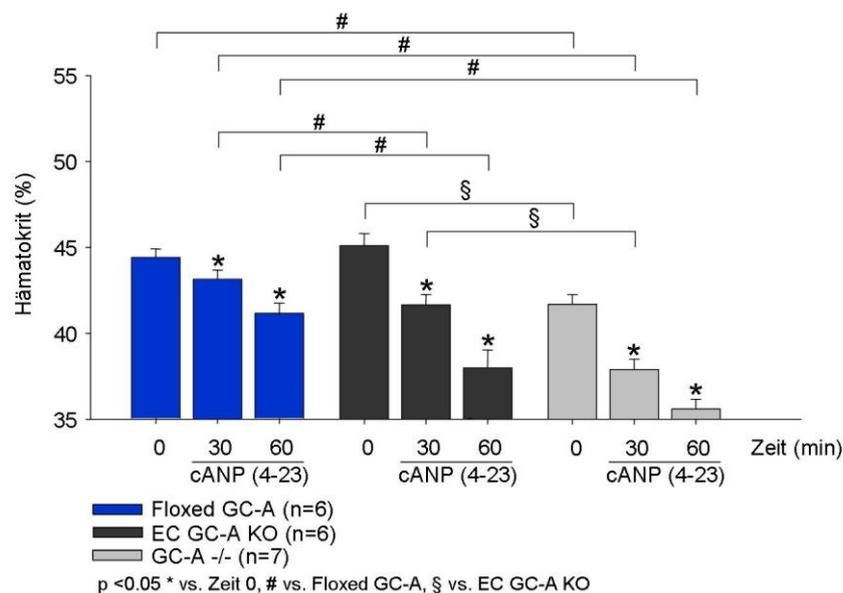


Abbildung 16: Effekte von cANP (4-23) auf den Hämatokrit von Floxed GC-A, GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäusen (Börner, Schreier et al., Endocrinol 2008)

Nach Narkose und Implantation des Jugulariskatheters wurde die cANP (4-23)-Infusion (250 ng/kg (KG)/min, 4 μ l/g (KG)/h) gestartet und der Hämatokrit in einer retrobulbär entnommenen Blutprobe bestimmt. Alle drei Genotypen reagierten mit einem signifikanten Abfall des Hämatokrits. Dieser Effekt war bei den GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäusen deutlicher ausgeprägt als bei den Floxed GC-A Tieren.

Zusammenfassend deuten diese Experimente darauf hin, dass die Aktivierung des NPR-C für die paradoxen hämatokritsenkenden Effekte der ANP-Infusion bei den GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäusen verantwortlich ist. Bei allen drei Genotypen senkte die cANP (4-23)-Infusion den Hämatokrit signifikant. Deshalb vermuten wir, dass diesem Effekt eine Steigerung des Plasmavolumens über eine NPR-C-vermittelte Reduktion der endothelialen Permeabilität für Makromoleküle (siehe 3.4) zugrunde liegt.

3.8 Stimulation des natriuretischen Peptidrezeptors C (NPR-C) mittels cANP (4-23) ändert nicht akut den Blutdruck

Aufgrund des akuten Blutvolumenanstiegs durch die Aktivierung des NPR-C stellte sich Frage, ob dies den systolischen arteriellen Blutdruck beeinflusst. Aus diesem Grund wurde nun der intravasale Blutdruck unter den zuvor beschriebenen Versuchsbedingungen (siehe 3.2) während einer Infusion mit

cANP (4-23) gemessen (Abbildung 17). Dafür wurden die Floxed GC-A, GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäuse narkotisiert (siehe 2.5) und ihnen ein Katheter zur Substanzinfusion in die Vena jugularis sowie ein Katheter zur intravasalen Blutdruckmessung in die Arteria carotis communis eingebunden (siehe 2.6). Anschließend wurde mit der Infusion von Vehikel- bzw. cANP (4-23)-Lösung (250 ng/kg (KG)/min, 4 μ l/g (KG)/h) begonnen und alle 5 min der systolische arterielle Blutdruck gemessen.

Auch in diesen Versuchen wurde bereits unter der Vehikel-Infusion eine Abnahme des systolischen arteriellen Blutdrucks bei allen drei verwendeten Mausmodellen beobachtet. Dieser sank bei den Floxed GC-A um 35 mmHg (Abbildung 17A), bei den GC-A $-/-$ um 24 mmHg (Abbildung 17B) und bei den EC GC-A KO Mäusen um 27 mmHg ab (Abbildung 17C). Ebenfalls zeigten die Blutdruckwerte unter der cANP (4-23)-Infusion bei allen 3 Genotypen einen äquivalenten Abfall wie unter Vehikel-Infusion. Dabei sanken diese bei den Floxed GC-A um 29 mmHg, bei den GC-A $-/-$ um 31 mmHg und bei den EC GC-A KO Mäusen um 25 mmHg ab. Aus diesem Grund ergaben sich auch bei allen verwendeten Mausmodellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Blutdruckwerten unter Vehikel- und cANP (4-23)-Infusion.

Somit konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass eine selektive Aktivierung des NPR-C mittels cANP (4-23) *in vivo* das Plasmavolumen akut steigert, aber dies keinen Einfluss auf die akute Regulation des systolischen arteriellen Blutdrucks besitzt. Möglicherweise sind dabei die Änderungen des Plasmavolumens nur sehr mild ausgeprägt oder spielen sich überwiegend im venösen Niederdrucksystem ab.

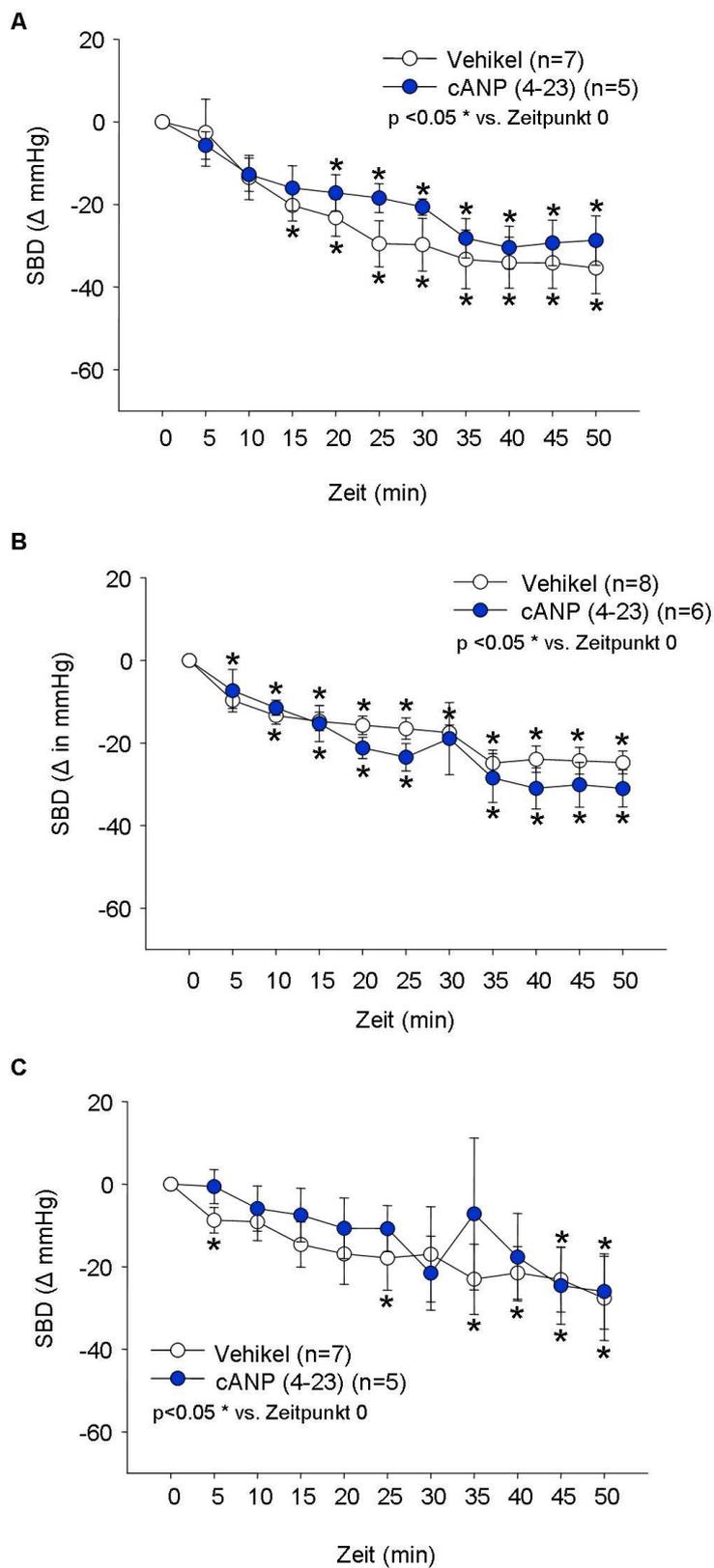


Abbildung 17: Verlauf des SBD von Floxed GC-A, GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäusen unter Vehikel- bzw. cANP (4-23)-Infusion

Nach Narkose und Katheterimplantation wurden die Floxed GC-A (A), die GC-A $-/-$ (B) und die EC GC-A KO Mäuse (C) mit Vehikel- bzw. cANP (4-23)-Infusion (250 ng/kg (KG)/min) mit einer Rate von 4 μ l/g (KG)/h infundiert und alle 5 min der SBD gemessen. Dabei sank bei allen drei Genotypen der SBD bereits unter Vehikel-Infusion ab. In gleichem Maß verminderte sich der SBD aller 3 Genotypen unter der cANP (4-23)-Infusion, weshalb sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Blutdruckwerten zu denen unter Vehikel-Infusion ergaben.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und Fazit

In der vorliegenden experimentellen Dissertationsarbeit wurden die kardiovaskulären Effekte des Herzhormons ANP vergleichend an Mäusen mit globaler oder Endothel-spezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors sowie an entsprechenden Kontrolltieren (mit normaler GC-A Expression, Floxed GC-A) untersucht. Die Ergebnisse belegen erstmals, dass endotheliale GC-A-vermittelte Effekte an den akuten hypotensiven und hypovolämischen Effekten von ANP beteiligt sind. Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation zeigten weiterhin, dass ANP die Permeabilität des mikrovaskulären Endothels für Albumin stimuliert. Dabei steigert der Austritt von Albumin den onkotischen Druck im Interstitium und fördert darüber den transkapillären Flüssigkeitsaustritt. Dieser Effekt hat vermutlich eine wichtige Bedeutung für die Regulation des intravasalen Volumens durch ANP. Immunoblot Analysen an Gewebeextrakten zeigten, dass der ANP/GC-A/cGMP-Signalweg durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein Kinase I das Zytoskelett-regulierende Protein VASP phosphoryliert. Diese Signalkaskade könnte an den permeabilitätsstimulierenden Effekten von ANP beteiligt sein. Letztlich konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass bei Deletion bzw. Dysfunktion des endothelialen GC-A-Rezeptors ANP sogar "paradoxe" Effekte auf die endotheliale Permeabilität (Abnahme) und das Plasmavolumen (Zunahme) ausübt. Diese Effekte scheinen durch den NPR-C Clearance-Rezeptor vermittelt zu sein.

4.2 Problematik der Blutdruckmessungen an narkotisierten Tieren

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels intravasaler Blutdruckmessungen an narkotisierten Mäusen der akute endothelvermittelte Effekt von ANP auf den arteriellen Blutdruck analysiert. Dabei sank bereits unter der Vehikel-Infusion sowohl bei den Floxed GC-A als auch den GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäusen der systolische arterielle Blutdruck im Versuchsverlauf leicht ab. Dieser Effekt kann vermutlich auf Anästhetika zurückgeführt werden. Opiate, wie das verwendete Fentanyl, verursachen im Allgemeinen nur geringe kardiovaskuläre Nebenwirkungen¹⁷³. Dennoch wird bereits durch niedrige Dosen der

Vagustonus verstärkt und dadurch die Herzfrequenz sowie über gleichzeitige Reduktion des Sympathikus der Gefäßmuskeltonus reduziert. Somit kann die Analgesie der Versuchstiere mit Fentanyl über diesen Mechanismus zu einer Hypotonie führen¹⁷⁴. Die hypotensive Wirkung von Fentanyl wurde weiterhin durch das ebenfalls im Anästhetikum enthaltene Medetomidin verstärkt. Medetomidin wurde als Sedativum verwendet, reduziert jedoch als α_2 -Agonist zentral die Sekretion von Adrenalin und Noradrenalin. Als Nebenwirkung wird dadurch ebenfalls der Gefäßmuskeltonus sowie die Herzfrequenz gesenkt¹⁷⁵. Durch diese Mechanismen kann auch Medetomidin zu einer Hypotonie führen. Die dritte Substanz in der Kombinationsnarkose war Midazolam, ein Benzodiazepinderivat, das als Muskelrelaxanz eingesetzt wurde. Durch die Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit von GABA_A-Rezeptoren bewirkt es ebenfalls einen leichten Blutdruckabfall, während die Herzfrequenz und der ventrikuläre Füllungsdruck unverändert bleiben¹⁷⁶. Zusammenfassend sind diese Effekte der verwendeten Narkose etwas nachteilig für den Versuchsverlauf. Jedoch gab es auch einige Faktoren, die für diese Narkosevariante sprachen. Zum einen konnten die Mäuse stabil narkotisiert werden und zum anderen war keine kontrollierte Beatmung erforderlich. Des Weiteren besitzen die Substanzen des Anästhetikums in den verwendeten Konzentrationen keine direkten vaskulären Effekte, wodurch die vasodilatativen Effekte von ANP in den Versuchen nicht abgeschwächt wurden.

Aus diesen Gründen wurde auch kein anderes Anästhetikum, wie z. B. die Kombination aus Ketamin und Xylazin in der Hellabrunner-Mischung, verwendet. Dabei wird durch den α_2 -Agonisten Xylazin die zentrale und periphere Katecholaminfreisetzung gehemmt, aber die periphere hypotensive Wirkung durch Ketamin mittels Inhibition der Wiederaufnahme von Katecholaminen antagonisiert^{177, 178}. Somit würde vermutlich der Abfall des SBD unter der Vehikel-Infusion aufgrund der sympathomimetischen Wirkung reduziert werden, was aber auch eine Minderung der Effekte von ANP bedeuten würde. Auch Barbiturate sind nicht als Hypnotikaersatz für die Benzodiazepinderivate geeignet, da diese direkt die GABA_A-Rezeptoren öffnen können. Durch diesen Mechanismus erzeugen Barbiturate eine starke Atemdepression, was eine kontrollierte Beatmung erfordern würde. Ebenfalls sind Inhalationsnarkosen mit Isofluran oder i.v. Narkosen mit Propofol nicht geeignet, da beide Substanzen durch eine Vasodilatation deutlich den Blutdruck und zusätzlich das Herzminutenvolumen reduzieren¹⁷⁹.

Weiterhin könnte für den beobachteten Blutdruckabfall die operative Präparation und Katheterimplantation in die Arteria carotis communis als mögliche Ursache in Frage kommen. Durch die Ligaturen und das Ziehen am Gefäß könnten die Pressorezeptoren im Sinus caroticus stimuliert werden, wodurch der Sympathikotonus reduziert und der Parasympathikotonus gesteigert wird. Des Weiteren könnte durch die Präparation der Nervus vagus stimuliert worden sein und zu einer Bradykardie geführt haben. Auch diese beiden Mechanismen könnten am Blutdruckabfall beteiligt sein bzw. diesen erklären.

4.3 Endotheliale Effekte von ANP sind an der akuten Regulation des arteriellen Blutdrucks beteiligt

4.3.1 Die akuten hypotensiven Effekte von ANP sind an den EC GC-A KO Mäusen aufgehoben

Wie bereits geschildert, gab es leider bei den Floxed GC-A Mäusen unter der Vehikel-Infusion einen erheblichen spontanen Blutdruckabfall im Versuchsvorlauf (Abbildung 7). Trotzdem hatte die ANP-Infusion bei diesen Versuchstieren einen klaren akuten hypotensiven Effekt, der trotz deutlicher Tendenz in der Box-Plot-Darstellung lediglich zu signifikanten Unterschieden zu den Zeitpunkten 5, 30, 45 und 50 min führte (Abbildung 18). Ursache dafür ist wahrscheinlich die geringe Versuchszahl ($n=6/7$) und die damit verbundene Streuung der Einzelwerte, weshalb weitere Experimente zur Sicherung der Ergebnisse folgen sollten.

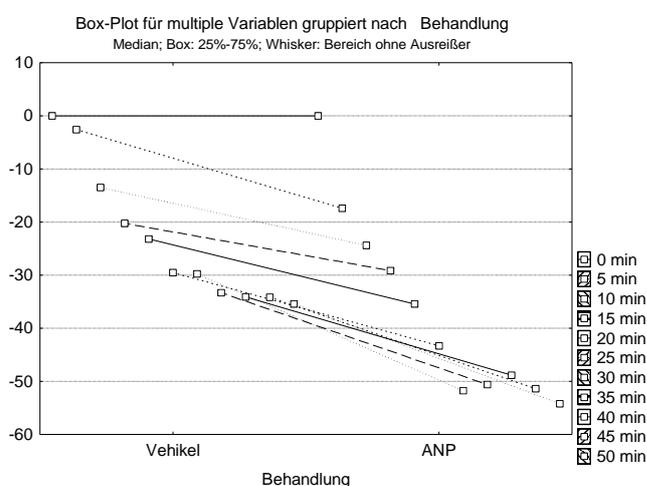


Abbildung 18: Box-Plot-Darstellung der normierten Blutdruckwerte von Floxed GC-A Mäusen unter Vehikel- bzw. ANP-Infusion

Für die Boxplotdarstellung wurden die normierten Blutdruckwerte (über eine Differenz zum Ausgangswert), die den Abfall des SBD in mmHg widerspiegeln, verwendet.

Bekannterweise existieren zwei spezifische Rezeptoren für ANP: die GC-A und der NPR-C. Für letzteren wurde anfänglich aufgrund des Phänotyps der NPR-C KO Tiere (milde Hypovolämie und Hypotonie sowie Knochendeformation) angenommen, dass er nur an der Degradierung der natriuretischen Peptide aus dem Blutplasma beteiligt ist und über die ANP-Plasmakonzentration den Blutdruck und das Blutvolumen reguliert^{105, 180}. Allerdings zeigen auch andere Arbeiten, dass der NPR-C über seine kurze intrazelluläre Domäne mit G_i- bzw. G_o-Proteinen interagiert^{110, 111} und die Phospholipase C β (PLC β) aktiviert¹⁸¹, was auf eine biologische Funktion des Rezeptors deutet. Jedoch konnte durch eine Vielzahl von publizierten Arbeiten gezeigt werden, dass die kardiovaskulären und insbesondere die hypotensiven Effekte von ANP ausschließlich über die GC-A mediiert werden^{22, 85}. Dies konnte in der vorliegenden Dissertation bestätigt werden, da die blutdrucksenkenden Effekte von ANP an Mäusen mit einer globalen Deletion der GC-A völlig aufgehoben waren (Abbildung 8). Dadurch kann mit den eigenen und publizierten Daten eine Beteiligung des NPR-C an diesem ANP-induzierten Effekt ausgeschlossen werden¹⁶⁴.

Das ANP/GC-A-System besitzt viele Zielorgane und Effekte, die an der akuten Regulation des SBD beteiligt sein können²⁸. Hierzu zählen u.a. die zentrale Verminderung des Sympathikotonus, Inhibition des Renin-AT II-Aldosteronsystems und die Reduktion des Plasmavolumens durch eine gesteigerte Natriurese und Diurese, einem verminderten Durst und Salzappetit, Inhibition der ADH-Sekretion sowie einen erhöhten lymphatischen Abfluss aus der Milz¹¹². Durch vorausgegangene Studien an Mäusen, bei denen die GC-A ausschließlich in den glatten Gefäßmuskelzellen deletiert wurde (SMC GC-A KO), konnte belegt werden, dass die Aktivierung der GC-A in den glatten Gefäßmuskelzellen und die konsekutive Vasodilatation ebenfalls an der akuten hypotensiven Wirkung von ANP beteiligt ist¹²⁸. Aber auch in Endothelzellen wird die GC-A in besonders hoher Dichte exprimiert⁸¹, weshalb sich die Frage stellte, ob dieser Rezeptor an den hypotensiven Effekten des ANP beteiligt ist. Durch die intravasalen Blutdruckmessungen an EC GC-A KO Mäusen konnte gezeigt werden, dass der akute blutdrucksenkende Effekt von ANP an diesen Versuchstieren aufgehoben war und dadurch keine signifikanten Unterschiede mehr im Verlauf des SBD zwischen Vehikel- und ANP-Infusion existierten (Abbildung 9), obwohl der direkte vasorelaxierende Effekt von ANP über die glatten Gefäßmuskelzellen sowie die natriuretische und diuretische Wirkung von ANP bei diesem Genotyp vollständig erhalten geblieben sind¹²⁶. Ebenfalls

unterschieden sich die SBD der EC GC-A KO von denen der GC-A -/- Mäuse unter Vehikel- bzw. ANP-Infusion nicht signifikant voneinander. Als Fazit kann daraus geschlossen werden, dass ANP einen akuten endothelabhängigen Regulator des SBD darstellt. Doch stellt sich nun die Frage, welche GC-A mediierten Effekte am Endothel den SBD regulieren können. Durch die Arbeit von Sabrane et al. konnte nachgewiesen werden, dass die hypotensive Wirkung von ANP nicht auf einer Modulation der Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin-1 sowie des Vasodilatators NO beruht, was aber nicht die Beteiligung anderer vasoaktiver Substanzen, wie CNP oder Prostazyklin (PGI₂), ausschließt. Jedoch könnte der hypotensive Effekt von ANP über die endotheliale GC-A auch durch eine Modulation der endothelialen Permeabilität verursacht sein, wodurch das intravasale Volumen reguliert und dadurch der SBD moduliert wird. Zur Analyse dieser Hypothese wurden nun die nächsten Experimente durchgeführt (siehe nächster Abschnitt).

4.3.2 Die akuten hypovolämischen Effekte von ANP sind an den EC GC-A KO Mäusen aufgehoben

Es ist viel schwerer das intravasale Volumen zu messen, als den SBD. Möglich ist es z.B. mit Hilfe von Indikatorsubstanzen, wie Evans Blue, Inulin, radioaktiv markierten hochpolymeren Phosphaten oder ⁵¹Cr-gekoppelten Erythrozyten sowie mittels Echokardiographie^{126, 182, 183}. In dieser Dissertation wurde der Hämatokrit verwendet, der einen einfachen, aber sehr indirekten Parameter zur Messung des intravasalen Volumens darstellt (siehe 2.7).

An Floxed GC-A Mäusen war der Hämatokrit unter Vehikel-Infusion im Versuchsverlauf stabil (Abbildung 11), aber stieg akut durch die ANP-Infusion bereits nach 30 min signifikant an (Abbildung 12), wodurch die bereits von Sabrane et al. publizierten Daten an wachen Floxed GC-A Mäusen bestätigt werden konnten¹²⁶. Da sich der Hämatokrit aus dem Quotienten der korpuskulären Bestandteile des Bluts, das heißt zu 99 % Erythrozyten, zum gesamten Blutvolumen zusammensetzt, kann es sich bei diesem Effekt entweder um eine drastische Zunahme von Erythrozyten (mittleres Volumen eines einzelnen Erythrozyten (MCV) oder Anzahl) oder eine Verminderung des Plasmavolumens handeln. Da Mäuse und Ratten keine kontraktile Milz besitzen und diese somit nicht als Blutspeicher nutzen können, ist eine drastische Zunahme von Erythrozyten sehr unwahrscheinlich¹⁸⁴. In folgenden Experimenten mit ⁵¹Cr-markierten Erythrozyten wurde endgültig gezeigt, dass

ANP keinen Einfluss auf das zirkulierende Volumen (Anzahl) von Erythrozyten in Ratten besitzt¹⁸⁵. Auch eine Zunahme des MCV konnte bereits durch Sabrane et al. ausgeschlossen werden¹²⁶. Aus diesem Grund ist der Anstieg des Hämatokrits der Floxed GC-A Mäuse unter ANP-Infusion wahrscheinlich auf eine Reduktion des intravasalen Flüssigkeitsvolumens zurückzuführen.

Diese akuten hypovolämischen Effekte von ANP waren an Mäusen mit globaler Deletion der GC-A (GC-A -/-) völlig aufgehoben (Abbildung 12). Sie reagierten auf die ANP-Infusion sogar mit einem signifikanten Abfall des Hämatokrits. Außerdem führte eine akute Gabe von cANP (4-23), dem spezifischen NPR-C Ligand (Abbildung 16), oder von CNP, dem Liganden der GC-B (Abbildung 15), an GC-A -/- Mäusen zu keinem signifikanten Anstieg des Hämatokrits. Zusammengenommen kann wiederum mit diesen Experimenten eine Beteiligung des NPR-C und der GC-B (Rezeptor für CNP) an den hypovolämischen Effekten von ANP ausgeschlossen werden.

Bekannterweise besitzt das ANP/GC-A-System viele Zielorgane und Effekte, die an der akuten Regulation des intravasalen Plasmavolumens beteiligt sein können. Hierzu zählen der verminderte Durst und Salzappetit, die Inhibition des Renin-AT II-Aldosteronsystems und der ADH-Sekretion, der gesteigerte Lymphabfluss in der Milz, die Steigerung der Natriurese und Diurese durch Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate mittels Dilatation der postglomerulären Venolen sowie die Vasodilatation von Kapazitätsgefäßen (Pooling)¹¹². Aber die GC-A wird auch, wie bereits erwähnt, in besonders hoher Dichte in Endothelzellen exprimiert⁸¹, wodurch sich die Frage stellte, ob dieser Rezeptor auch an den hypovolämischen Effekten des ANP beteiligt ist. Dazu wurden wiederum Hämatokritmessungen an EC GC-A KO Mäusen durchgeführt, die zeigten, dass die hypovolämischen Effekte von ANP bei diesen Versuchstieren aufgehoben waren (Abbildung 12). Dabei stieg der Hämatokrit nicht an, sondern fiel sogar nach 30 min ANP-Infusion signifikant ab, aber war im Vergleich zu dem Hämatokritabfall der GC-A -/- Mäusen signifikant geringer ausgeprägt. Als Ursache dafür kommen unter anderem die Steigerung der Natriurese und Diurese, die Verminderung des Sympathikotonus sowie die Vasorelaxation durch ANP in Frage, die bei den EC GC-A KO Mäusen im Gegensatz zu den GC-A -/- Mäusen vollständig erhalten geblieben sind^{22, 126}. Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass die akuten hypovolämischen (und hypotensiven) Effekte von ANP durch die endotheliale GC-A vermittelt werden.

4.4 Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Mikrozirkulation am Musculus cremaster zeigen, dass ANP die Extravasation von Albumin in postkapillären Venolen erhöht

Nun stellte sich die Frage, welche GC-A-mediierten Effekte am Endothel das Blutvolumen regulieren können. Dabei können permeabilisierende Effekte am Endothel der Milz, die zu einer erhöhten Lymphproduktion führen, oder den Glomeruli, wodurch eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) resultiert, ausgeschlossen werden, da das diskontinuierliche Endothel der Milz sowie das fenestrierte Endothel der Glomeruli ohnehin relativ frei permeabel für Makromoleküle sind^{186, 187}. Aus diesem Grund konnte auch an nephrektomierten und splenektomierten Ratten eine Reduktion des Plasmavolumens beobachtet und damit eine gesteigerte Natriuresis und Diuresis sowie ein vermehrter Lymphabfluss als Ursache ausgeschlossen werden^{123, 185, 188}. Sabrane et al. gelang es indirekt mittels ¹²⁵I-markierten BSA zu zeigen, dass ANP möglicherweise die Permeabilität für Albumin in der Mikrozirkulation erhöht¹²⁶, das kürzlich von Curry et al. direkt mittels Two-tracer Clearance Methode und MRT bestätigt werden konnte¹⁸⁹. Deshalb wurde die Hypothese verfasst, dass ANP die endotheliale Permeabilität an postkapillären Venolen für Albumin moduliert und darüber, möglicherweise vor allem in den Skelettmuskeln und der Haut, den transvaskulären Flüssigkeitsaustausch reguliert^{190, 191}. Jedoch wurde kein direkter Nachweis dafür in diesen Publikationen erbracht, weshalb dies nun ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation darstellte.

Aus diesem Grund wurden die Effekte von ANP auf die Extravasation von FITC-Albumin in der Mikrozirkulation des M. cremaster mittels Intravital-mikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich bei den Floxed GC-A Mäusen nach 20-minütiger ANP-Infusion ein milder, aber dennoch signifikanter Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz, der auch bis zum Ende der Infusion konstant auf dem erhöhten Niveau verblieb (Abbildung 13). Hingegen wurde für die EC GC-A KO Mäuse ein verminderter bzw. aufgehobener Austritt des FITC-BSA unter der ANP-Infusion im Vergleich zu den Floxed GC-A Mäusen erwartet. Paradoxiere Weise nahm die interstitielle Fluoreszenz durch die ANP-Infusion im Vergleich zum Ausgangswert vor Infusionsbeginn bereits nach 10 min signifikant ab und unterschied sich deshalb zu den Zeitpunkten 10, 20, 40 und 50 min signifikant von den interstitiellen Fluoreszenzwerten der Floxed GC-A Mäusen (Abbildung 13).

Nach Beendigung der ANP-Infusion wurde der M. cremaster zur weiteren Steigerung der Permeabilität und Überprüfung der Funktionsfähigkeit der beobachteten Gefäße 20 min mit dem Entzündungsmediator Histamin superfundiert. Darauf reagierten die Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäuse gleichermaßen mit einem prompten und viel stärkeren Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz als unter der ANP-Infusion. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die endothelvermittelten Effekte von ANP deutlich von denen der Entzündungsmediatoren wie Histamin, Thrombin oder VEGF abzugrenzen sind. Denn diese Substanzen stimulieren die Permeabilität unselektiv (nicht nur für Albumin) und massiver als ANP über eine Ca^{2+} -abhängige Kontraktion der Endothelzellen sowie eine Aktivierung der kleinen GTPase RhoA ¹⁹².

Dennoch besaß ANP nur einen sehr milden Effekt auf die endotheliale Permeabilität des M. cremaster. Ein Lösungsansatz hierzu wurde bereits 1992 von Tucker et al. publiziert ¹⁹³. In seinen Ausführungen stellte er fest, dass die ANP-stimulierte Extravasation von Albumin in das Interstitium der Muskeln nicht für den gesamten intravaskulären Albuminverlust verantwortlich sein kann und schätzte diesen Anteil auf lediglich 25 % des gesamten Proteinverlustes. Diese Ergebnisse konnten 2010 von Curry et al. bestätigt werden, indem er die Gewebe-Albumin-Clearance in das Verhältnis zu Körpergewicht und Urinmenge setzte ¹⁸⁹. Dabei stellte er fest, dass der Skelettmuskel, der den größten interstitiellen Raum besitzt, nur etwa 30 % der gesamten Austauschkapazität für ANP besitzt, um vorzugsweise das Plasmavolumen zu regulieren. Andererseits beträgt bereits der Anteil von Muskel und Haut in Kombination ca. 80 – 90 % der gesamten Albumin-Clearance für die Regulation des Plasmavolumens durch die ANP-stimulierte Permeabilitätsänderung. Dies konnte auch durch Börner, Schreier et al. mit dem Modell der Rückenhautkammer nachgewiesen werden, bei dem die Effekte von ANP an Floxed GC-A und GC-A +/- Mäusen (Kontrolltiere der GC-A -/- Mäuse) deutlich stärker als am M. cremaster ausgeprägt waren (Abbildung 19A, C) ¹⁷¹. Hingegen konnte gezeigt werden, dass die permeabilitätssteigernden Effekte von ANP bei den GC-A -/- und EC GC-A KO Mäusen aufgehoben waren (Abbildung 19B, D). Dabei kann mit diesem Modell die Mikrozirkulation der Haut und des subkutanen Gewebes (Panniculus) untersucht werden, wodurch auch, wie bereits erwähnt, die differierenden Effekte von ANP auf die endotheliale Permeabilität im Vergleich zur Cremasterpräparation erklärt werden können ¹⁸⁹.

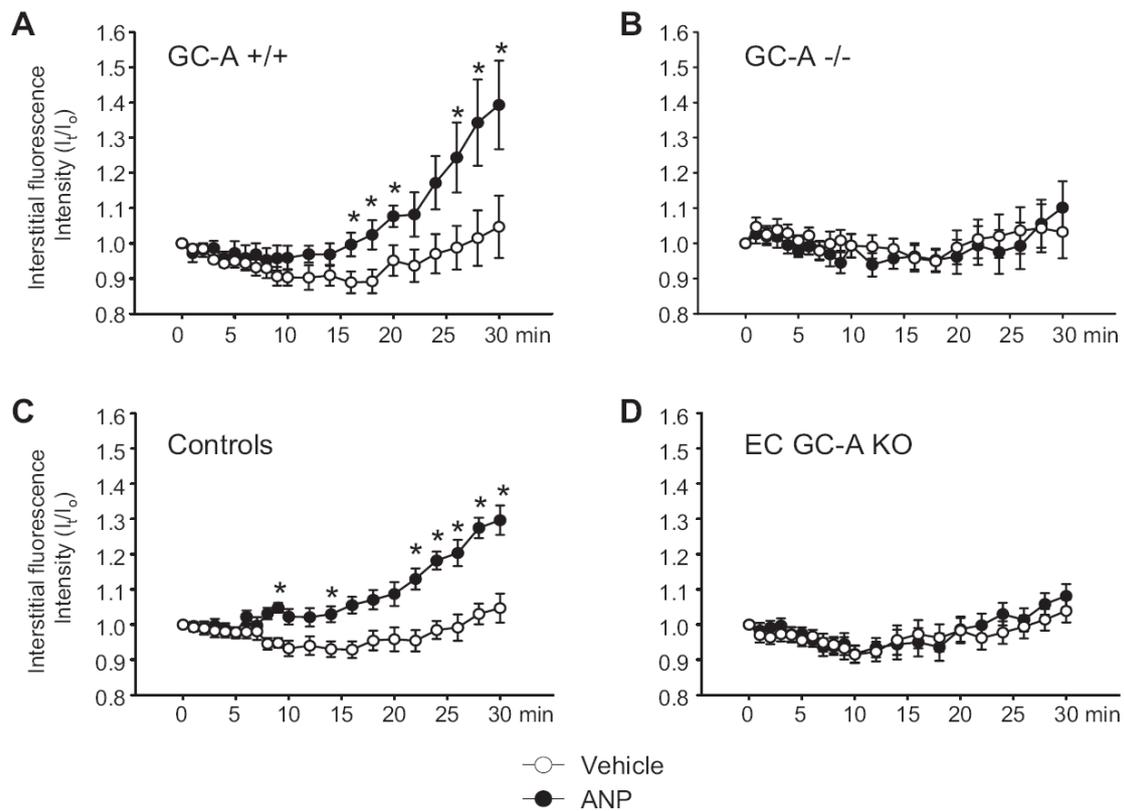


Abbildung 19: Ergebnisse der Intavitalmikroskopie am Modell der Rückenhautkammer von Floxed GC-A, EC GC-A KO, GC-A +/+ und GC-A -/- Mäusen unter Vehikel- bzw. ANP-Infusion (Börner, Schreier et al., Endocrinol 2008)

Nachdem den Mäusen die Rückenhautkammer implantiert wurde, wurden sie 3 Tage nach der OP mit Diazepam sediert und in einer Plexiglasröhre immobilisiert. Anschließend wurde unter dem Mikroskop das Glasfenster der Rückenhautkammer entfernt und das Gewebe mit dem Superfusionspuffer (Tabelle 12) superfundiert (1.2 ml/min). Nun wurde die FITC-BSA-Lösung in die Schwanzvene injiziert (siehe 2.12.1) und das Gewebe mit der Vehikel- bzw. ANP-Infusion (100 nM) für 30 min superfundiert. Dabei zeigte sich bei den GC-A +/+ (A) und den Floxed GC-A Mäusen (Controls, C) ein signifikanter Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz um 30 – 40 % unter der ANP-Infusion im Vergleich zur Vehikel-Infusion. Hingegen war dieser Effekt bei den GC-A -/- (B) und den EC GC-A KO Mäusen (D) aufgehoben. $p < 0.05$ * vs. Vehikel-Infusion

Aus diesen Ergebnissen konnte somit geschlossen werden, dass ANP das Blutvolumen über die Modulation der endothelialen Permeabilität für Albumin (und damit den onkotischen Gradienten) besonders in der Haut, aber auch im Skelettmuskel und anderen Organen, reguliert^{126, 189, 190}.

4.5 Die Phosphorylierung von VASP könnte an den permeabilitätssteigernden Effekten von ANP beteiligt sein

Zu dieser Zeit ist jedoch der Mechanismus, durch den Albumin ins Interstitium transloziert wird, noch unklar. Bislang sind drei verschiedene Transportwege für

Albumin über die endotheliale Barriere beschrieben worden. So kann es parazellulär durch erweiterte und lecke interzelluläre Spalten sowie transzellulär (überwiegend) durch caveolaevermittelte Endozytose oder durch große Poren in das Interstitium gelangen ¹⁵⁵.

Zur Beantwortung der Frage, auf welche Weise ANP den Albumintransport aus dem Gefäßsystem ins Interstitium beeinflusst, konnte in einer 2012 erschienen Publikation gezeigt werden, dass ANP die caveolaevermittelte Transzytose von Albumin stimuliert ¹⁹⁴. Hierbei analysierten die Autoren die Permeabilitätsveränderungen von ANP an verschiedenen KO-Tieren mittels Intravitalmikroskopie am Cremastermodell. Des Weiteren wurden aus den Versuchstieren primäre Lungenendothelzellen (MLEC) präpariert und mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie Transwellversuchen der klare Nachweis erbracht, dass Albumin mittels caveolaevermittelte Transzytose durch die Zellen ins Interstitium transportiert wird. Jedoch können die Autoren anhand dieser Experimente einen parazellulären Transportweg von Albumin nicht ausschließen.

Im Gegensatz zu dieser Arbeit publizierte Smolenski et al., dass ANP an HUVECs sowohl durch die PKG I als auch durch die PKA die Phosphorylierung von VASP stimuliert, was für einen parazellulären Transportmechanismus sprechen würde. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Publikation an diesem Zellsystem gezeigt, dass durch hohe ANP- und somit auch hohe cGMP-Konzentrationen die PDE 2 stimuliert wird, das zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration ⁹⁷ bzw. einer verminderten Phosphorylierung von VASP durch die PKA führt (Abbildung 22). Trotz dieser Differenzen würden beide Publikationen für einen parazellulären Transport von Albumin sprechen. Deshalb sollte nun der Phosphorylierungszustand von VASP an Floxed GC-A und EC GC-A KO Mäusen nach Vehikel- und ANP-Infusion mittels Western Blot von Milzhomogenaten untersucht werden, da in diesem Organ überwiegen VASP exprimiert wird und dies basal nicht so stark durch die PKA phosphoryliert ist wie in anderen Organen ¹⁷².

Im Western Blot zeigten die Floxed GC-A Mäuse nach ANP-Stimulation eine verstärkte Phosphorylierung von VASP durch die PKG-1 am Ser²³⁵ sowie durch die PKA am Ser¹⁵⁹ als nach Vehikel-Infusion (Abbildung 14). Im Gegensatz dazu wurde die Phosphorylierung von VASP durch die ANP-Infusion bei den EC GC-A KO Mäusen im Vergleich zur Vehikel-Infusion signifikant reduziert (Abbildung 14). Durch diese gegensätzlichen Effekte kann davon ausgegangen werden, dass, obwohl die Versuche an einem Gewebehomogenat durchgeführt

wurden, die nachgewiesene Modulation des Phosphorylierungszustandes von VASP eine endotheliale Reaktion auf die ANP-Stimulation darstellt.

VASP ist ein Hauptsubstrat und wichtiges Effektorsystem der cGMP- und cAMP-abhängigen Proteinkinasen^{195, 196}. Es gehört zusammen mit dem *Drosophila* Protein Enabled, dem dazugehörigen Säugetierhomolog Mena sowie dem Ena/VASP like Protein (Evl) zur prolinreichen Ena/VASP-Proteinfamilie^{197, 198}. Durch verschiedene Studien konnte belegt werden, dass VASP an der Zellmembran lokalisiert ist¹⁵⁶ und mit Fokalkontakten (Integrine), Mikrofilamenten (Aktin) und Zell-Zell-Kontakten (Adhärenskontakte [VE-Cadherin], Tight junctions) interagiert¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Dabei werden die Effekte von VASP auf die Zell-Kontakte durch Adhäsionsproteine (Plaques) wie Zyxin, Vinculin, Spektrin oder Profilin vermittelt^{199, 200}. Weiterhin interagiert das phosphorylierte VASP mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein, einem Cdc 42 Bindungseffektor²⁰¹, wodurch mittels Anticapping-Mechanismen die Polymerisation von G- zu F-Aktin gesteigert²⁰² und darüber die Aktin-basierte intrazelluläre Motilität stimuliert wird²⁰³. Aufgrund dieser Daten könnte VASP ein zentrales und essentielles Stellglied zur Modulation der endothelialen Permeabilität mittels ANP darstellen (Abbildung 21). Dennoch geben diese Experimente keine klare Erkenntnis über den Mechanismus, wie ANP die endotheliale Permeabilität steigert, da bislang nicht gezeigt wurde, dass ANP über die PKG I und pVASP *in vivo* die parazelluläre Permeabilität steigert.

Aber es zeigte sich auch eine Differenz zwischen der aufgestellten Hypothese zur Steigerung der endothelialen Permeabilität des ANP von Surapisitchat et al. (reduzierte PKA-abhängige Phosphorylierung von VASP, Abbildung 22) und den vorliegenden Western Blot Ergebnissen der Floxed GC-A Mäuse mit ANP-Behandlung (gesteigerte PKA-abhängige Phosphorylierung von VASP). Bei *in vitro* Experimenten mit HUVECs war, wie bereits beschrieben, zusätzlich zur cGMP-abhängigen Phosphorylierung eine cAMP-abhängige Phosphorylierung von VASP nach ANP-Stimulation zu beobachten²⁰⁴. Durch die Phosphorylierung wurde VASP von der Zellmembran gelöst und interagiert über die EVH1- und EVH2-Domäne mit dem FP4-Motiv des Plaqueproteins Zyxin, das sich intrazellulär sowohl an den Fokalkontakten als auch den Adhärenskontakten befindet²⁰⁵. Dies wird anschließend von den jeweiligen Kontakten gelöst, wodurch ebenfalls die daran intrazellulär anliegende Mikrofilamentenstruktur zerstört wird. Im Ergebnis werden durch diese Mechanismen möglicherweise die Zell-Zell-Verbindungen über VE-Cadherin bzw. die Zell-Matrix-Verbindungen über den Integrin-Rezeptor $\alpha_{2b}\beta_3$ gelockert

und die parazellulären Spalte erweitert^{199, 206}. Nach drei Stunden ANP-Inkubation ging jedoch die Phosphorylierung am Ser¹⁵⁹ verloren, wodurch VASP wieder an die fokalen Kontakte transloziert wurde. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde vermutet, dass die vollständige Phosphorylierung von VASP vermutlich essentiell ist, um VASP von den Zell-Kontakten zu lösen, aber eine inkomplette Phosphorylierung für die Wiederherstellung der Ausgangssituation genügt²⁰⁴. Deshalb könnte der beobachtete Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, möglicherweise über die cGMP-vermittelte Inhibition der PDE 3, durchaus an den permeabilitätssteigernden Effekten des ANP beteiligt sein (Abbildung 21, siehe nächster Abschnitt).

Weiterhin wird diskutiert, ob nicht möglicherweise die Glykokalyx die bedeutendste Permeabilitätsbarriere für Plasmaproteine ist (Abbildung 20)^{207, 208}. Diese besitzt an den interendothelialen Spalten (an den postkapillären Venolen) bereits eine basale, aber dennoch endliche Permeabilität¹⁹⁰. Durch den nach intravasal durch die Glykokalyx und nach interstitiell durch die endotheliale Basalmembran abgetrennten parazellulären Raum ist damit die Voraussetzung gegeben, dass die Proteinkonzentration direkt unter der Glykokalyx in den interzellulären Spalten deutlich von der interstitiellen Proteinkonzentration abweichen kann¹⁹⁰. Somit kann die Proteinkonzentration unter der Glykokalyx sowohl durch die Steigerung bzw. Verminderung der Permeabilität als auch durch die Proteinkonzentrationen im Gewebe, im Sinne eines Rückflusses, beeinflusst werden²⁰⁸. Diese Hypothese würde für ANP bedeuten, dass es an den Floxed GC-A Mäusen über die endotheliale GC-A die Permeabilität der Glykokalyx für Albumin selektiv erhöht, sich dieses unter der Glykokalyx in den interzellulären Spalten sammelt und dort den lokalen onkotischen Druck erhöht. Dadurch würde Wasser aus dem Gefäßsystem in die parazellulären Spalten diffundieren und durch den lokal gesteigerten interzellulären hydrostatischen Druck (vermittelt durch eine Art „Sog“) ins Interstitium entweichen.

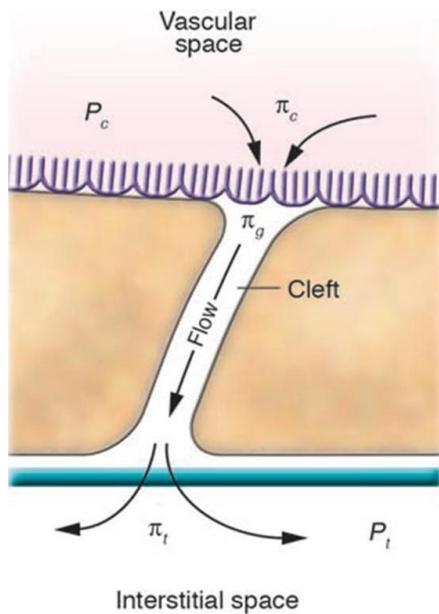


Abbildung 20: Hypothese zur Erhöhung des onkotischen Drucks durch Albumin in den parazellulären Spalten¹⁹⁰

Die Glykokalyx (gestreift dargestellt) stellt möglicherweise die bedeutendste Barriere für Plasmaproteine dar. Wird durch ANP die Permeabilität für Albumin erhöht, könnte es sich somit direkt unter dieser in den parazellulären Spalten anlagern und dort lokal den onkotischen Druck (π_g) steigern. Dadurch würde Wasser aus dem Gefäßsystem in die interzellulären Räume diffundieren, damit lokal den hydrostatischen Druck steigern und ins Interstitium gepresst werden. Das sich dabei bildende Ultrafiltrat besitzt nur eine geringe Proteinkonzentration und könnte damit den milden Anstieg der interstitiellen Fluoreszenz durch die ANP-Infusion erklären. P_c : interstitieller hydrostatischer Druck; P_c : kapillärer hydrostatischer Druck; π_t : interstitieller osmotischer Druck; π_c : osmotischer Druck der Plasmaproteine; π_g : osmotischer Druck der Plasmaproteine unter der Glykokalyx.

Diese Vermutung wird auch bereits durch erste Studien, die eine Beeinflussung von Bestandteilen der Glykokalyx durch ANP nachweisen, gestützt. Für diese wurde die Wirkung von ANP auf Syndekan, das dominante Proteoglykan der Glykokalyx, durch das die meisten Glykosaminoglykane gebunden werden, analysiert. Dieses kann durch Thrombin, einem permeabilitätssteigernden Mediator, aus dem Verband der Glykokalyx ausgelöst werden^{209, 210}. Äquivalente Effekte wurden auch für ANP auf Koronararterien isolierter Meerschweinchenherzen beobachtet und vermutet, dass durch ANP die Integrität und Ladung der Glykokalyx verändert und darüber die Permeabilität für Albumin selektiv gesteigert wird (Abbildung 21)²¹¹.

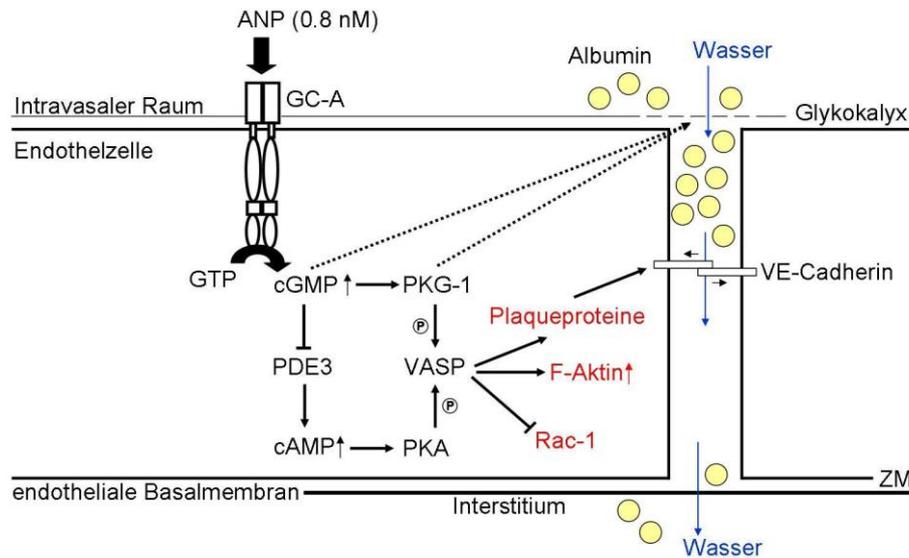


Abbildung 21: Schematische Darstellung der angenommenen intrazellulären Signaltransduktion zur Steigerung der endothelialen Permeabilität durch ANP im mikrovaskulären System

Durch die Aktivierung der Guanylyl Cyclase A mittels ANP wird die intrazelluläre cGMP-Konzentration mild gesteigert und die PKG I aktiviert. Vermutlich wird entweder durch die steigende cGMP-Konzentration oder die aktivierte PKG I Syndecan aus dem Verband der Glykokalyx abgeschert und dadurch die Permeabilität für Albumin in den parazellulären Raum gesteigert. Gleichzeitig wird durch den leicht erhöhten cGMP-Spiegel die PDE3 inhibiert, wodurch ebenfalls die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesteigert und darüber die PKA aktiviert wird. Die beiden Proteinkinasen (PKG I und PKA) phosphorylieren im Anschluss VASP, das nun mit verschiedenen Proteinen und Strukturen interagieren kann. So löst es das Plaqueprotein Zyxin von den Adhärens- und Fokalkontakten, wodurch zum einen die Zell-Zell-Verbindung über VE-Cadherin und zum anderen die Zell-Matrix-Verbindung über den $\alpha_2\beta_3$ Integrinrezeptor gelockert wird. Des Weiteren kann VASP die Aktinpolymerisation stimulieren und durch eine Kontraktion die interzellulären Räume zusätzlich weiten. Ebenfalls werden permeabilitätssenkende Systeme, wie die Aktivierung der kleinen GTPase Rac-1, durch die Phosphorylierung von VASP inhibiert, um vermutlich einen gegenregulatorischen Prozess zu unterdrücken. Gestrichelte Linie: hypothetischer Reaktionsweg; Blaue Pfeile: Wasser; Gelbe Kugeln: Albumin; Rote Schrift: mögliche Interaktionspartner von VASP zur Steigerung der Permeabilität.

4.6 Besitzt ANP auch antiphlogistische Eigenschaften?

Jedoch stehen die eigenen Beobachtungen im apparentem Widerspruch zu vielen Publikationen an kultivierten makrovaskulären Endothelzellen, bei denen ANP eine Reduktion der Permeabilität vermittelt, nachdem diese mit Histamin oder Thrombin gesteigert wurde²¹²⁻²¹⁴. Aber auch in *in vivo* Versuchen mittels Cremasterpräparation und Intravitalmikroskopie wurde eine durch Histamin ausgelöste Permeabilitätssteigerung, die ausschließlich an den postkapillären Venolen erfolgt²¹⁵, durch ANP vermindert²¹². Aber es wurde nicht geklärt, ob es sich dabei um endotheliale Effekte oder Effekte auf Entzündungszellen von ANP handelt. Als Ursache für diese gegensätzlichen Effekte von ANP auf die endotheliale Permeabilität wird eine Aktivierung bzw. Inhibition verschiedener Phosphodiesterasen (PDE) postuliert, das in Abbildung 22 dargestellt ist⁹⁷. Die PDE-Superfamilie besteht aus 11 Mitgliedern, die sich in ihrer Regulation,

enzymatischen Charakteristik, Struktur und pharmakologischen Inhibition unterscheiden. Des Weiteren besitzen sie eine untereinander ausgeprägte Variabilität in Bezug auf ihre gewebespezifische, zelluläre und subzelluläre Expression. Trotz dieser Unterschiede sind alle PDEs durch die Modulation der intrazellulären Konzentration, Wirkungsdauer und Kompartimentierung zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP) an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen beteiligt ²¹⁶. In den meisten Endothelzellen werden die cGMP-stimulierte PDE2 und die cGMP-inhibierte PDE3 ²¹⁷ sowie die durch Ca^{2+} /Calmodulin aktivierbare PDE 1 exprimiert ^{217, 218}. Es konnte gezeigt werden, dass eine steigende intrazelluläre cAMP-Konzentration durch PDE-Inhibitoren oder β -adrenerge Agonisten die Permeabilität senkt ^{192, 219}. Neben der durch cAMP aktivierten Proteinkinase A ist auch das „exchange protein directly activated by cAMP“ (Epac) und vermutlich noch weitere Proteine an der Vermittlung dieses Effektes beteiligt ^{220, 221}. Dagegen sind die Effekte von cGMP auf die Permeabilität in der Literatur sehr kontrovers ¹⁹¹. Aus den Ergebnissen der *in vitro* Experimente an humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVECs) schlussfolgerte Surapisitchat et al., dass niedrige intrazelluläre cGMP-Konzentrationen die PDE3 inhibieren und letztlich die Permeabilität durch die steigende cAMP-Konzentration reduzieren (Abbildung 22). Hingegen soll durch hohe cGMP-Konzentrationen die PDE2 aktiviert und durch die sinkende cAMP-Konzentration die Permeabilität gesteigert werden. Mit dieser Hypothese könnten somit die gegensätzlichen Effekte von ANP auf die endotheliale Permeabilität erklärt werden.

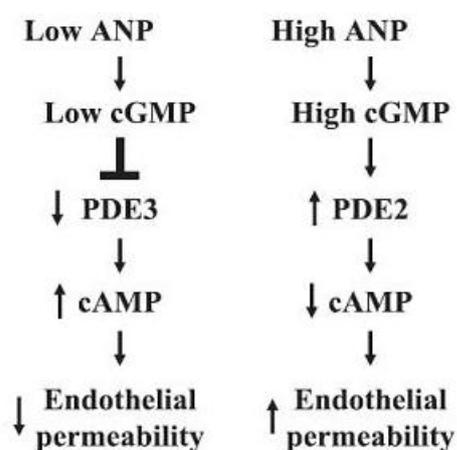


Abbildung 22: Vorstellung über die Interaktion des ANP/GC-A-Systems mit den Phosphodiesterasen 2 und 3 (geändert nach ⁹⁷)

An HUVECs konnte gezeigt werden, dass ANP in niedrigen Konzentrationen (0.003 bis 3 nM) die zuvor gesteigerte Permeabilität durch Thrombin reduziert. Hingegen war bei hohen ANP-Konzentrationen (größer 30 nM) kein signifikanter Effekt zu beobachten. Aus diesen und weiteren Experimenten wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine niedrige cGMP-Konzentration die PDE3 inhibiert, das intrazelluläre cAMP ansteigt und die Permeabilität dadurch gesenkt wird. Im Gegensatz dazu aktivieren hohe cGMP-Konzentrationen die PDE2, senken das intrazelluläre cAMP und steigern darüber die Permeabilität.

Auf die durch Thrombin induzierte gesteigerte Permeabilität besaß ANP in den Konzentrationen von 0.003 nM bis 3 nM die stärkste reduzierende Wirkung. Hingegen konnte durch höhere ANP-Konzentrationen (ab 30 nM) keine

signifikante Reduktion der Permeabilität erreicht werden. Für dieses Phänomen soll die Inhibition der PDE3 durch eine niedrige cGMP-Konzentration verantwortlich sein. Dies würde zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führen und die Reduktion der zuvor gesteigerten Permeabilität nach allgemeiner Ansicht erklären⁹⁷. In einer früheren Studie wurde jedoch diese permeabilitätsmindernden Effekte von ANP an einem *in vitro* Modell durch eine 100 nM ANP-Lösung erzielt²¹³. Auch neuere Experimente, die an menschlichen mikrovaskulären Lungenendothelzellen (LMVEC) durchgeführt wurden, konnte eine Reduktion der durch Thrombin induzierten Stimulation der endothelialen Permeabilität mit einer 1 µM ANP-Lösung hervorgerufen werden²²². Aber nach der Studie von Surapisitchat et al. dürfte bei diesen stark erhöhten ANP-Konzentrationen keine Reduktion der endothelialen Permeabilität zu erkennen sein, wodurch die Validität dieser Hypothese in Frage gestellt werden sollte.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die zwei gegensätzlichen Effekte von ANP auf die endotheliale Permeabilität bildet die Hypothese, dass kultivierte Endothelzellen bereits „aktiviert“ sind und einem Entzündungsstatus ähneln. Dadurch könnten die permeabilitätsreduzierenden Effekte möglicherweise durch Rho GTPasen, die zur Ras-Proteinfamilie gehören, vermittelt werden²²³. Dazu wurde von Klinger et al. beobachtet, dass der durch Thrombin induzierte Aktivitätsanstieg von RhoA durch eine ANP-vermittelte Aktivierung von Rac-1 abgemildert werden konnte. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit, durch Interaktion mit dem Zytoskelett die Permeabilität der Zell-Zell-Verbindungen zu beeinflussen^{224, 225}. Dabei wird durch RhoA die Permeabilität gesteigert und durch Rac-1 vermindert²²².

Somit könnte es also tatsächlich sein, dass ANP über die endotheliale GC-A einerseits die basale Permeabilität des ruhenden Endothels leicht stimuliert, um darüber das Plasmavolumen und den Blutdruck zu regulieren (vorliegende Arbeit). Dagegen kann ANP andererseits entzündlichen Veränderungen der endothelialen Permeabilität (aktiviertes Endothel) sogar entgegenwirken, was aber nicht in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

4.7 An EC GC-A KO Mäusen führt ANP über den NPR-C zur „paradoxen“ Abnahme der endothelialen Permeabilität und des Hämatokrits

Mit den bisher durchgeführten Experimenten konnte die akute permeabilitätssteigernde Wirkung der endothelialen GC-A und deren Bedeutung für die akute Reduktion des Plasmavolumens sowie des Blutdrucks nachgewiesen werden. Deshalb wurde nun nach dem ursächlichen Mechanismus für den paradoxen Hämatokritabfall bei den GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäusen unter ANP-Infusion gesucht (Abbildung 12). Wie bereits erwähnt, existieren zwei spezifische Rezeptoren für ANP: die GC-A und der NPR-C (siehe 4.3.1). Da die Kreuzaktivierung der GC-B nicht für diesen Effekt verantwortlich war (siehe 4.3.2, Abbildung 15), wurde postuliert, dass ANP über die Aktivierung des NPR-C den unerwarteten Hämatokritabfall verursacht. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die Floxed GC-A, GC-A $-/-$ und EC GC-A KO Mäuse mit cANP (4-23), einem spezifischen Liganden des NPR-C, in einer äquivalenten Konzentration zu ANP infundiert und alle 30 min der Hämatokrit bestimmt. Darauf reagierten alle drei Genotypen bereits nach 30 min mit einem signifikanten Abfall des Hämatokrits (Abbildung 16). Jedoch war die Reduktion des Hämatokrits bei den EC GC-A KO Mäusen signifikant stärker als bei den Floxed GC-A Mäusen ausgeprägt. Ein noch weiter gesteigerter Effekt war bei den GC-A $-/-$ Mäusen zu beobachten, da sich diese sogar signifikant von den EC GC-A KO und Floxed GC-A Mäusen unterschieden. Vermutlich werden die unterschiedlich ausgeprägten Effekte von cANP (4-23) auf die verschiedenen Genotypen durch die Steigerung der endogenen Plasmakonzentration von ANP verursacht ¹⁵¹. Durch diese werden sehr wahrscheinlich bei den EC GC-A KO und noch stärker bei den Floxed GC-A Mäusen gegenregulatorische Mechanismen, wie beispielsweise eine Steigerung der Natriurese und Diurese, Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen, Reduktion des Sympathikotonus und bei den Floxed GC-A Mäusen zusätzlich eine gesteigerte endotheliale Permeabilität durch die endotheliale GC-A, aktiviert, wodurch die Effekte des NPR-C reduziert werden. Zusammen mit dem Abfall der interstitiellen Fluoreszenz bei den EC GC-A KO Mäusen unter ANP-Infusion in der Intravitalmikroskopie kann mit den vorliegenden Beobachtungen des Hämatokritabfalls unter cANP (4-23)-Infusion zum ersten Mal eine barrierestärkende Funktion des NPR-C am Endothel der postkapillären Venolen *in vivo* vermutet werden, wodurch der onkotische Druck im Gefäßsystem (über die Albuminkonzentration) und damit das Plasmavolumen gesteigert wird. Da

die Expression des NPR-C an kultivierten, also „aktivierten“, Endothelzellen gesteigert ist ⁹⁹, wäre es ebenfalls denkbar, dass dieser Rezeptor vielleicht auch bei den verschiedensten Entzündungsprozessen hochreguliert ist und somit einer zu stark gesteigerten Permeabilität und der damit verbundenen Gefahr eines septischen Zustands entgegenwirkt .

Aufgrund des akuten Blutvolumenanstiegs durch die Aktivierung des NPR-C stellte sich auch die Frage, ob dieser Effekt einen Einfluss auf den systolischen arteriellen Blutdruck besitzt. Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurde den Versuchstieren für 50 min cANP (4-23) infundiert und alle 5 min intravasal der arterielle Blutdruck gemessen. Dabei zeigte sich, dass die cANP (4-23)-Infusion im Vergleich zur Vehikel-Infusion bei allen drei verwendeten Genotypen (Floxed GC-A, EC GC-A KO und GC-A -/- Mäusen) keinen signifikanten Effekt auf den arteriellen Blutdruck besaß, wodurch die Ergebnisse einer bereits publizierten Studie an GC-A -/- Mäusen bestätigt wurden (Abbildung 17) ¹⁵¹. Zusammenfassend konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass eine selektive Aktivierung des NPR-C mittels cANP (4-23) *in vivo* das Plasmavolumen akut steigert, aber dies keinen Einfluss auf die akute Regulation des systolischen arteriellen Blutdrucks besitzt, da möglicherweise die Änderungen des Plasmavolumens nur sehr mild ausgeprägt sind oder sich überwiegend im venösen Niederdrucksystem abspielen.

Natürlich stellt sich nun die Frage, wie der permeabilitätssenkende Effekt mit der verminderten Phosphorylierung von VASP in Einklang zu bringen ist. Wie bereits erwähnt, wird durch die Aktivierung des NPR-C die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Inhibition der Adenylatzyklase mittels G_i- bzw. G_o-Proteinen reduziert ¹¹⁰ und die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration mittels Aktivierung der PLCβ gesteigert ¹⁸¹. Aber in den Western Blots der Milzhomogenate von EC GC-A KO Mäusen war nach der ANP-Infusion (Stimulation des endothelialen NPR-C) eine cAMP-abhängige und auch erstaunlicherweise eine cGMP-abhängige Reduktion der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zur Vehikel-Infusion zu beobachten. In einer Studie wurde an perinatalen Mäusen ein hypoxischer Zustand hervorgerufen, um die adulten Auswirkungen darauf näher analysieren zu können ²¹⁸. Im Ergebnis konnte unter anderem gezeigt werden, dass durch Inhibition der PDE1 mittels Vinpocetin die endothelvermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen über Acetylcholin/cGMP/eNOS wiederhergestellt werden konnte. Da an einem Hypertonus ursächlich zumeist ein verstärkter Vasotonus vorliegt, aber auch eine reduzierte endotheliale Permeabilität daran beteiligt

sein kann, könnte auch die Aktivierung der PDE1 an der Reduktion der endothelialen Permeabilität beteiligt sein. Diese Phosphodiesterase wird durch eine steigende Ca^{2+} -Konzentration aktiviert und baut bevorzugt cGMP, aber auch in einem geringen Maß cAMP ab²²⁶. Somit wäre durch die Aktivierung der PDE1 die verminderte cAMP-abhängige und cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP und damit eine Verdichtung der Glykokalyx sowie der parazellulären Spalte zu erklären (Abbildung 23, siehe 4.5).

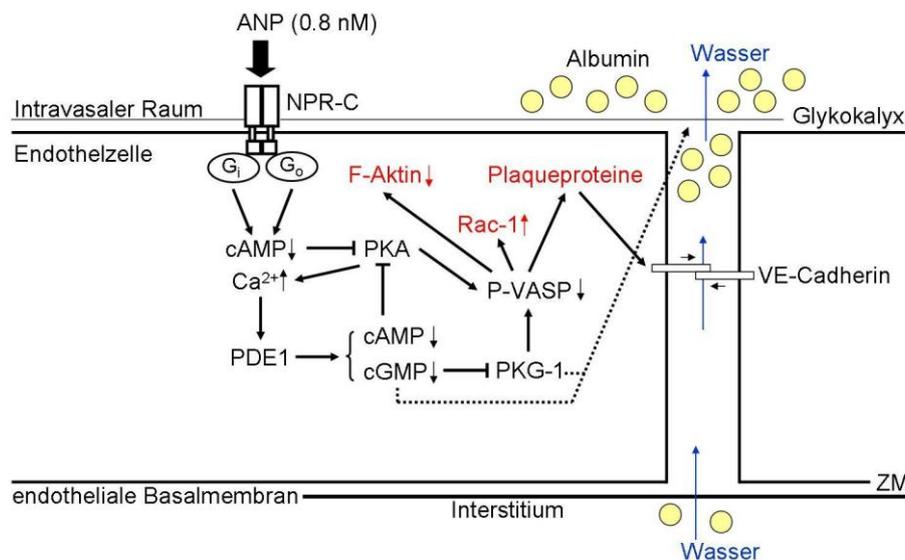


Abbildung 23: Modell der intrazellulären Signaltransduktion des NPR-C zur Verminderung der endothelialen Permeabilität

Durch die Aktivierung des NPR-C mittels ANP wird die Adenylatzyklase durch G_i - bzw. G_o -Proteine inhibiert und dadurch die Aktivität der PKA reduziert. Durch diesen Mechanismus erfolgt ebenfalls eine Kreuzaktivierung der $\text{PLC}\beta$, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesteigert wird. Über diese wird die PDE1 aktiviert und cGMP sowie cAMP abgebaut, wodurch auch die Aktivität der PKG I reduziert wird. Über die verminderte cGMP-Konzentration bzw. PKG I Aktivität wird die physiologisch vorkommende Permeabilität an der Glykokalyx der postkapillären Venolen reduziert, wodurch der onkotische Druck im Gefäßsystem steigt und Wasser aus dem Interstitium entlang dieses Gradienten diffundiert. Gleichzeitig wird VASP durch die reduzierte Aktivität der Proteinkinasen PKA und PKG I vermindert phosphoryliert, wodurch die Zell-Zell- (über VE-Cadherin) und Zell-Matrix-Verbindungen (über $\alpha_2\beta_3$ -Integrinrezeptoren) stabilisiert und die parazellulären Spalten verkleinert werden. Gestrichelte Linie: hypothetischer Reaktionsweg; Blaue Pfeile: Wasser; Gelbe Kugeln: Albumin; Rote Schrift: mögliche Interaktionspartner von VASP zur Reduktion der Permeabilität.

4.8 Implikationen

Somit kann aus den bisher genannten Gründen das atriale natriuretische Peptid als das einzige hypovolämische Hormon im Organismus bezeichnet werden. Aufgrund der wichtigen extrarenalen Effekte, Steigerung der endothelialen Permeabilität und Veränderung des intravasalen onkotische Drucks, darf es nicht mit anderen natriuretisch und diuretisch wirkenden Substanzen²²⁷, wie z.

Bsp. dem Schleifendiuretikum Furosemid, verglichen werden ²²⁸. Denn diese Substanzen bewirken in der Niere durch Blockade von verschiedenen Transportern ausschließlich eine gesteigerte Natriurese und Diurese. Dadurch vermindert sich nur kurzzeitig das Plasmavolumen, wodurch die Albuminkonzentration bei gleichbleibender Menge steigt und Wasser aus dem Interstitium entlang des onkotischen Gradienten in das Gefäßsystem diffundiert. Letztlich wird durch das dabei entstehende Fließgleichgewicht das Plasmavolumen nur sehr gering verändert und lediglich Flüssigkeit dem Interstitium entzogen. Aber vermutlich erfolgen die permeabilitätssteigernden Effekte von ANP nur in Organen, die aufgrund ihres großen interstitiellen Raums viel Flüssigkeit aufnehmen können, wie z. Bsp. die Skelettmuskulatur, Haut und subkutanes Gewebe oder Magen-Darm-Trakt ^{126, 189}.

Pathophysiologisch sind bislang eine Vielzahl von verschiedenen Polymorphismen an den Rezeptoren der natriuretischen Peptide und dem NPPA/NPPB Promotor für ANP bekannt. Für einige von diesen Single Nucleotid Polymorphismen am GC-A und NPR-C Rezeptor konnte ein postoperativ erhöhtes Risiko auf eine ventrikuläre Dysfunktion nach Bypassanlage nachgewiesen werden, insofern diese Polymorphismen nicht mit einer gesteigerten Sekretion von ANP assoziiert waren ^{229, 230}. Besteht die ventrikuläre Dysfunktion über einen längeren Zeitraum unbehandelt, so kann sich aus dieser eine Herzinsuffizienz entwickeln. Dabei zeigten Untersuchungen an herzinsuffizienten Patienten erhöhte ANP- und BNP-Plasmakonzentrationen, weshalb diese schon einige Zeit als diagnostische Marker eingesetzt werden ²³¹. In weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass die Aktivität der GC-A bei diesen Patienten im Gegensatz zu der der GC-B reduziert ²³² und die Expression des NPR-C gesteigert ist ¹⁰⁰. Dabei wird die Dysfunktion der Guanylyl Cyclase A vermutlich entweder durch eine Desensibilisierung mittels Dephosphorylierung an der Kinase-homologen Domäne ²⁸ oder wie bereits erwähnt durch Single Nucleotid Polymorphismen ¹²² hervorgerufen. Ebenfalls konnte eine weitere Studie zeigen, dass der arterielle Blutdruck bereits von der basalen ANP-Konzentration abhängig ist ¹²².

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass eine Dysregulation des ANP/GC-A Systems durch eine reduzierte ANP-Sekretion bzw. eine Dysfunktion der GC-A an der Entstehung des essentiellen Hypertonus oder der Hypervolämie bzw. Hybernatriämie bei herzinsuffizienten Patienten beteiligt ist ²³³.

5 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ANP über die Aktivierung der endothelialen Guanylyl Cyclase A (GC-A) akut die Permeabilität für Albumin an postkapillären Venolen stimuliert. Durch diesen Mechanismus ist ANP neben der chronischen auch an der akuten Reduktion des Plasmavolumens und des systolischen arteriellen Blutdrucks beteiligt. Aufgrund der wichtigen extrarenalen endothelialen Effekte stellt ANP das einzige hypovolämische Hormon im Organismus dar und ist somit ein bedeutender physiologischer Regulator der transvaskulären Volumenhomöostase. Jedoch sind diese Effekte deutlich von denen der vasoaktiven Substanzen, wie z. B. Histamin oder Thrombin und anderer diuretisch wirkender Substanzen, wie z. B. Schleifendiuretika, abzugrenzen. Vermutlich wird der permeabilitätssteigernde Effekt von ANP durch die beobachtete gesteigerte PKG- und PKA-abhängige Phosphorylierung von VASP vermittelt, wodurch möglicherweise die parazelluläre Permeabilität selektiv für Albumin gesteigert wird. Den gegenregulatorischen Mechanismus zur endothelialen GC-A stellt der NPR-C dar. Durch diesen erfolgt eine verminderte PKA- und PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP, was durch die ANP-Infusion an EC GC-A KO Mäusen beobachtet wurde und zu einer Reduktion der physiologischen Permeabilität für Albumin an den postkapillären Venolen führen könnte. Somit wird wahrscheinlich durch diesen Mechanismus das Plasmavolumen, aber nicht der systolische arterielle Blutdruck *in vivo* gesteigert und eine übersteigerte Reaktion der GC-A verhindert.

Aufgrund der enormen Bedeutung des ANP/GC-A Systems für die Modulation der endothelialen Permeabilität und die akuten sowie chronischen Regulation des Plasmavolumens und arteriellen Blutdrucks besitzt es bei Dysfunktion eine bedeutende klinische Relevanz. Denn durch eine verminderte Sekretion von ANP oder der Dysfunktion des endothelialen GC-A-Rezeptors, durch verschiedene Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) oder Desensibilisierung, kann dieses System an der Entstehung der essentiellen Hypertonie oder der Hypervolämie bzw. Hypernatriämie bei herzinsuffizienten Patienten beteiligt sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg.* 1956;14:99-112
2. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circulation research.* 1956;4:85-90
3. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life sciences.* 1981;28:89-94
4. Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochemical and biophysical research communications.* 1983;117:859-865
5. Misono KS, Fukumi H, Grammer RT, Inagami T. Rat atrial natriuretic factor: Complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochemical and biophysical research communications.* 1984;119:524-529
6. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hanp). *Biochemical and biophysical research communications.* 1984;118:131-139
7. Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KF, Adams SP, Eubanks SR, Galluppi GR, Needleman P. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science (New York, N.Y.)* 1984;223:67-69
8. Currie MG, Geller DM, Cole BR, Boylan JG, YuSheng W, Holmberg SW, Needleman P. Bioactive cardiac substances: Potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science (New York, N.Y.)* 1983;221:71-73
9. Cameron VA, Aitken GD, Ellmers LJ, Kennedy MA, Espiner EA. The sites of gene expression of atrial, brain, and c-type natriuretic peptides in mouse fetal development: Temporal changes in embryos and placenta. *Endocrinology.* 1996;137:817-824

10. Saper CB, Standaert DG, Currie MG, Schwartz D, Geller DM, Needleman P. Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain: Presence in cardiovascular regulatory areas. *Science (New York, N.Y.)*. 1985;227:1047-1049
11. Rosenzweig A, Seidman CE. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:229-255
12. Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide: Synthesis, release, and metabolism. *Pharmacological reviews.* 1992;44:479-602
13. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochemical and biophysical research communications.* 1988;155:726-732
14. Sudoh T, Maekawa K, Kojima M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human brain natriuretic peptide. *Biochemical and biophysical research communications.* 1989;159:1427-1434
15. Nakao K, Itoh H, Kambayashi Y, Hosoda K, Saito Y, Yamada T, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Suga S, et al. Rat brain natriuretic peptide. Isolation from rat heart and tissue distribution. *Hypertension.* 1990;15:774-778
16. Kambayashi Y, Nakao K, Mukoyama M, Saito Y, Ogawa Y, Shiono S, Inouye K, Yoshida N, Imura H. Isolation and sequence determination of human brain natriuretic peptide in human atrium. *FEBS Lett.* 1990;259:341-345
17. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC, Jr. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circulation research.* 2002;91:1127-1134
18. Silberbach M, Roberts CT, Jr. Natriuretic peptide signalling: Molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cellular signalling.* 2001;13:221-231

19. Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(anp)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr.* 1988;66:752-759
20. Totsune K, Takahashi K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Saito T, Sasano H, Mouri T, Abe K. Natriuretic peptides in the human kidney. *Hypertension.* 1994;24:758-762
21. Meyer M, Richter R, Brunkhorst R, Wrenger E, Schulz-Knappe P, Kist A, Mentz P, Brabant EG, Koch KM, Rechkemmer G, Forssmann WG. Urodilatin is involved in sodium homeostasis and exerts sodium-state-dependent natriuretic and diuretic effects. *The American journal of physiology.* 1996;271:F489-497
22. Kuhn M. Cardiac and intestinal natriuretic peptides: Insights from genetically modified mice. *Peptides.* 2005;26:1078-1085
23. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (cnp): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and biophysical research communications.* 1990;168:863-870
24. Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Hosoda K, Nakagawa O, Hama N, et al. C-type natriuretic peptide (cnp) in rats and humans. *Endocrinology.* 1991;129:1104-1106
25. Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H. Endothelial production of c-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *The Journal of clinical investigation.* 1992;90:1145-1149
26. Ueda S, Minamino N, Aburaya M, Kangawa K, Matsukura S, Matsuo H. Distribution and characterization of immunoreactive porcine c-type natriuretic peptide. *Biochemical and biophysical research communications.* 1991;175:759-767

27. Banks M, Wei CM, Kim CH, Burnett JC, Jr., Miller VM. Mechanism of relaxations to c-type natriuretic peptide in veins. *The American journal of physiology*. 1996;271:H1907-1911
28. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*. 2006;27:47-72
29. Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*. 2001;51:489-494
30. Inagami T, Misono KS, Fukumi H, Maki M, Tanaka I, Takayanagi R, Imada T, Grammer RT, Naruse M, Naruse K, et al. Structure and physiological actions of rat atrial natriuretic factor. *Hypertension*. 1987;10:1113-1117
31. Maki M, Takayanagi R, Misono KS, Pandey KN, Tibbetts C, Inagami T. Structure of rat atrial natriuretic factor precursor deduced from cdna sequence. *Nature*. 1984;309:722-724
32. Seidman CE, Duby AD, Choi E, Graham RM, Haber E, Homcy C, Smith JA, Seidman JG. The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by a complementary DNA clone. *Science (New York, N.Y.)*. 1984;225:324-326
33. Yamanaka M, Greenberg B, Johnson L, Seilhamer J, Brewer M, Friedemann T, Miller J, Atlas S, Laragh J, Lewicki J, et al. Cloning and sequence analysis of the cdna for the rat atrial natriuretic factor precursor. *Nature*. 1984;309:719-722
34. Oikawa S, Imai M, Ueno A, Tanaka S, Noguchi T, Nakazato H, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cdna encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature*. 1984;309:724-726
35. Vuolteenaho O, Arjamaa O, Ling N. Atrial natriuretic polypeptides (anp): Rat atria store high molecular weight precursor but secrete processed peptides of 25-35 amino acids. *Biochemical and biophysical research communications*. 1985;129:82-88

36. Lang RE, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T. Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature*. 1985;314:264-266
37. Newman TM, Severs NJ. Arrested exocytosis of atrial secretory granules. *J Mol Cell Cardiol*. 1990;22:771-786
38. de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovascular research*. 1996;31:7-18
39. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:8525-8529
40. Dietz JR. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovascular research*. 2005;68:8-17
41. Irons CE, Murray SF, Glembotski CC. Identification of the receptor subtype responsible for endothelin-mediated protein kinase c activation and atrial natriuretic factor secretion from atrial myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268:23417-23421
42. Leite MF, Page E, Ambler SK. Regulation of anp secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: Desensitization and receptor subtype. *The American journal of physiology*. 1994;267:H2193-2203
43. Lee SJ, Kim SZ, Cui X, Kim SH, Lee KS, Chung YJ, Cho KW. C-type natriuretic peptide inhibits anp secretion and atrial dynamics in perfused atria: Npr-b-cgmp signaling. *American journal of physiology*. 2000;278:H208-221
44. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*. 1991;43:109-142
45. Dietz JR. Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distension. *The American journal of physiology*. 1984;247:R1093-1096

46. Ledsome JR, Wilson N, Courneya CA, Rankin AJ. Release of atrial natriuretic peptide by atrial distension. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1985;63:739-742
47. Cho KW, Seul KH, Ryu H, Kim SH, Koh GY. Characteristics of distension-induced release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated perfused rabbit atria. *Regulatory peptides*. 1988;22:333-345
48. Suzuki E, Hirata Y, Kohmoto O, Sugimoto T, Hayakawa H, Matsuoka H, Sugimoto T, Kojima M, Kangawa K, Minamino N, et al. Cellular mechanisms for synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cultured rat atrial cells. *Circulation research*. 1992;71:1039-1048
49. Laine M, Arjamaa O, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Weckstrom M. Block of stretch-activated atrial natriuretic peptide secretion by gadolinium in isolated rat atrium. *The Journal of physiology*. 1994;480 (Pt 3):553-561
50. Katoh S, Toyama J, Aoyama M, Miyamoto N, Seo H, Matsui N, Kodama I, Yamada K. Mechanisms of atrial natriuretic peptide (anp) secretion by rat hearts perfused in vitro--ca²⁺(+)-dependent signal transduction for anp release by mechanical stretch. *Jpn Circ J*. 1990;54:1283-1294
51. Kuroski-de Bold ML, de Bold AJ. Stretch-secretion coupling in atrial cardiocytes. Dissociation between atrial natriuretic factor release and mechanical activity. *Hypertension*. 1991;18:III169-178
52. Kinnunen P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: Effect of stretching. *Endocrinology*. 1993;132:1961-1970
53. Gardner DG, Wirtz H, Dobbs LG. Stretch-dependent regulation of atrial peptide synthesis and secretion in cultured atrial cardiocytes. *The American journal of physiology*. 1992;263:E239-244
54. McDonough PM, Glembotski CC. Induction of atrial natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation of contraction. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:11665-11668

55. Lew RA, Baertschi AJ. Mechanisms of hypoxia-induced atrial natriuretic factor release from rat hearts. *The American journal of physiology*. 1989;257:H147-156
56. Baertschi AJ, Hausmaninger C, Walsh RS, Mentzer RM, Jr., Wyatt DA, Pence RA. Hypoxia-induced release of atrial natriuretic factor (anf) from the isolated rat and rabbit heart. *Biochemical and biophysical research communications*. 1986;140:427-433
57. Schiebinger RJ, Linden J. Effect of atrial contraction frequency on atrial natriuretic peptide secretion. *The American journal of physiology*. 1986;251:H1095-1099
58. Skvorak JP, Nazian SJ, Dietz JR. Endothelin acts as a paracrine regulator of stretch-induced atrial natriuretic peptide release. *The American journal of physiology*. 1995;269:R1093-1098
59. Mantymaa P, Leppaluoto J, Ruskoaho H. Endothelin stimulates basal and stretch-induced atrial natriuretic peptide secretion from the perfused rat heart. *Endocrinology*. 1990;126:587-595
60. Thibault G, Doubell AF, Garcia R, Lariviere R, Schiffrin EL. Endothelin-stimulated secretion of natriuretic peptides by rat atrial myocytes is mediated by endothelin receptors. *Circulation research*. 1994;74:460-470
61. Skvorak JP, Dietz JR. Endothelin and nitric oxide interact to regulate stretch-induced anp secretion. *The American journal of physiology*. 1997;273:R301-306
62. Leskinen H, Vuolteenaho O, Leppaluoto J, Ruskoaho H. Role of nitric oxide on cardiac hormone secretion: Effect of ng-nitro-l-arginine methyl ester on atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release. *Endocrinology*. 1995;136:1241-1249
63. Ruskoaho H, Toth M, Lang RE. Atrial natriuretic peptide secretion: Synergistic effect of phorbol ester and a23187. *Biochemical and biophysical research communications*. 1985;133:581-588

64. Ruskoaho H, Vakkuri O, Arjamaa O, Vuolteenaho O, Leppaluoto J. Pressor hormones regulate atrial-stretch-induced release of atrial natriuretic peptide in the pithed rat. *Circulation research*. 1989;64:482-492
65. Dananberg J, Grekin RJ. Corticoid regulation of atrial natriuretic factor secretion and gene expression. *The American journal of physiology*. 1992;263:H1377-1381
66. Shields PP, Dixon JE, Glembotski CC. The secretion of atrial natriuretic factor-(99-126) by cultured cardiac myocytes is regulated by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263:12619-12628
67. Leskinen H, Vuolteenaho O, Toth M, Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide (anp) inhibits its own secretion via anp(a) receptors: Altered effect in experimental hypertension. *Endocrinology*. 1997;138:1893-1902
68. Sato A, Canny BJ, Autelitano DJ. Adrenomedullin stimulates camp accumulation and inhibits atrial natriuretic peptide gene expression in cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;230:311-314
69. Martinez-Rumayor A, Richards AM, Burnett JC, Januzzi JL, Jr. Biology of the natriuretic peptides. *The American journal of cardiology*. 2008;101:3-8
70. Ruskoaho H, Leskinen H, Magga J, Taskinen P, Mantymaa P, Vuolteenaho O, Leppaluoto J. Mechanisms of mechanical load-induced atrial natriuretic peptide secretion: Role of endothelin, nitric oxide, and angiotensin ii. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 1997;75:876-885
71. Sengenès C, Moro C, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. [natriuretic peptides: A new lipolytic pathway in human fat cells]. *Med Sci (Paris)*. 2005;21:61-65

72. LaPointe MC, Sitkins JR. Phorbol ester stimulates the synthesis and secretion of brain natriuretic peptide from neonatal rat ventricular cardiocytes: A comparison with the regulation of atrial natriuretic factor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 1993;7:1284-1296
73. Tenhunen O, Szokodi I, Ruskoaho H. Posttranscriptional activation of bnp gene expression in response to increased left ventricular wall stress: Role of calcineurin and pkc. *Regulatory peptides*. 2005;128:187-196
74. Han B, Hasin Y. Cardiovascular effects of natriuretic peptides and their interrelation with endothelin-1. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003;17:41-52
75. Pandey KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides*. 2005;26:901-932
76. Potter LR. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: Implications for regulation. *Front Biosci*. 2005;10:1205-1220
77. Muller D, Mukhopadhyay AK, Speth RC, Guidone G, Potthast R, Potter LR, Middendorff R. Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology*. 2004;145:1392-1401
78. Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological reviews*. 1990;70:665-699
79. Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1997;15:1235-1243
80. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, Garbers DL. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*. 1989;58:1155-1162
81. Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Molecular and cellular biology*. 1991;11:3454-3462

82. Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC, Jr. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 1996;369:165-187
83. Langub MC, Jr., Dolgas CM, Watson RE, Jr., Herman JP. The c-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology*. 1995;7:305-309
84. Abbey SE, Potter LR. Lysophosphatidic acid inhibits c-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase-b. *Endocrinology*. 2003;144:240-246
85. Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-a. *Circulation research*. 2003;93:700-709
86. Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem*. 2002;230:31-47
87. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and c-type natriuretic peptide. *Endocrinology*. 1992;130:229-239
88. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV. Selective activation of the b natriuretic peptide receptor by c-type natriuretic peptide (cnp). *Science (New York, N.Y.)*. 1991;252:120-123
89. Bovy PR. Structure activity in the atrial natriuretic peptide (anp) family. *Medicinal research reviews*. 1990;10:115-142
90. Chinkers M, Wilson EM. Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:18589-18597

91. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cgmp-dependent protein kinases. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22:307-312
92. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Insights into cgmp signalling derived from cgmp kinase knockout mice. *Front Biosci*. 2005;10:1279-1289
93. Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, Walter U. Functional analysis of cgmp-dependent protein kinases i and ii as mediators of no/cgmp effects. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1998;358:134-139
94. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiological reviews*. 1995;75:725-748
95. Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews*. 2002;82:769-824
96. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic gmp receptor proteins. *Faseb J*. 1993;7:328-338
97. Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C, Beavo JA. Differential regulation of endothelial cell permeability by cgmp via phosphodiesterases 2 and 3. *Circulation research*. 2007;101:811-818
98. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cdna clones. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263:9395-9401
99. Anand-Srivastava MB. Atrial natriuretic peptide-c receptor and membrane signalling in hypertension. *Journal of hypertension*. 1997;15:815-826
100. Andreassi MG, Del Ry S, Palmieri C, Clerico A, Biagini A, Giannessi D. Up-regulation of 'clearance' receptors in patients with chronic heart failure: A possible explanation for the resistance to biological effects of cardiac natriuretic hormones. *Eur J Heart Fail*. 2001;3:407-414

101. van den Akker F. Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *Journal of molecular biology*. 2001;311:923-937
102. Murthy KS, Makhoul GM. Identification of the g protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (npr-c). *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:17587-17592
103. Bennett BD, Bennett GL, Vitangcol RV, Jewett JR, Burnier J, Henzel W, Lowe DG. Extracellular domain-igg fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266:23060-23067
104. Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science (New York, N.Y.)*. 1987;238:675-678
105. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:7403-7408
106. Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type c receptors of atrial natriuretic factor. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265:20952-20958
107. Flora DR, Potter LR. Prolonged atrial natriuretic peptide exposure stimulates guanylyl cyclase-a degradation. *Endocrinology*. 2010
108. Cohen D, Koh GY, Nikonova LN, Porter JG, Maack T. Molecular determinants of the clearance function of type c receptors of natriuretic peptides. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:9863-9869
109. Anand-Srivastava MB, Sairam MR, Cantin M. Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/camp system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/camp signal transduction system. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265:8566-8572

110. Anand-Srivastava MB, Srivastava AK, Cantin M. Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262:4931-4934
111. Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JG, Grider JR, Makhlof GM. G(i-1)/g(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278:G974-980
112. Kuhn M. Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: Lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handbook of experimental pharmacology*. 2009:47-69
113. Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-a receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature*. 1995;378:65-68
114. Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature*. 1986;324:473-476
115. Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature*. 1987;326:697-698
116. Light DB, Corbin JD, Stanton BA. Dual ion-channel regulation by cyclic gmp and cyclic gmp-dependent protein kinase. *Nature*. 1990;344:336-339
117. Sonnenberg H, Honrath U, Chong CK, Wilson DR. Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct. *The American journal of physiology*. 1986;250:F963-966
118. Pfaffendorf M. [atrial natriuretic peptide as angiotensin ii antagonist. A new therapeutic principle?]. *Med Monatsschr Pharm*. 1992;15:169-177
119. Dillingham MA, Anderson RJ. Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science (New York, N.Y.)*. 1986;231:1572-1573

120. John SW, Krege JH, Oliver PM, Hagan JR, Hodgins JB, Pang SC, Flynn TG, Smithies O. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science (New York, N.Y.)* 1995;267:679-681
121. Steinhilber ME, Cochrane KL, Field LJ. Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension*. 1990;16:301-307
122. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH, Heath SC, Eyheramendy S, Papadakis K, Voight BF, Scott LJ, Zhang F, Farrall M, Tanaka T, Wallace C, Chambers JC, Khaw KT, Nilsson P, van der Harst P, Polidoro S, Grobbee DE, Onland-Moret NC, Bots ML, Wain LV, Elliott KS, Teumer A, Luan J, Lucas G, Kuusisto J, Burton PR, Hadley D, McArdle WL, Brown M, Dominiczak A, Newhouse SJ, Samani NJ, Webster J, Zeggini E, Beckmann JS, Bergmann S, Lim N, Song K, Vollenweider P, Waeber G, Waterworth DM, Yuan X, Groop L, Orho-Melander M, Allione A, Di Gregorio A, Guarrera S, Panico S, Ricceri F, Romanazzi V, Sacerdote C, Vineis P, Barroso I, Sandhu MS, Luben RN, Crawford GJ, Jousilahti P, Perola M, Boehnke M, Bonnycastle LL, Collins FS, Jackson AU, Mohlke KL, Stringham HM, Valle TT, Willer CJ, Bergman RN, Morken MA, Doring A, Gieger C, Illig T, Meitinger T, Org E, Pfeufer A, Wichmann HE, Kathiresan S, Marrugat J, O'Donnell CJ, Schwartz SM, Siscovick DS, Subirana I, Freimer NB, Hartikainen AL, McCarthy MI, O'Reilly PF, Peltonen L, Pouta A, de Jong PE, Snieder H, van Gilst WH, Clarke R, Goel A, Hamsten A, Peden JF, Seedorf U, Syvanen AC, Tognoni G, Lakatta EG, Sanna S, Scheet P, Schlessinger D, Scuteri A, Dorr M, Ernst F, Felix SB, Homuth G, Lorbeer R, Reffelmann T, Rettig R, Volker U, Galan P, Gut IG, Hercberg S, Lathrop GM, Zelenika D, Deloukas P, Soranzo N, Williams FM, Zhai G, Salomaa V, Laakso M, Elosua R, Forouhi NG, Volzke H, Uitterwaal CS, van der Schouw YT, Numans ME, Matullo G, Navis G, Berglund G, Bingham SA, Kooner JS, Connell JM, Bandinelli S, Ferrucci L, Watkins H, Spector TD, Tuomilehto J, Altshuler D, Strachan DP, Laan M, Meneton P, Wareham NJ, Uda M, Jarvelin MR, Mooser V, Melander O, Loos RJ, Elliott P, Abecasis GR, Caulfield M, Munroe PB. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nature genetics*. 2009

123. Fluckiger JP, Waeber B, Matsueda G, Delaloye B, Nussberger J, Brunner HR. Effect of atriopeptin iii on hematocrit and volemia of nephrectomized rats. *The American journal of physiology*. 1986;251:H880-883
124. Huxley VH, Tucker VL, Verburg KM, Freeman RH. Increased capillary hydraulic conductivity induced by atrial natriuretic peptide. *Circulation research*. 1987;60:304-307
125. McKay MK, Huxley VH. Anp increases capillary permeability to protein independent of perfusate protein composition. *The American journal of physiology*. 1995;268:H1139-1148
126. Sabrane K, Kruse MN, Fabritz L, Zetsche B, Mitko D, Skryabin BV, Zwiener M, Baba HA, Yanagisawa M, Kuhn M. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:1666-1674
127. Kuhn M. Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic research in cardiology*. 2004;99:76-82
128. Holtwick R, Gotthardt M, Skryabin B, Steinmetz M, Potthast R, Zetsche B, Hammer RE, Herz J, Kuhn M. Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-a prevents the acute but not chronic effects of anp on blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:7142-7147
129. Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Rogers LC, Samson WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin ii-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82:8720-8723
130. Itoh H, Nakao K, Katsuura G, Morii N, Shiono S, Sakamoto M, Sugawara A, Yamada T, Saito Y, Matsushita A, et al. Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats. *Circulation research*. 1986;59:342-347

131. Schultz HD, Gardner DG, Deschepper CF, Coleridge HM, Coleridge JC. Vagal c-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *The American journal of physiology*. 1988;255:R6-13
132. Steele MK, Gardner DG, Xie PL, Schultz HD. Interactions between anp and ang ii in regulating blood pressure and sympathetic outflow. *The American journal of physiology*. 1991;260:R1145-1151
133. Yang RH, Jin HK, Wyss JM, Chen YF, Oparil S. Pressor effect of blocking atrial natriuretic peptide in nucleus tractus solitarii. *Hypertension*. 1992;19:198-205
134. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:14730-14735
135. Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-a. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111:1399-1407
136. Kilic A, Velic A, De Windt LJ, Fabritz L, Voss M, Mitko D, Zwiener M, Baba HA, van Eickels M, Schlatter E, Kuhn M. Enhanced activity of the myocardial na⁺/h⁺ exchanger nhe-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation*. 2005;112:2307-2317
137. Bubikat A, De Windt LJ, Zetsche B, Fabritz L, Sickler H, Eckardt D, Godecke A, Baba HA, Kuhn M. Local atrial natriuretic peptide signaling prevents hypertensive cardiac hypertrophy in endothelial nitric-oxide synthase-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:21594-21599

138. Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, Berlan M, Bouloumie A, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283:R257-265
139. Nishikimi T, Iemura-Inaba C, Akimoto K, Ishikawa K, Koshikawa S, Matsuoka H. Stimulatory and inhibitory regulation of lipolysis by the npr-a/cgmp/pkg and npr-c/g(i) pathways in rat cultured adipocytes. *Regulatory peptides*. 2009;153:56-63
140. Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, Galitzky J. Involvement of a cgmp-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:48617-48626
141. Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, Yamazaki S, Asano Y, Ogai A, Okazaki H, Asai M, Nagamachi Y, Maeda N, Shintani Y, Minamino T, Asakura M, Kishimoto I, Funahashi T, Tomoike H, Kitakaze M. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53:2070-2077
142. Kierner AK, Hartung T, Vollmar AM. Cgmp-mediated inhibition of tnfa production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J Immunol*. 2000;165:175-181
143. Morita R, Ukyo N, Furuya M, Uchiyama T, Hori T. Atrial natriuretic peptide polarizes human dendritic cells toward a th2-promoting phenotype through its receptor guanylyl cyclase-coupled receptor a. *J Immunol*. 2003;170:5869-5875
144. Elferink JG, De Koster BM. Atrial natriuretic factor stimulates migration by human neutrophils. *European journal of pharmacology*. 1995;288:335-340
145. Ladetzki-Baehs K, Keller M, Kierner AK, Koch E, Zahler S, Wendel A, Vollmar AM. Atrial natriuretic peptide, a regulator of nuclear factor-kappab activation in vivo. *Endocrinology*. 2007;148:332-336

146. Biollaz J, Callahan LT, 3rd, Nussberger J, Waeber B, Gomez HJ, Blaine EH, Brunner HR. Pharmacokinetics of synthetic atrial natriuretic peptides in normal men. *Clin Pharmacol Ther.* 1987;41:671-677
147. Kenny AJ, Stephenson SL. Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett.* 1988;232:1-8
148. Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM, Yandle TG, Protter A, Kosoglou T. Clearance receptors and endopeptidase 24.11: Equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *The American journal of physiology.* 1996;271:R373-380
149. Sonnenberg JL, Sakane Y, Jeng AY, Koehn JA, Ansell JA, Wennogle LP, Ghai RD. Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides.* 1988;9:173-180
150. Yandle TG. Biochemistry of natriuretic peptides. *J Intern Med.* 1994;235:561-576
151. Kukkonen P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Basal and volume expansion-stimulated plasma atrial natriuretic peptide concentrations and hemodynamics in conscious rats: Effects of sch 39.370, an endopeptidase inhibitor, and c-anf-(4-23), a clearance receptor ligand. *Endocrinology.* 1992;130:755-765
152. Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *J Endocrinol.* 2000;167:239-246
153. Chen HH, Lainchbury JG, Burnett JC, Jr. Natriuretic peptide receptors and neutral endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic natriuretic peptide dendroaspis natriuretic peptide. *Journal of the American College of Cardiology.* 2002;40:1186-1191
154. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *The New England journal of medicine.* 2001;345:1291-1297

155. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiological reviews*. 1999;79:703-761
156. Markert T, Krenn V, Leebmann J, Walter U. High expression of the focal adhesion- and microfilament-associated protein vasp in vascular smooth muscle and endothelial cells of the intact human vessel wall. *Basic research in cardiology*. 1996;91:337-343
157. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (ve)-cadherin: Only an intercellular glue? *Experimental cell research*. 1999;252:13-19
158. Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annual review of physiology*. 1998;60:121-142
159. Reinhard M, Zumbunn J, Jaquemar D, Kuhn M, Walter U, Trueb B. An alpha-actinin binding site of zyxin is essential for subcellular zyxin localization and alpha-actinin recruitment. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:13410-13418
160. Wu MH. Endothelial focal adhesions and barrier function. *The Journal of physiology*. 2005;569:359-366
161. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage p1 site-specific recombination. I. Recombination between loxp sites. *Journal of molecular biology*. 1981;150:467-486
162. Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-cre transgenic mice: A new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental biology*. 2001;230:230-242
163. Selam JL, Zirinis P, Mellet M, Mirouze J. Stable insulin for implantable delivery systems: In vitro studies with different containers and solvents. *Diabetes care*. 1987;10:343-347
164. Lopez MJ, Garbers DL, Kuhn M. The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:23064-23068

165. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 1970;227:680-685
166. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85
167. Porzio MA, Pearson AM. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 1977;490:27-34
168. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76:4350-4354
169. Gershoni JM. Protein blotting: A manual. *Methods Biochem Anal*. 1988;33:1-58
170. Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvascular research*. 1973;5:384-394
171. Schreier B, Börner S, Volker K, Gambaryan S, Schafer SC, Kuhlencordt P, Gassner B, Kuhn M. The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-a receptor: Acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology*. 2008
172. Gambaryan S, Hauser W, Kobsar A, Glazova M, Walter U. Distribution, cellular localization, and postnatal development of vasp and mena expression in mouse tissues. *Histochemistry and cell biology*. 2001;116:535-543
173. Larsen R. Physiologie der atmung. In: Larsen R, ed. *Anästhesie*. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 2001:216-247.
174. Jurna I. Analgetika, schmerzbekämpfung. In: Forth W. HD, Rummel W., Starke K., ed. *Allgemeine und spezielle pharmakologie und toxikologie*. Mannheim, Leipzig: BI Wissenschaftsverlag; 1992:200-224.

175. Sinclair MD. A review of the physiological effects of alpha2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *The Canadian veterinary journal*. 2003;44:885-897
176. Sunzel M, Paalzow L, Berggren L, Eriksson I. Respiratory and cardiovascular effects in relation to plasma levels of midazolam and diazepam. *British journal of clinical pharmacology*. 1988;25:561-569
177. Wright M. Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1982;180:1462-1471
178. Schmidt-Oechtering GU, Becker K. [old and new alpha 2-adrenoceptor agonists. 1. Xylazine and medetomidine]. *Tierärztliche Praxis*. 1992;20:447-458
179. Degoute CS. Controlled hypotension: A guide to drug choice. *Drugs*. 2007;67:1053-1076
180. Jaubert J, Jaubert F, Martin N, Washburn LL, Lee BK, Eicher EM, Guenet JL. Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor c gene (npr3). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:10278-10283
181. Berl T, Mansour J, Teitelbaum I. Anp stimulates phospholipase c in cultured rimct cells: Roles of protein kinases and g protein. *The American journal of physiology*. 1991;260:F590-595
182. Frimmer M, Gotte H. [circulation studies in the dog with the aid of radiophosphorus-labelled calcium and sodium polyphosphate.]. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1953;217:319-328
183. Biewald N, Billmeier J. Blood volume and extracellular space (ecs) of the whole body and some organs of the rat. *Experientia*. 1978;34:412-413
184. Reilly FD. Innervation and vascular pharmacodynamics of the mammalian spleen. *Experientia*. 1985;41:187-192

185. Kaufman S. Role of spleen in anp-induced reduction in plasma volume. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1992;70:1104-1108
186. Kaufman S, Deng Y. Splenic control of intravascular volume in the rat. *The Journal of physiology*. 1993;468:557-565
187. Deng Y, Kaufman S. Influence of atrial natriuretic factor on fluid efflux from the splenic circulation of the rat. *The Journal of physiology*. 1996;491 (Pt 1):225-230
188. Almeida FA, Suzuki M, Maack T. Atrial natriuretic factor increases hematocrit and decreases plasma volume in nephrectomized rats. *Life sciences*. 1986;39:1193-1199
189. Curry FR, Rygh CB, Karlsen T, Wiig H, Adamson RH, Clark JF, Lin YC, Gassner B, Thorsen F, Moen I, Tenstad O, Kuhn M, Reed RK. Atrial natriuretic peptide modulation of albumin clearance and contrast agent permeability in mouse skeletal muscle and skin: Role in regulation of plasma volume. *The Journal of physiology*. 2010;588:325-339
190. Curry FR. Atrial natriuretic peptide: An essential physiological regulator of transvascular fluid, protein transport, and plasma volume. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:1458-1461
191. Zimmerman RS, Trippodo NC, MacPhee AA, Martinez AJ, Barbee RW. High-dose atrial natriuretic factor enhances albumin escape from the systemic but not the pulmonary circulation. *Circulation research*. 1990;67:461-468
192. van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW. Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vascular pharmacology*. 2002;39:257-272
193. Tucker VL, Simanonok KE, Renkin EM. Tissue-specific effects of physiological anp infusion on blood-tissue albumin transport. *The American journal of physiology*. 1992;263:R945-953

194. Chen W, Gassner B, Borner S, Nikolaev VO, Schlegel N, Waschke J, Steinbronn N, Strasser R, Kuhn M. Atrial natriuretic peptide enhances microvascular albumin permeability by the caveolae-mediated transcellular pathway. *Cardiovascular research*. 2012;93:141-151
195. Walter U, Eigenthaler M, Geiger J, Reinhard M. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate vasp in the regulation of human platelets. *Advances in experimental medicine and biology*. 1993;344:237-249
196. Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. Camp- and cgmp-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (vasp) in vitro and in intact human platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:14509-14517
197. Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P. Mena, a relative of vasp and drosophila enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*. 1996;87:227-239
198. Reinhard M, Jarchau T, Walter U. Actin-based motility: Stop and go with ena/vasp proteins. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26:243-249
199. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. 2004;84:869-901
200. Benz PM, Blume C, Moebius J, Oschatz C, Schuh K, Sickmann A, Walter U, Feller SM, Renne T. Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaIIb-spectrin-vasp complexes. *The Journal of cell biology*. 2008;180:205-219
201. Castellano F, Le Clainche C, Patin D, Carlier MF, Chavrier P. A wasp-vasp complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *The EMBO journal*. 2001;20:5603-5614
202. Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, Gertler FB, Schafer DA. Ena/vasp proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:28653-28662

203. Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Grobe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB, Carlier MF. Role of proteins of the ena/vasp family in actin-based motility of listeria monocytogenes. *The Journal of cell biology*. 1999;144:1245-1258
204. Smolenski A, Poller W, Walter U, Lohmann SM. Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cgmp-dependent protein kinase i. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:25723-25732
205. Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J, Chakraborty T. A novel proline-rich motif present in acta of listeria monocytogenes and cytoskeletal proteins is the ligand for the evh1 domain, a protein module present in the ena/vasp family. *The EMBO journal*. 1997;16:5433-5444
206. Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U, Zimmer M. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:8120-8125
207. Curry FE, Michel CC. A fiber matrix model of capillary permeability. *Microvascular research*. 1980;20:96-99
208. Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *The Journal of physiology*. 2004;557:889-907
209. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American journal of physiology*. 2004;286:H1672-1680
210. Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a timp-3-sensitive metalloproteinase. *The Journal of cell biology*. 2000;148:811-824

211. Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *American journal of physiology*. 2005;289:H1993-1999
212. Furst R, Bubik MF, Bihari P, Mayer BA, Khandoga AG, Hoffmann F, Rehberg M, Krombach F, Zahler S, Vollmar AM. Atrial natriuretic peptide protects against histamine-induced endothelial barrier dysfunction in vivo. *Molecular pharmacology*. 2008;74:1-8
213. Lofton CE, Newman WH, Currie MG. Atrial natriuretic peptide regulation of endothelial permeability is mediated by cgmp. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990;172:793-799
214. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:44385-44398
215. van Hinsbergh V, van Nieuw Amerongen G. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *Journal of anatomy*. 2002;200:525
216. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews*. 2006;58:488-520
217. Netherton SJ, Maurice DH. Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: Implications in angiogenesis. *Molecular pharmacology*. 2005;67:263-272
218. Peyter AC, Muehlethaler V, Liaudet L, Marino M, Di Bernardo S, Diaceri G, Tolsa JF. Muscarinic receptor m1 and phosphodiesterase 1 are key determinants in pulmonary vascular dysfunction following perinatal hypoxia in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295:L201-213
219. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews*. 2006;86:279-367

220. Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Barth H, Curry FE. Camp protects endothelial barrier functions by preventing rac-1 inhibition. *American journal of physiology*. 2004;287:H2427-2433
221. Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic amp potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an epac-rap1 signaling pathway. *Molecular and cellular biology*. 2005;25:136-146
222. Klinger JR, Warburton R, Carino GP, Murray J, Murphy C, Napier M, Harrington EO. Natriuretic peptides differentially attenuate thrombin-induced barrier dysfunction in pulmonary microvascular endothelial cells. *Experimental cell research*. 2006;312:401-410
223. Fryer BH, Field J. Rho, rac, pak and angiogenesis: Old roles and newly identified responsibilities in endothelial cells. *Cancer letters*. 2005;229:13-23
224. Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. Regulation of tnf-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by rho, rac, and cdc42 in human endothelial cells. *Journal of cellular physiology*. 1998;176:150-165
225. Miao H, Li S, Hu YL, Yuan S, Zhao Y, Chen BP, Puzon-McLaughlin W, Tarui T, Shyy JY, Takada Y, Usami S, Chien S. Differential regulation of rho gtpases by beta1 and beta3 integrins: The role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *Journal of cell science*. 2002;115:2199-2206
226. Omori K, Kotera J. Overview of pdes and their regulation. *Circulation research*. 2007;100:309-327
227. Trippodo NC, Barbee RW. Atrial natriuretic factor decreases whole-body capillary absorption in rats. *The American journal of physiology*. 1987;252:R915-920
228. Renkin E, Tucker V. Atrial natriuretic peptide as a regulator of transvascular fluid balance. *News Physiol. Sci*. 1996;11:138-143

229. Fox AA, Collard CD, Shernan SK, Seidman CE, Seidman JG, Liu KY, Muehlschlegel JD, Perry TE, Aranki SF, Lange C, Herman DS, Meitinger T, Lichtner P, Body SC. Natriuretic peptide system gene variants are associated with ventricular dysfunction after coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology*. 2009;110:738-747
230. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Parving HH. Polymorphisms in the b-type natriuretic peptide (bnp) gene are associated with nt-probnp levels but not with diabetic nephropathy or mortality in type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:3235-3239
231. McDonagh TA, McDonald K, Maisel AS. Screening for asymptomatic left ventricular dysfunction using b-type natriuretic peptide. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn)*. 2008;14:5-8
232. Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR. Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: Natriuretic peptide receptor (npr)-b, not npr-a, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology*. 2007;148:3518-3522
233. Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: An update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *American journal of hypertension*. 2008;21:733-741

7 Anhang

Quelltext Permutationstest

```

PermutationsTTest[gruppe1_,gruppe2_]:=Module[{original,codierung,GruppenZuweisung,ttestd
aten,pwerte,pwertkritisch,pwertoriginal},
(* Eingabe der Gruppen *)
(* Zusammenfügen zu sortierten Originaldaten *)
original=Join[gruppe1,gruppe2];
(* Erstellung einer Codierungszuweisung und erstellung aller Permutationen *)
codierung=Permutations[
  Join[
    Table[0,{Length[gruppe1]},Table[1,{Length[gruppe2]}]
  ]
];
PermutationsTTest::Permutationen := "Es wurden `1` Permutationen durchgeführt.";
Message[PermutationsTTest::Permutationen,Length[codierung]];
(* Prozedur zur GruppenZuweisung aufgrund der Permutationslisten *)
GruppenZuweisung[permut_]:=Module[{testgruppe1,testgruppe2},
  testgruppe1={};
  testgruppe2={};
  Do[
    If[permut[[i]]==0,AppendTo[testgruppe1,original[[i]]],AppendTo[testgruppe2,original[[i]]]]
    ,{i,1,Length[original]}
  ];
  Return[{testgruppe1,testgruppe2}]
];
(* Falls beide Gruppen gleich groß sind so treten alle Kombinationen genau zwei mal Auf! *)
(* Erstellung einer Liste mit den T-Testwerten *)
ttestdaten=GruppenZuweisung/@codierung;
(* Berechnung und Sortierung aller P-Werte zu den jeweiligen Testgruppen *)
pwerte=Sort[
  Table[
    TwoSidedPValue/
    MeanDifferenceTest[ttestdaten[[i,1]],ttestdaten[[i,2]],0,EqualVariances==True,TwoSided==True],
    {i,Length[ttestdaten]}
  ]
];
pwertkritisch=pwerte[[Floor[0.05*Length[pwerte]]];
(* Ausgabe des kritischen P-Wertes unter dem 5 Prozent der Gemessenen P-Werte liegen *)
PermutationsTTest::PWertkritisch := "Der kritische p-Wert liegt bei: `1`";
Message[PermutationsTTest::PWertkritisch,pwertkritisch];
pwertoriginal=TwoSidedPValue/
  MeanDifferenceTest[gruppe1,gruppe2,0,EqualVariances==True,TwoSided==True];
(* Ausgabe des P-Wertes der Ausgangskonstellation *)
PermutationsTTest::PWertoriginal := "Der unter der Ausgangssituation berechnete p-Wert
liegt bei: `1`";
Message[PermutationsTTest::PWertoriginal,pwertoriginal];
]/Timing

```

© by Stefan Englert, Diplomand am Lehrstuhl für Mathematik VIII – Statistik
(Prof. Dr. M. Falk)

Danksagung

Großer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Michaela Kuhn für die Möglichkeit der Promotion anhand eines solch interessanten Themas sowie für die fortwährende Unterstützung, die anregenden Diskussionen und vor allem die reichhaltigen Möglichkeiten bei der Realisierung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Elke Butt für die Bereitschaft als zweite Prüferin zur Verfügung zu stehen danken.

Dem SFB 688, insbesondere Herrn Prof. Dr. med. U. Walter, und der Medizinischen Fakultät danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts, Lehrstuhl I für das inspirierende und einmalige Arbeitsklima danken. Besonderer Dank gilt hierbei Katharina Völker und Frau Birgit Gaßner für die Unterstützung bei der Genotypisierung und dem Erlernen der Katheterisierung. Vor allem möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. Barbara Schreier für die ausgezeichnete Betreuung während der Laborarbeit und dem Erlernen der operativen Eingriffe bedanken.

Weiterhin danke ich auch Herrn Dr. rer. nat. Stepan Gambaryan, Dr. rer. nat. Peter Benz und Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh für das Erlernen und Umsetzen der Western Blot Technik.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Freunden, die es toleriert haben, wenn nicht immer Zeit für ein Treffen war und mir immer wieder gezeigt haben, dass es auch noch ein Leben außerhalb des Labors gibt.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und Großeltern, die mich über all die Jahre kontinuierlich unterstützt haben und mir immer in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite standen. Deshalb und aus vielen weiteren Gründen widme ich ihnen diese Arbeit.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Frau Juliane für die gemeinsame Zeit, die ich bis jetzt mit ihr verbringen durfte, für jeden Spaß, den wir in dieser Zeit hatten und weiterhin noch haben werden, für die Ruhe, Geborgenheit und Geduld, für unser gemeinsames Kind sowie für den inspirierenden fachlichen Austausch bedanken. Kurz gesagt, ich bin so froh, dass ich dich habe.

Lebenslauf

Kontaktdaten

Sebastian Börner
Schillerstraße 28
06844 Dessau-Roßlau

Persönliche Daten

geb. am 23.01.1985 in Hildburghausen/Thür.
Staatsangehörigkeit Deutsch
verheiratet mit Dr. Juliane Börner
1 Kind

Akademischer Werdegang

11/2012	Approbation
11/2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2008 – 06/2010	Studium der Experimentellen Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2007 – 06/2008	Medizinische Dissertation am Physiologischen Institut Lehrstuhl 1 der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Prof. Kuhn)
03/2007	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005 – 11/2012	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Schulausbildung

06/2004	Allgemeine Hochschulreife
02/1999 – 06/2004	Goetheschule Ilmenau – Staatliches Gymnasium Besuch der Spezialklasse mit mathematischer-naturwissenschaftlicher Richtung

Dessau-Roßlau, den 12.11.12

Sebastian Börner