



**Charakterisierung inaktivierender
posttranslationaler Modifikationen des GC-A-
Rezeptors für das atriale natriuretische Peptid (ANP)**

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

vorgelegt von

Michael Hartmann

aus

Würzburg

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Markus Engstler

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Michaela Kuhn

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Tautz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Giana,
Maximilian & Johanna
in Liebe und Dankbarkeit

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Erkrankungen des Herzkreislaufsystems	1
1.1.1	Arterielle Hypertonie.....	1
1.1.2	Herzhypertrophie als Folge arterieller Hypertonie	2
1.2	Die Entdeckung des atrialen natriuretischen Peptids	3
1.3	Bildung und Freisetzung von ANP	4
1.4	Struktur und Funktion des GC-A-Rezeptors.....	6
1.4.1	Aktivierung und homologe Desensibilisierung der GC-A	7
1.4.2	Inhibition der GC-A Rezeptoraktivität	12
1.4.3	Ergebnisse zur Internalisierung des GC-A-Rezeptors.....	12
1.5	Physiologische Bedeutung des ANP/GC-A-Signalwegs	13
1.6	Bedeutung des ANP/GC-A-Signalwegs für das Herz.....	14
1.7	Motivation und Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	21
2.1	Verwendete Materialien	21
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.2	Geräte	23
2.1.3	Plasmide	24
2.1.4	Oligonukleotide und Sequenzierung	26
2.1.5	Zelllinien und Kulturbedingungen	27
2.2	Versuchstiere	27
2.2.1	Versuchstierhaltung	27
2.3	Bakterientransformation und Isolierung von Plasmiden	28

2.3.1	Transformation von Bakterien	28
2.3.2	Plasmidisolierung (Mini- und Midi-Präparation).....	29
2.3.3	Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)	29
2.4	DNA-Gelelektrophorese	31
2.5	Modifizierung vorhandener Plasmide	32
2.5.1	Übersicht über die Methode zur Modifizierung von Plasmiden.....	33
2.5.2	Generierung von pHA-GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}}^{\text{Gln}^{330}}$	38
2.5.3	Generierung von pFLAG-HA-TEV-GC-A.....	39
2.6	Transfektion von HEK 293-Zellen	43
2.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.8	Western Blot Analysen.....	43
2.8.1	Verwendete Antikörper.....	43
2.8.2	Zielproteine und verwendete Proben	44
2.8.3	Denaturierende Gel-Elektrophorese (SDS PAGE).....	45
2.8.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot).....	48
2.8.5	Auswertung von Western Blots	49
2.9	Biotinylierung der Zelloberfläche	49
2.10	ANP-Bindungsstudie an transient transfizierten HEK 293-Zellen...	50
2.11	Immunpräzipitation (IP) an transient transfizierten HEK 293-Zellen.....	50
2.11.1	Lyse transient transfizierter HEK 293-Zellen.....	50
2.11.2	Immunpräzipitation (IP) mittels anti-FLAG-Agarosebeads	51
2.12	Stimulationsexperimente an transfizierten HEK 293-Zellen mit ANP	53
2.12.1	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimente.....	53

2.12.2	Stimulation der GC-A an transfizierten HEK 293-Zellen in 24-Loch-Platten	55
2.12.3	Quantifizierung der cGMP-Menge je Probe mittels cGMP-RIA	55
2.13	Real-Time quantitative RT-PCR	56
2.13.1	Isolierung von mRNA aus murinem Gewebe mittels TRIzol®	56
2.14	Generierung von Plasmiden für transgene Mauslinien.....	57
2.14.1	Einfügen von Sall-Schnittstellen in <i>pFLAG-GC-A</i> mittels PCR.....	57
2.14.2	Zwischenschritt zur Sequenzierung	58
2.14.3	Generierung des Plasmids <i>pCR[®]2.1-FLAG-HA-TEV-GC-A</i>	59
2.14.4	Generierung des Plasmids <i>paMHC-FLAG-GC-A</i>	60
2.14.5	Generierung des Plasmids <i>paMHC-FLAG-HA-TEV-GC-A</i>	61
2.14.6	Generierung transgener Mäuse durch Mikroinjektion in Oozyten...61	
2.14.7	Amplifizieren einer Sonde für den Southern Blot.....	61
2.15	Genotypisierung der Mauslinien.....	62
2.15.1	DNA Extraktion aus Mausschwänzen	63
2.15.2	PCR zur Identifizierung transgener Tiere	63
2.16	Charakterisierung der transgenen Mauslinien.....	64
2.16.1	Homogenisierung von murinem Gewebe	64
2.16.2	Isolierung von Kardiomyozyten	65
2.16.3	Fraktionierung von isolierten Kardiomyozyten.....	65
2.16.4	Immunpräzipitation an Kardiomyozyten transgener Tiere	66
2.16.5	Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit ANP	67
2.17	Behandlung von Tieren mit Angiotensin II über osmotische Minipumpen.....	67
2.17.1	Vorbereitung und Aktivierung der Minipumpen	68

2.17.2	Implantation der Pumpen	68
2.17.3	Blutdruckmessung an den Versuchstieren	69
2.17.4	Beendigung der Versuchsreihen	69
2.17.5	Extraktion von cGMP aus murinem Gewebe.....	70
2.17.6	Histologie und Morphometrie	70
2.18	Echokardiographie	71
2.19	Datenauswertung und Darstellung der Ergebnisse	71
3	Ergebnisse	73
3.1	Charakterisierung einer Isoform des GC-A- Rezeptors (GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330)	73
3.1.1	GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 wird translatiert und als membranständiges Protein exprimiert	73
3.1.2	Stimulierbarkeit der Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 mit ANP	76
3.1.3	Der wildtypische GC-A-Rezeptor und die Mutante GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 bilden Heterodimere.....	82
3.1.4	Einfluss der Bildung von Heterodimeren auf die Aktivierbarkeit der GC-A durch den Liganden ANP	84
3.1.5	Bedeutung von GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 für die negative Regulation des NP/GC-A Systems durch Ang II in vivo	86
3.2	Charakterisierung des FLAG-HA-TEV-getaggen GC-A- Rezeptors.....	88
3.2.1	FLAG-HA-TEV-GC-A wird in HEK 293-Zellen exprimiert	89
3.2.2	Funktionsprüfung der TEV-Schnittstelle	90
3.2.3	Überprüfung der subzellulären Lokalisation und Stimulierbarkeit der Epitop-getaggen GC-A in vitro	92
3.3	Charakterisierung transgener Mäuse	96

3.3.1	Genotypisierung der transgenen Mäuse	97
3.3.2	Expression der getaggen GC-A in murinem Gewebe	98
3.3.3	Überexpression von FLAG-HA-TEV-tagged GC-A in Kardiomyozyten	110
3.3.4	Immunpräzipitation der GC-A aus Kardiomyozyten	112
3.3.5	Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit ANP	115
3.4	Induktion kardialer Hypertrophie	117
3.4.1	Ergebnisse der Angiotensin II-Studien	118
4	Diskussion	133
4.1	Charakterisierung einer neuartigen Isoform des GC-A- Rezeptors (GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}}\text{-Gln}^{330}$)	133
4.2	Charakterisierung der FLAG-HA-TEV-GC-A in vitro	143
4.3	Charakterisierung der Mauslinien mit herzspezifischer Überexpression epitopgetaggtter GC-A	145
4.3.1	Nachweis der Überexpression des modifizierten GC-A- Rezeptors in Herzen transgener Mäuse.....	145
4.3.2	Auswirkung der Überexpression auf die Bildung von cGMP	149
4.3.3	Ergebnisse der Angiotensin II induzierten Herzhypertrophie.....	152
4.4	Ausblick.....	157
5	Zusammenfassung	159
6	Abstract.....	163
7	Literaturverzeichnis	166
8	Danksagung.....	189
9	Eidesstattliche Erklärung	191

II Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AfCS	Alliance for Cell Signaling
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure/n
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	N,N'Methylenbisacrylamid
BCS	Bovine Calf Serum
BSA	Bovine Serum Albumin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CPM	counts per minute
DAG	Diacylglycerol
DBP	Diastolische Blutdruck
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ERK 1/2	extrazellulär geregelte Kinasen 1 und 2
FCS	Fetal Calf Serum
FLAG	FLAG-tag, Oktapeptid mit der Aminosäuresequenz DYKDDDDK
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-A	Guanylatzyklase A
GTP	Guanosintriphosphat
HA	HA-tag, Nonapeptid mit der Aminosäuresequenz YPYDVPDYA
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositoltrisphosphat
KHD	Kinasehomologe Domäne

KO	Knock Out
MWG	Firma Eurofins MWG GmbH in Ebersberg
NEB	NewEngland BioLabs, Frankfurt am Main
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NIH3T3	Embryonale Fibroblasten-Zelllinie (Maus)
NP	Natriuretisches Peptid
PAS	Periodic Acid Schiff Reaktion
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetate
PMCA	Plasmamembran-Kalzium-ATPase
RIA	Radioimmunassay
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Standardfehler
SOB	Nährmedium für Bakterien
SOC	SOB-Medium zzgl. 20mM Glukose
SBP	systolischer Blutdruck
TAC	Transverse Aortic Constriction
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEV	Tobacco Etch Virus
TG	Transgen
WT	Wildtyp

III Veröffentlichungen

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, **Hartmann M**, Nikolaev VO, Yang RB, Völker K, Gassner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. (2011) A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(45):18500-18505.

Schröter J, Zahedi RP, **Hartmann M**, Gaßner B, Gazinski A, Waschke J, Sickmann A, Kuhn M. (2010) Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *The FEBS journal* 277(11):2440-2453.

Kuhn M, Völker K, Schwarz K, Carbajo-Lozoya J, Flögel U, Jacoby C, Stypmann J, van Eickels M, Gambaryan S, **Hartmann M**, Werner M, Wieland T, Schrader J, Baba HA. (2009) The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation* 119(7):2019-2030.

Hartmann M*, Skryabin BV*, Müller T, Gazinski A, Schröter J, Gassner B, Nikolaev VO, Bünemann M, Kuhn M. (2008) Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *The Journal of biological chemistry* 283(42):28313-28320.

* Die genannten Autoren haben zu der jeweiligen Arbeit gleichermaßen beigetragen

1 Einleitung

1.1 Erkrankungen des Herzkreislaufsystems

1.1.1 Arterielle Hypertonie

Arterielle Hypertonie oder auch Bluthochdruck bezeichnet ein Krankheitsbild bei dem der Blutdruck in den Arterien der Individuen erhöht ist (Chobanian AV 2003 A). Eine zwischen 2005 und 2008 vom National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) durchgeführte Studie kam zu dem Ergebnis, dass schätzungsweise etwa 30 % der Erwachsenen in den Vereinigten Staaten von Amerika an Bluthochdruck leiden (Egan 2010). Hochgerechnet entspricht dies somit alleine in dieser Industrienation einer Zahl von 61,5 Millionen Erwachsenen (Wright 2011). Die NHANES Studie zeigt aber auch, dass nur 46 % bis 51 % der betroffenen Personen ihren Blutdruck durch Einnahme von Antihypertensiva normalisieren konnten, also einen systolischen Druck von weniger als 140 mmHg und einen diastolischen Druck von weniger als 90 mmHg erreichten (Chobanian AV 2003 B). Angesichts dieser Zahlen stellt sich die Frage wie es möglich ist, dass eine Krankheit mit so vielen Betroffenen persistent in der Gesellschaft, insbesondere in Ländern mit sehr guten Gesundheitssystemen, existiert. Experten diskutieren hierzu eine Vielzahl möglicher Gründe. Eine der wahrscheinlichsten Ursachen für dieses Phänomen könnte die Tatsache sein, dass diese Krankheit im Anfangsstadium primär symptomlos verläuft und daher oft nicht als solche wahrgenommen wird. Angesichts dieser Tatsache wundert es die Experten auch nicht, dass betroffene Personen sich selbst nicht als krank erachten und demzufolge oftmals auch nicht bereit sind eine lebensqualitätseinschränkende Therapie zu beginnen oder durchzuführen (Wang 2005 A). Aufgrund der fehlenden oder nur sehr schwachen Symptome verspüren Betroffene keine Notwendigkeit zu handeln. Eine oftmals fatale Haltung, da die Nebenwirkungen und Folgen einer arteriellen

Hypertonie schwerwiegend sind. Die Wahrscheinlichkeit eine Komplikation zu entwickeln hängt dabei stark von der Höhe des Blutdrucks (Lewington 2002) sowie weiterer Risikofaktoren (Jackson 2005) ab. Eine der häufigsten Befunde bei Patienten mit Hypertonie ist die linksventrikuläre Herzhypertrophie (Lorell 2000) welche mit einem verstärkten Auftreten von Herzinsuffizienz, ventrikuläre Arrhythmien, Tod nach Myokardinfarkt sowie plötzlichem Herztod assoziiert ist (Vakili 2001).

1.1.2 Herzhypertrophie als Folge arterieller Hypertonie

Die Herzhypertrophie ist eine kompensatorische Reaktion des Herzens auf anhaltende Volumen- oder Druckbelastung. Während Ausdauersport zu einer physiologischen Herzhypertrophie führt, bei der sich die Wände des linken als auch des rechten Ventrikels gleichmäßig verdicken, sorgen Erkrankungen wie arterielle Hypertonie zu einer anhaltenden einseitigen Druckbelastung und verursachen unbehandelt eine einseitige Herzhypertrophie. Durch die Druckbelastung erhöht sich die Wandspannung des betroffenen Ventrikels. Zur Kompensation dieser Belastung verdickt sich die Ventrikelwand durch Zunahme von Volumen und Querschnittsfläche der Myozyten. Der Durchmesser der Kammer ändert sich dabei nicht (konzentrische Hypertrophie) wodurch sich die Wandspannung normalisiert. Neben der Zunahme der Muskelmasse kann es im Zuge des Anpassungsprozesses auch zu Wachstum und Vermehrung des Bindegewebes kommen. Ohne geeignete Gegenmaßnahmen dilatiert der Ventrikel und die Wandspannung nimmt wieder zu. Die Effizienz des Herzmuskels nimmt dadurch ab und erreicht das Stadium der Herzinsuffizienz (Klinke 2005, Schmidt 2007).

1.2 Die Entdeckung des atrialen natriuretischen Peptids

Versuchsreihen an Hunden aus dem Jahre 1956 haben das erstaunliche Ergebnis hervorgebracht, dass die Erhöhung des Drucks im linken Atrium zu einer gesteigerten Diurese führt (Henry 1956). Die Autoren nahmen an, dass der Effekt durch dort lokalisierte Druckrezeptoren verursacht wird. Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass diese Rezeptoren Teil eines Mechanismus zur Regulierung des Blutvolumens sind und somit zur Homöostase beitragen. Erst 25 Jahre später postulierte die Arbeitsgruppe von de Bold im Jahre 1981 am Tierversuch mit Ratten einen im Atrium gebildeten Botenstoff der für die erhöhte renale Ausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid verantwortlich ist. Die Gruppe beobachtete im Tierversuch mit Ratten, dass die Infusion homogenisierten Materials aus den Atria der selben Spezies zu gesteigertem Ausscheidungsvolumen führt. Verglichen mit den Kontrolltieren führte die Infusion von homogenisierten Atria nicht nur zu einer vermehrten Bildung von Urin sondern erniedrigte zudem auch den Blutdruck signifikant. Im Vergleich dazu zeigte die Infusion von ventrikulärem Homogenat keinen dieser Effekte. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich sowohl Ausscheidung als auch Blutdruck nach Entfernen des atrialen Homogenates aus der Infusionslösung wieder normalisierten (Bold 1981). Aufgrund der hohen Dichte an Granula innerhalb der atrialen Myozyten folgerten die Wissenschaftler, dass eine in diesen Zellen gebildete Substanz für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. In den darauffolgenden Jahren gelang der gleichen Arbeitsgruppe die Isolierung und Klonierung des atrialen natriuretischen Peptides (ANP) das für die zuvor beobachteten Effekte verantwortlich war und erstmalig eine endokrine Verbindung zwischen Herz und Niere herstellte (Bold 1985). In den folgenden Jahren wurden noch weitere strukturell verwandte aber genetisch unterschiedliche Peptide mit ähnlichen Eigenschaften charakterisiert (Lucas 2000).

1.3 Bildung und Freisetzung von ANP

ANP wird in den Atria des Herzens, in der Lunge und der Niere (Potter 2006) zunächst als Prä-Pro-ANP mit einer Länge von 151 Aminosäuren gebildet. Durch Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz entsteht Pro-ANP (126 Aminosäuren) das in Granula gespeichert wird (Oikawa 1984). Die Sekretion des ANP beispielsweise aus dem Atrium erfolgt in erster Linie als Reaktion auf mechanischen Stress. Ausgelöst werden kann diese Reaktion beispielsweise durch ein erhöhtes Volumens das zur Dehnung des Atriums und somit auch der atrialen Myozyten führt (Espiner 1995, Edwards 1988). Obwohl beide Vorhöfe in der Lage sind ANP als Reaktion auf die Wanddehnung freizusetzen (Raine 1986), geben Studien an Ratten Hinweise darauf, dass das rechte Atrium in Bezug auf die sezernierten ANP-Mengen eine wichtigere Rolle spielt (Garcia 1987). Um das gespeicherte Pro-ANP in seine aktive Form umzuwandeln, wird es unmittelbar nach Freisetzung aus den Granula durch die membranständige Serinprotease Corin in das 28-Aminosäuren umfassende Peptid gespalten (Yan 2000). Die beiden Cysteine bilden über eine Disulfidbrücke ein 17 Aminosäuren umfassende Ringstruktur (vgl. Abbildung 1) die für die biologische Aktivität erforderlich ist (Misono 1984).

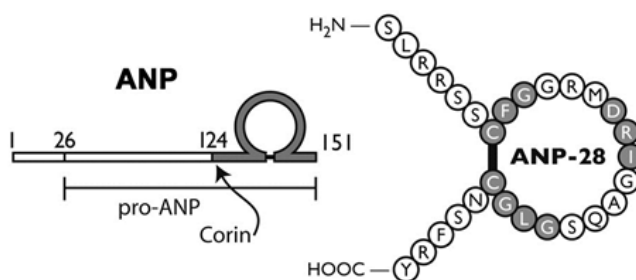


Abbildung 1: Prozessierung und Struktur des biologisch aktiven ANP (modifiziert nach Potter 2006)

Genetisch veränderte Mäuse denen die transmembrane Serinprotease Corin fehlt weisen erhöhte Level an Pro-ANP, jedoch keine nachweisbaren Mengen an ANP im Plasma auf. Die Tiere sind hypertensiv und entwickeln

im Laufe Ihres Lebens eine Herzhypertrophie, verbunden mit einer milden Reduzierung der Herzfunktion (Chan 2005). Mäuse mit einer künstlich herbeigeführten Deletion des Gens für Pro-ANP weisen einen ähnlichen Phänotyp auf (John 1995).

Das atriale natriuretische Peptid spielt eine bedeutende Rolle in der Regulierung von Blutdruck und Blutvolumen (Kuhn 2012). Neben der Freisetzung von ANP aus atrialen Myozyten zeigen Studien, dass eine chronische Überbelastung des Herzens, wie sie bei kongestiver Herzinsuffizienz auftritt, dazu führt, dass ANP auch aus Myozyten der Ventrikel freigesetzt wird (Yasue 1989, Saito 1989). Weitere Studien belegen, dass ANP auch in Lungengewebe produziert wird und dort vermutlich lokal eine physiologisch wichtige, protektive Rolle einnimmt (Gutkowska 1989). Neben der lokalen Stimulation und Freisetzung von ANP wurde auch gezeigt, dass die Stimulation der Druckrezeptoren in Halsschlagader und Niere über afferente Signale zu erhöhten ANP-Konzentrationen im Plasma führt (Antunes-Rodrigues 1992). Zahlreiche Ergebnisse von Untersuchungen an Menschen und Ergebnisse aus Tierversuchen zeigen, dass hypervolämische Zustände, die durch die Aufnahme salzhaltiger Speisen (Homcy 1985), Hyperaldosteronismus (Ballermann 1986, Cappuccio 1987), Nieren- (Saxenhofer 1987) oder Herzinsuffizienz (Raine 1986, Yasue 1989) hervorgerufen werden, zu einer erhöhten Freisetzung von ANP führen.

Die Plasmakonzentrationen an immunreaktivem ANP liegt bei gesunden Menschen zwischen 10 fmol/ml und 12 fmol/ml. Patienten mit Herzinsuffizienz weisen hingegen eine signifikante Erhöhung dieses Wertes auf. Die hier gemessenen Plasmakonzentrationen liegen zwischen 61 fmol/ml und 81 fmol/ml (Cody 1986). Durch erfolgreiche Behandlung einer Erkrankung wie beispielsweise Herzinsuffizienz normalisieren sich die Plasmalevel der Patienten wieder. Bei Vorliegen einer Niereninsuffizienz

können durch Dialyse oder Reduzierung der Natriumaufnahme vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (Katoh 1986, Saxenhofer 1987).

Der spezifische cGMP-bildende Rezeptor für das ANP (vgl. Abbildung 2, Seite 7) ist der natriuretische Peptidrezeptor A (NPRA), auch bekannt als die Guanylatzyklase A (GC-A). Durch die Bindung des Liganden ANP an die extrazelluläre Domäne wird die intrazelluläre, katalytische Zyklasedomäne aktiviert und der sekundäre Botenstoff cGMP gebildet (Chinkers 1992).

1.4 Struktur und Funktion des GC-A-Rezeptors

Bei dem GC-A-Rezeptor handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa das unter basalen Bedingungen als Homodimer (vgl. Abbildung 2, Seite 7), Homotetramer oder Homoquatramer vorliegt (Chinkers 1992, Lowe 1992, Robinson 2012). Der GC-A-Rezeptor selbst besteht aus mehreren Domänen mit unterschiedlicher Funktion. Extrazellulär ist die etwa 450 Aminosäuren umfassenden Bindungsdomäne für den Liganden ANP lokalisiert. Daran anschließend folgt eine etwa 21 Aminosäuren große hydrophobe Transmembrandomäne. Die intrazelluläre Domäne setzt sich aus einer etwa 250 Aminosäuren umfassenden kinasehomologen Domäne, einer ca. 41 Aminosäuren umfassenden Dimerisierungsdomäne sowie einer etwa 250 Aminosäuren umfassenden katalytischen Domäne (Zyklasedomäne) zusammen (Potter 2001). Der Dimerisierungsdomäne kommt im Rahmen der Aktivierung der katalytischen Zyklasedomäne eine besondere Bedeutung zu. Strukturanalysen und Modellierungen lassen vermuten, dass durch Bindung eines Liganden intrazellulär Konformationsänderungen ausgelöst werden, die zur Aktivierung der katalytischen Zyklasedomäne führen (Ogawa 2004, Ogawa 2009). Verschiedene Mutationsversuche an Aminosäuren der Dimerisierungsdomäne belegen deren Bedeutung für die Aktivierung (Huo 1999).

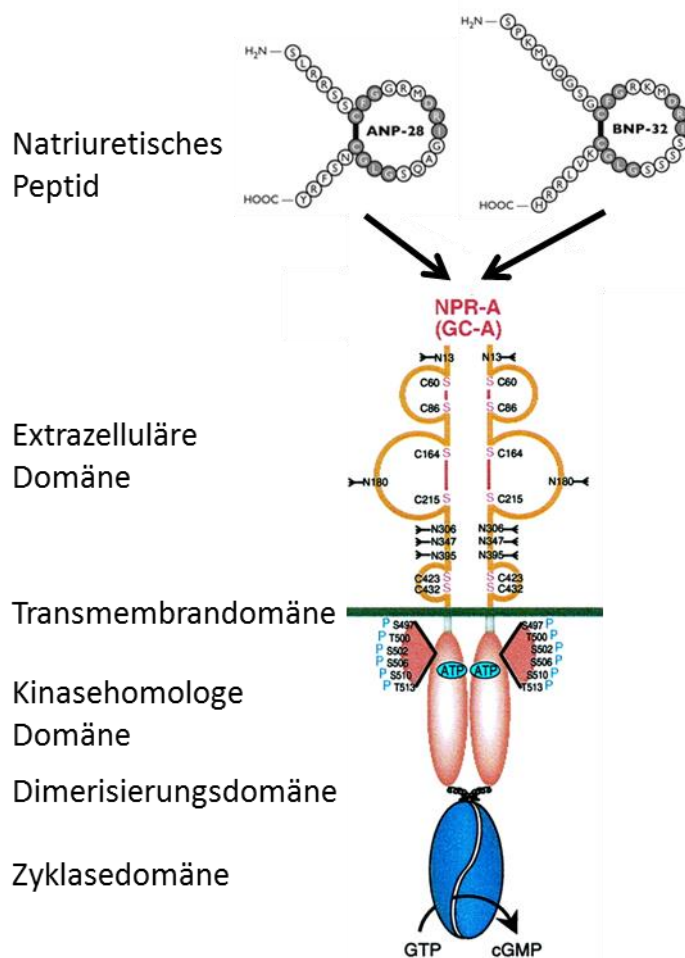


Abbildung 2: Struktur des GC-A-Rezeptors mit Darstellung der Liganden ANP und BNP (modifiziert nach Potter 2001 und Potter 2006)

Die Expression des GC-A-Rezeptors wurde in einer Vielzahl unterschiedlichster Gewebe nachgewiesen. Neben Organen wie Lunge und Niere findet sich mRNA für den GC-A-Rezeptor auch im ZNS, in Blutgefäßen, Nebenniere, Leber, Milz, Fettgewebe und der Aorta (Lowe 1989, Schulz 1989, Nagase 1997, Kuhn 2003).

1.4.1 Aktivierung und homologe Desensibilisierung der GC-A

Es wird vermutet, dass die extrazelluläre Ligandenbindung juxtamembrane Konformationsänderungen verursacht (Huo 1999). Hierdurch nimmt die katalytische Zyklasedomäne des jeweiligen Monomers eine Orientierung ein, die eine Synthese von cGMP aus dem Substrat GTP ermöglicht

(Ogawa 2004). Der genaue Mechanismus durch den das Aktivierungssignal über die Plasmamembran vermittelt wird, ist aber bisher noch nicht vollständig verstanden (Potter 2006). Basierend auf einer Reihe von Studien zum Aktivierungsmechanismus gibt es allerdings einige Hinweise auf die intrazellulären Vorgänge. Es wird vermutet, dass die kinasehomologe Domäne die Aktivität des GC-A-Rezeptors unter basalen Bedingungen unterdrückt. Modifizierte Rezeptoren mit einer Deletion dieser Domäne sind konstitutiv aktiv, was die regulierende Bedeutung unterstreicht (Chinkers 1989, Koller 1992, Potter 2006). Es wird davon ausgegangen, dass sich die kompakte intrazelluläre Struktur die für die Inhibition verantwortlich ist durch die Ligandenbindung auflockert. Somit wird eine Orientierung der Zyklasedomänen ermöglicht durch die zwei aktive Zentren pro Dimer entstehen können. Dieser hypothetische Mechanismus beruht primär auf Kristallstrukturanalysen der Adenylatzyklase, da für Guanylatzyklasen bisher keine entsprechenden Daten vorliegen. Mutationsversuche an Adenylat- und Guanylatzyklasen stützen diese Hypothese analoger Mechanismen allerdings (Tucker 1998, Sunahara 1998). Durch die zuvor beschriebenen Veränderungen sinkt gleichzeitig auch die Affinität des Rezeptors ANP zu binden (Jewett 1993, Koh 1992). Schließlich erfolgt die Dephosphorylierung bestimmter Phosphorylierungsstellen innerhalb der kinasehomologen Domäne die den Rezeptor desensitisiert (Potter 1992, Schröter 2010). Die für die Dephosphorylierung des Rezeptors verantwortlichen Enzyme in vivo sind bis dato noch unbekannt. Allerdings gibt es durch entsprechende Studien zumindest in vitro den Hinweis, dass die Dephosphorylierung des Rezeptors nicht durch eine, sondern zumindest zwei unterschiedliche Phosphatasen erfolgt (Bryan 2002). Die eine benötigt Magnesium oder Mangan für ihre Aktivität und wird nicht durch Microcystin inhibiert. Dies schränkt die möglichen Proteinphosphatasen auf die Familien PP2C und PP7 ein. Da sich die Mitglieder der PP7 Familie eher in hematopoetischen

Zellen finden (Adachi 1992, Zanke 1992, Levy-Nissenbaum 2003) sind diese, aufgrund der für den GC-A-Rezeptor relevanten Zielgewebe wie Herz oder Niere, zurzeit nicht in der Evaluierung. Die zweite Gruppe kann wiederum durch Microcystin inhibiert werden, benötigt aber keinen metallischen Kofaktor für ihre Aktivität. Aufgrund dieser Kriterien könnten die Proteinphosphatasen PP1, PP2A, PP4, PP5 oder PP6 mögliche Verursacher der Dephosphorylierung sein (Sheppeck 1997, Herzig 2000).

Durch eine Vielzahl von Studien konnte zumindest in vitro die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Aktivität des GC-A-Rezeptors durch chronische Inkubation mit dem Liganden ANP, nachfolgend zu Dephosphorylierung des Rezeptors führt. Die Stimulation dieser ANP-vorbehandelten Zellen führte zu einer signifikanten Reduzierung des intrazellulär gebildeten cGMP (Potter 1992, Koller 1993, Joubert 2001). Auch konnte in vitro gezeigt werden, dass die Inkubation des GC-A-Rezeptors mit der Proteinphosphatase PP2A zu Dephosphorylierung und Desensibilisierung führt (Potter 1992).

Der Prozess der Aktivierung und Desensibilisierung ist nachfolgend in Abbildung 3 dargestellt (Potter 2006). Innerhalb dieser schematischen Abbildung ist auch ein Übergang von desensibilisiert zu basal dargestellt. Über den genauen Prozess durch den der dephosphorylierte und somit inaktive Rezeptor wieder durch seinen Liganden aktivierbar wird, ist bis dato noch völlig unklar. Da wie zuvor beschrieben möglicherweise beteiligte Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen (in Abbildung 3 mit *Kinase* oder *P-tase* bezeichnet) noch unbekannt sind, haben die Autoren diese nur unspezifisch angegeben.

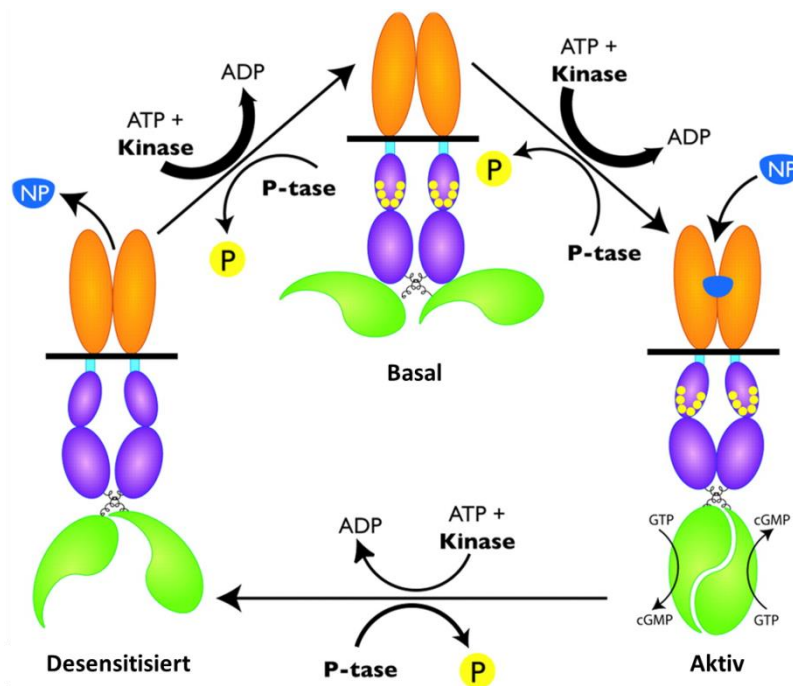


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung und Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors (Potter 2006)

Die Erkenntnis über die Phosphorylierung und seine Bedeutung für die Aktivität des GC-A-Rezeptors geht zurück auf die Arbeit an metabolisch mit [^{32}P]Orthophosphat markierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation der Aminosäuren Ser₄₉₇, Thr₅₀₀, Ser₅₀₂, Ser₅₀₆, Ser₅₁₀ und Thr₅₁₃ zu Alanin, wodurch der dephosphorylierte Status simuliert wird, zum Verlust der Aktivierbarkeit des GC-A-Rezeptors durch seinen Liganden ANP führt. In weiteren Versuchen wurden diese sechs Aminosäuren durch Glutaminsäure ersetzt, wodurch die negative Ladung einer Phosphorylierung simuliert wurde. Diese Rezeptorvariante zeigte in etwa 20 % der Aktivierbarkeit des Wildtyprezeptors, konnte aber weder durch ANP noch Microcystin desensibilisiert werden (Potter 1998, Potter 1999 A).

Die Rolle von ATP und dessen Interaktion mit dem GC-A-Rezeptor im Aktivierungsprozess wurde in den vergangenen Jahren recht unterschiedlich beschrieben. Bekannt war, dass ATP die Aktivität der GC-A erhöht (Kurose 1987), der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch nicht

vollständig geklärt. Es wurde vermutet, dass ATP im Rahmen des Aktivierungsprozesses intrazellulär an eine Position innerhalb der kinasehomologen Domäne bindet (Duda 2011). Diese Bindung und damit verbundene Mechanismen erklärten aber nicht alle beobachteten Kinetiken und Reaktionen des GC-A-Rezeptors. Ein neues Aktivierungsmodell brachte ursprünglich unvereinbare Erkenntnisse unterschiedlicher Experimenten überein (Robinson 2012). Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen, dass es sich bei den Zyklasedomänen um asymmetrische Homodimere handelt. Diese verfügen über ausgeprägte und wechselseitig geregelte katalytische und allosterische Zentren die sowohl GTP als auch ATP binden. Aus ihren Beobachtungen haben die Autoren den in Abbildung 4 dargestellte Mechanismus erarbeitet der die Funktion und Bedeutung von ATP im Aktivierungsprozess unterstreicht (Robinson 2012).

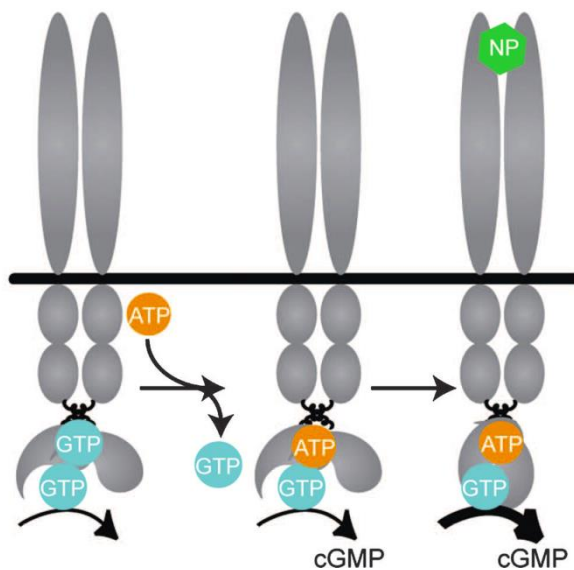


Abbildung 4: Bedeutung von ATP für die Aktivierung von GC-A (Robinson 2012). Schematische Darstellung des Aktivierungsmodells für den GC-A-Rezeptor. ATP bindet an ein allosterisches Zentrum innerhalb der katalytischen Domäne. Durch die extrazelluläre Bindung von natriuretischen Peptiden (NP) ändert sich die Konformation und die katalytischen Domänen nähern sich an. Dabei wird ein einzelnes aktives Zentrum gebildet.

1.4.2 Inhibition der GC-A Rezeptoraktivität

Wachstumsfaktoren sowie Hormone mit vasokonstriktorisches Eigenschaften oder der Fähigkeit das Wachstum oder die Proliferation von Zellen zu stimulieren wirken den Effekten natriuretischer Peptide entgegen. Exemplarisch seien an dieser Stelle Angiotensin II, Vasopressin oder Endothelin genannt (Haneda 1991, Jaiswal 1992, Abbey 2002). Diese und weitere Hormone aktivieren die Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) hydrolytisch in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Schmidt 2007). Versuche an kultivierten Zellen belegen, dass die Aktivierung der PKC durch Phorbol-12-myristat-13-acetate (PMA) zur Dephosphorylierung und Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors führt. Die Verwendung von spezifischen Blockern für die PKC (hier: GF-109203X) konnten die durch PMA induzierte Dephosphorylierung und Desensibilisierung verhindern. Das spezifische Isozym der PKC das für diesen Effekt verantwortlich ist, wurde bisher noch nicht identifiziert. In vitro wurde die Veränderung des Phosphorylierungsmusters des GC-A Rezeptors untersucht. Der Rezeptor wurde hierzu mit dem Liganden ANP inkubiert, mit Trypsin verdaut und die tryptischen Peptide untersucht. Interessanterweise weicht dieses Phosphorylierungsmuster von dem ab, das durch die direkte Aktivierung der PKC mit PMA erzeugt wird (Potter 1994, Potter 2000).

1.4.3 Ergebnisse zur Internalisierung des GC-A-Rezeptors

In der Literatur dokumentierte Beobachtungen an membranständigen Rezeptoren zeigen, dass diese Rezeptoren nach Aktivierung mit ihrem Liganden internalisieren und degradiert werden. Dieser Mechanismus dient dazu die Signaltransduktion von der Zelloberfläche zu beenden (Jalink 2010). Entsprechend wurde von einigen Gruppen untersucht, ob der GC-A-Rezeptor internalisiert und dieser Mechanismus eine weitere Erklärung für

die reduzierte intrazelluläre cGMP-Antwort auf extrazellulär appliziertes ANP darstellen kann. Die hierzu durchgeführten Studien an Zelllinien unterschiedlichster Spezies und Gewebe lieferten in der Vergangenheit abweichende Ergebnisse. So deuten die Versuche einiger Gruppen darauf hin, dass der GC-A-Rezeptor nach Bindung von ANP internalisiert. Dabei lautet ein Ergebnis, dass der internalisierte Rezeptor wieder an die Zellmembran zurückgeführt wird (Rathinavelu 1991). Andere Gruppen zeigten ebenfalls eine Internalisierung durch ANP-Bindung, ermittelten aber eine Degradierung des Proteins. In den Experimenten konnten nur eine geringe Menge an zurückgeführtem Rezeptor nachgewiesen werden (Pandey 1986, Pandey 1992, Pandey 1993, Pandey 2000). Wieder andere Gruppen konnten keine Anzeichen für eine ANP-stimulierte Internalisierung des GC-A-Rezeptors finden (Koh 1992, Jewett 1993, Vieira 2001, Fan 2005). Legt man die 2013 erschiene Arbeit von Somanna und Kollegen zugrunde, gibt es, anhand der Ergebnisse an transfizierten HEK 293-Zellen, die Erkenntnis, dass der GC-A-Rezeptor zusammen mit dem gundenen Liganden ANP internalisiert (Somanna 2013).

1.5 Physiologische Bedeutung des ANP/GC-A-Signalwegs

Durch die Aktivierung des GC-A-Rezeptors können je nach Zielorgan bzw. Zielgewebe eine Vielzahl physiologischer Effekte ausgelöst werden (Potter 2006):

- Inhibition des Renin-Aldosteron-Systems (RAS) (Nebenniere),
- Entspannung glatter Muskelzellen (periphere Gefäße und Lunge),
- Unterdrückung von Durst und sympathischer Aktivität (Gehirn)
- Inhibition kardialer Hypertrophie und Fibrose (Herz).

Ausgelöst werden diese Effekte durch Bindung des Liganden ANP an den GC-A-Rezeptor wodurch es zur intrazellulären Bildung von cGMP kommt. Der sekundäre Botenstoff kann weitere Proteinfamilien aktivieren oder inhibieren (Tsai 2009, vgl. Abbildung 5 modifizierte nach Tsai 2009).

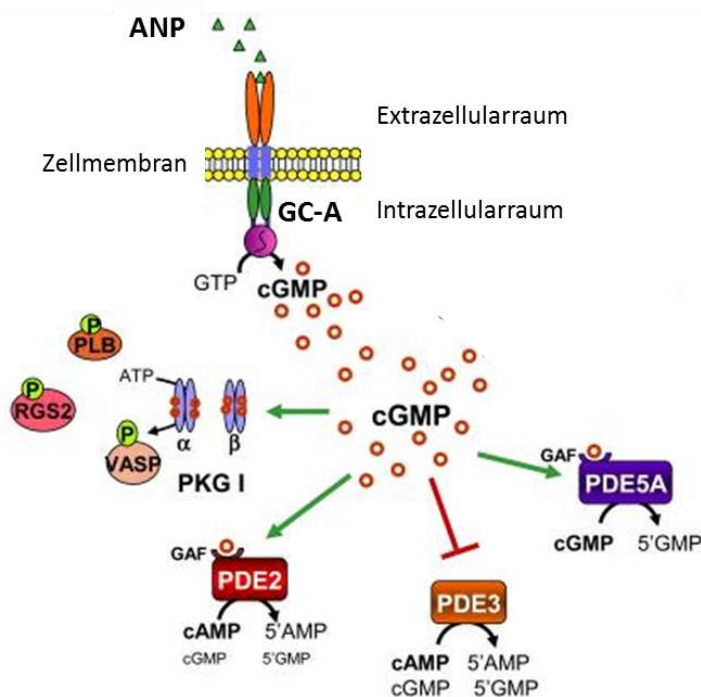


Abbildung 5: ANP-GC-A-cGMP-Signalkaskade (modifiziert nach Tsai 2009). Das nach ANP-induzierter Stimulation des GC-A-Rezeptors intrazellulär gebildete cGMP kann cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG I und II) sowie Phosphodiesterasen (PDE) aktivieren bzw. inhibieren. Durch Aktivierung der PKG I werden Proteine wie Phospholamban (PLB), Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP) oder Regulator of G-Protein Signaling 2 (RGS2) phosphoryliert.

1.6 Bedeutung des ANP/GC-A-Signalwegs für das Herz

Bei beginnender Hypertonie oder Herzinsuffizienz steigt die Expression der natriuretischen Peptide ANP und BNP im Herzen an und sorgt für eine Erhöhung der Konzentration im Plasma (Cody 1986). Zahlreiche Studien und klinische Praxis belegen, dass der Bestimmung dieser Werte diagnostische (Ambrosi 2002, Maisel 2002, Vasan 2002) wie auch prognostische Bedeutung zukommt (Richards 1999, Berger 2002, Chen 2006, Schou 2007). Die erhöhte kardiale Expression und Freisetzung der natriuretischen Peptide ANP und BNP als Reaktion auf die erhöhte Volumenbelastung und den damit verbundenen erhöhten Fülldruck, wirkt nicht nur endokrin. Insbesondere wirkt ANP auch lokal antihypertroph, wohingegen BNP antifibrotische Wirkung entfaltet (Kuhn 2003). Mäuse mit

einer globalen Deletion des GC-A-Rezeptors (Npr1 $-/-$ bzw. GC-A KO) weisen einen erhöhten arteriellen Blutdruck und Herzhypertrophie auf. Die Behandlung der Tiere mit einem ACE-Hemmer wie Enalapril normalisierten den arteriellen Blutdruck auf das Niveau der Kontrolltiere (wt), hatte aber keinen Einfluss auf das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht das in den GC-A KO Tieren stark erhöht war. Gleiches gilt für die Anwendung von Diuretika (hier: Furosemid), Vasodilatoren (hier: Hydralazin) oder Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten (hier: Losartan) (Knowles 2001). Mäuse mit einer konditionalen kardiomyozytenspezifischen Deletion des GC-A-Rezeptors (CM GC-A KO) hingegen entwickeln eine leichte Herzhypertrophie einhergehend mit einer erhöhten Expression von mRNA für ANP (5-fach), das Strukturprotein alpha-Aktin 1 (ACTA1) (1,7-fach) und β -MHC (2-fach). Ferner wurden bei diesen Tieren erhöhte Konzentrationen von ANP im Plasma ermittelt. Interessanterweise wiesen die Tiere einen, im Vergleich zu den Kontrolltieren, etwas niedrigeren Blutdruck auf was möglicherweise mit den erhöhten Mengen im Plasma befindlichen ANPs zusammenhängt (Holtwick 2003). Wie auch bei den GC-A KO Tieren zeigte sich, dass die mittels transverser Aorten-Konstriktion (TAC) induzierte linksventrikuläre Hypertrophie einen deutlich schwereren Verlauf nimmt als bei Kontrolltieren. Die Herzen von Mäusen mit einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression des GC-A-Rezeptors sind etwas kleiner (Herzhypotrophie) als die der nicht transgenen Geschwister und wiesen in den Ventrikeln, sowohl auf Protein- als auch mRNA-Level, geringere Mengen an ANP auf (Kishimoto 2001). In vitro Experimente an kultivierten Kardiomyozyten und Fibroblasten belegen, dass ANP das Wachstum und Proliferation dieser Zellen unterdrückt (Cao 1995, Calderone 1998).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz und protektiven Effekte des ANP/GC-A-Systems für das Herz. Interessanterweise können, wie zuvor beschrieben, bei Patienten mit arterieller Hypertonie oder der später

auftretenden Komplikation der Herzinsuffizienz im Plasma erhöhte Konzentrationen an ANP und BNP detektiert werden. Jedoch scheinen die protektiven Effekte vermindert zu sein. Massenspektrometrische Analysen zeigen, dass Patienten mit Herzinsuffizienz erhöhte Plasmakonzentrationen von proANP und proBNP aufweisen. Jedoch ist die Konzentration der biologisch aktiven Peptide vermindert. Dies lässt vermuten, dass die Prozessierung von proANP und proBNP zu den aktiven Hormonen eingeschränkt ist (Miller 2011).

Analysen an humanen Gewebeproben zeigten bei bestimmten kardialen Erkrankungen eine, im Vergleich zu gesunden Individuen, unveränderte mRNA-Expression für den GC-A-Rezeptor. Die mRNA Expression für ANP war bei Patienten mit kardialen Erkrankungen deutlich erhöht. Die Stimulierbarkeit des GC-A-Rezeptors mit dem Liganden ANP war im Vergleich zu den gesunden Individuen jedoch deutlich vermindert (Kuhn 2004, Dickey 2012). Bei Herzinsuffizienz handelt es sich somit um eine Erkrankung mit einem abgeschwächten bzw. defekten ANP/BNP-GC-A-System.

Wie zuvor beschrieben hängt die Aktivierbarkeit des GC-A-Rezeptors von der Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threoninresten ab (Potter 1992, Potter 1994, Potter 2000). Diese Phosphorylierungsstellen des GC-A-Rezeptors wurden durch Arbeiten in der AG Kuhn massenspektrometrisch ermittelt und deren Häufigkeit bestimmt. Insgesamt konnten die sechs bereits postulierten Phosphorylierungsstellen innerhalb der kinasehomologen Domäne des Rezeptors (Potter 1999 B), sowie eine weitere an Ser₄₈₇ nachgewiesen werden. Die homologe Desensibilisierung des Rezeptors mit dem Liganden ANP führte interessanterweise zu einer Abnahme der Phosphorylierung an den Aminosäuren Ser₄₉₇, Thr₅₀₀, Ser₅₀₂, Ser₅₀₆, Ser₅₁₀ und Thr₅₁₃ sowie zu einer Zunahme der Phosphorylierung der Aminosäure Ser₄₈₇ (Schröter 2010). Dies könnte ein Hinweis auf komplexe posttranslationale Modifikationen sein, die für die verminderte

Aktivierbarkeit des Rezeptors unter pathophysiologischen Bedingungen verantwortlich ist. Die Schutzfunktion die das ANP-GC-A-System möglicherweise initial ausübt, könnte mit fortschreitender Erkrankung seine Wirkung verlieren.

1.7 Motivation und Zielsetzung der Arbeit

Die Guanylatzyklase A (GC-A) ist der Rezeptor für die Peptide ANP und BNP. Durch die Bindung der Peptide an die extrazelluläre Domäne wird die intrazelluläre katalytische Domäne des Rezeptors aktiviert und führt zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration (Chinkers 1991). Kardial sezerniertes ANP vermittelt über diesen Signalweg parakrine antihypertrophe und antifibrotische Effekte. Darüber hinaus wirkt ANP endokrin hypotensiv, beispielsweise über die renale Ausscheidung von Natrium und Wasser (Pandey 2011).

Die Plasmakonzentration von ANP ist unter pathophysiologischen Bedingungen wie Herzinsuffizienz signifikant erhöht und korreliert dabei stärker mit dem atrialen Volumen als mit dem atrialen Druck (Globits 1998). Ebenso weisen Patienten mit Herzinsuffizienz erhöhte Plasmakonzentrationen von BNP auf (Maisel 2002). Die physiologischen Effekte der beiden Hormone sind jedoch stark abgeschwächt. Die Suche nach dem Zusammenhang, warum trotz erhöhter Konzentration der Liganden ANP und BNP der GC-A-Rezeptor die protektiven Effekte nicht vermitteln kann, hat in diesem Kontext höchste Relevanz. Arbeiten an HEK 293-Zellen, die den GC-A-Rezeptor durch Transfektion überexprimieren, zeigen, dass dieser Rezeptor über Phosphorylierungsstellen verfügt, die für die Aktivität essentiell sind (Potter 1998, Schröter 2010). Hohe ANP-Konzentrationen führen zu Dephosphorylierung und somit homologen Desensitisierung der GC-A (Potter 1992). Da bei kardiovaskulären Erkrankungen erhöhte Konzentrationen der Liganden ANP und BNP gemessen werden, könnte die in vitro beobachtete Dephosphorylierung eine Erklärung für die verminderte Aktivität der GC-A in vivo sein. Allerdings können auch heterologe Mechanismen für die Desensitisierung der GC-A verantwortlich sein. In vitro Versuche an NIH3T3-Zellen, die den GC-A-Rezeptor stabil exprimieren, zeigen, dass diese Zellen durch die

Vorbehandlung mit der Substanz Phorbol-12-myristat-13-acetate (PMA), einem Aktivator der Proteinkinase C, ebenfalls eine reduzierte Aktivierbarkeit des GC-A Rezeptors aufweisen (Potter 1994). Somit scheint es möglich, dass die GC-A auch mit anderen Proteinen interagiert und diese regulierend auf den Rezeptor wirken. Die Charakterisierung dieser inaktivierenden posttranslationalen Modifikationen des GC-A-Rezeptors, sowie möglicher Interaktionspartner waren die Ziele dieser Dissertationsarbeit.

Der erste Teil dieser DiSSERTATIONSARBEIT beschäftigt sich mit der Charakterisierung einer Isoform des GC-A-Rezeptors, die durch alternatives Spleißen des Exons 4 entsteht. Dieses alternative Spleißen führt zu einer, im Vergleich zum Wildtyp, um 51 Basenpaare kürzere mRNA. Durch Translation dieser mRNA entsteht eine Isoform der GC-A, der 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne fehlen ($\Delta\text{Lys}_{314} - \text{Gln}_{330}$). Mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde hier gezeigt, dass diese Isoform des GC-A-Rezeptors ($\text{GC-A}_{\Delta\text{Lys}^{314} - \text{Gln}^{330}}$) in einer Vielzahl ganz unterschiedlicher Gewebe (u.a. Aorta, Herz, Lunge und Niere) der Maus vorkommt (vgl. Abbildung 49, Seite 133). Verglichen mit der mRNA des wildtypischen GC-A-Rezeptors war der mRNA-Anteil dieser Isoform in keinem der Gewebe höher als 10 % (Hartmann 2008). Aufgrund des ubiquitären Auftretens von $\text{GC-A}_{\Delta\text{Lys}^{314} - \text{Gln}^{330}}$ erschien es uns wichtig die Funktion dieser Isoform zu untersuchen. Hierzu wurden ANP-Stimulationsexperimente durchgeführt und die Bildung von intrazellulärem cGMP im cGMP-Radioimmunassay (cGMP-RIA) quantifiziert. Die cGMP-Bildungskinetik wurde mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimenten, im Vergleich zum wildtypischen GC-A-Rezeptor, analysiert. Um die Interaktion mit der wildtypischen FLAG-getaggten GC-A zu untersuchen, wurde in das Plasmid für die Expression der GC-A Isoform die kodierende Sequenz für ein HA-tag eingefügt und Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Um die potentielle

biologische Funktion der Isoform bei der Inaktivierung der GC-A unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Mäuse mit Angiotensin II behandelt. Die Menge an mRNA für GC-A wildtyp und die Isoform der GC-A wurde mittels quantitativer Real-Time RT-PCR quantifiziert.

Um posttranslationale Modifikationen zu charakterisieren sowie mögliche Interaktionspartner der GC-A in vitro und in vivo im Herzen zu identifizieren, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit zunächst ein Plasmid für die Expression einer GC-A generiert, die neben dem bereits vorhandenen FLAG-Epitop (Wong 1995, Schröter 2010), zusätzlich über ein HA-tag sowie eine Erkennungssequenz für die Protease des Tobacco Etch Virus (TEV) verfügt. Nach Prüfung der Funktionsfähigkeit dieser FLAG-HA-TEV-GC-A durch Western Blot Analysen und ANP-Stimulationsversuche, wurden, basierend auf dieser cDNA sowie der cDNA für eine FLAG-GC-A, transgene Mauslinien mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression der FLAG-HA-TEV-GC-A bzw. der FLAG-GC-A generiert. Nach erfolgreicher Zucht der beiden Mauslinien wurde die Überexpression der GC-A innerhalb der jeweiligen Kolonie analysiert und eine Methode zur Aufreinigung und Anreicherung der Epitop-getaggten GC-A aus adulten Kardiomyozyten über das HA-Epitop etabliert. Unter Angiotensin II induzierter Hypertonie wurde anschließend der Einfluss dieser Überexpression unter pathophysiologischen Bedingungen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Für die Versuche wurden vornehmlich Chemikalien und Reagenzien der Firmen Merck (Darmstadt) sowie Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) verwendet. Die in der Arbeit angegebenen Restriktionsenzyme, Ligasen sowie zugehörige Puffer (10-fach) und BSA (10-fach) wurden von NewEngland BioLabs (Frankfurt am Main) bezogen. Für PCR-Reaktionen wurden Taq DNA-Polymerase, 10-fach Reaktionspuffer und $MgCl_2$ (50 mM) von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Ergänzend hierzu wurden die folgenden Chemikalien und Reagenzien sowie Kits verwendet:

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Produkt/Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Firmensitz
^{125}I -cGMP	Immundiagnostik AG	Bensheim
DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	NEB	Frankfurt am Main
Acrylamid/N,N'Methylen-bisacrylamid Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Roth	Karlsruhe
AcTEV [™] Protease	Invitrogen	Karlsruhe
Agarose	BioSell	Feucht bei Nürnberg
Angiotensin II	Bachem	Bubendorf, Schweiz
ANP (1-28, Ratte)	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Avidin-Agarose	Perbio Science	Bonn
Bacto [™] -Tryptone	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Biotin (NHS-LC-Biotin)	Perbio Science	Bonn
BSA	GERBU Biotechnik	Heidelberg
CF-Cyt Puffer	nanoTools	Teningen

Produkt/Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Firmensitz
CF-NE-Puffer	nanoTools	Teningen
cOmplete Mini, Proteaseinhibitor	Roche Diagnostic	Mannheim
DMEM	Biochrom	Berlin
DMEM-Ham's	Biochrom	Berlin
EGTA	Roth	Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH	Cölbe
FuGENE [®] 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostic	Mannheim
HEPES	Biochrom	Berlin
ANTI-FLAG [®] M2 affinity gel	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen
Magermilch	Roth	Karlsruhe
Natriumpyruvat	Biochrom	Berlin
NucleoBond [®] Xtra Midi	Macherey-Nagel	Düren
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	Düren
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel	Düren
One Shot [®] TOP10 chemisch kompetente Bakterien	Invitrogen	Karlsruhe
PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Mbi Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Phenol	Roth	Karlsruhe
PhosSTOP, Phosphataseinhibitor	Roche Diagnostic	Mannheim
Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	Dreieich
Protein A Agarose	Roche Diagnostic	Mannheim
Q-Solution (5-fach)	QIAGEN	Hilden
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
TRIZOL [®] RNA Isolation Reagent	Life Technologies GmbH	Darmstadt

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte

Produkt/Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Firmensitz
Axiovert 200M Mikroskop mit 63x Öl-Immersion-Plan-Neofluar Objektiv	Carl Zeiss Microscopy	Jena
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments	Hanau
Echokardiographiegerät Aplio mit offline Analysesystem NICE	Toshiba	Niederlande
Elektrophoresekammer	Werkstatt d. Physiologie	Würzburg
Feinwaage (TE214S)	Sartorius	Göttingen
FluorChem SP Chemilumineszenz Detektions-System	Alpha Innotech Corporation/ ProteinSimple	Santa Clara, USA
Gelkammer für Elektrophorese	Werkstatt d. Physiologie	Würzburg
HERAcell [®] CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments	Hanau
Mikro-Dismembrator S	Sartorius	Göttingen
Multifuge 1S-R	Heraeus Instruments	Hanau
Nicht invasive Blutdruckmessung (Softron Indirect Blood Pressure Meter BP-98 A)	Softron Co. Ltd.	Tokyo, Japan
Semi-Dry Transferkammer Whatman	Biometra	Göttingen
Gel Logic 100 Imaging System	Kodak	Rochester, USA
Sonoplus Ultraschalllanze	Bandelin electronics	Berlin
Spannungsquelle E802	Consort nv	Turnhout, Belgien
Spectrophotometer SmartSpec [™] 3000	Biorad	München
SpeedVac Concentrator	BACHOFER	Reutlingen
Swing Out Rotor TTH400	Heraeus Instruments	Hanau
Thermocycler	Biometra	Göttingen

Produkt/Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Firmensitz
Tischwaage	Sartorius	Göttingen
Viktor ² 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer life sciences	Waltham USA
Wärmeplatte für Blutdruckmessung (THC-31)	Softron Co. Ltd.	Tokyo, Japan
γ-Counter	Berthold Technologies	Bad Wildbad

2.1.3 Plasmide

2.1.3.1 Vorhandene Plasmide

Tabelle 3: Liste der im Rahmen der Arbeit verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
<i>pCDNA3</i>	Expressionsvektor für HEK 293-Zellen der im Rahmen von Kontrollen „mock“ transfiziert wurde	AG Kuhn, Physiologisches Institut, Universität Würzburg
<i>pCR[®]2.1-TOPO[®]</i>	Linearisierter Vektor mit einzelnen Deoxythymidin (T) Überhängen am 3'-Ende (kommerziell verfügbar)	TOPO [®] TA Cloning [®] Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>pFLAG-GC-A</i>	cDNA eines FLAG-Epitop getaggten GC-A-Rezeptors (Spezies: Ratte) mit <i>pCMV5</i> -Rückgrat (Ampicillinresistenz)	Dr. Michael Chinkers (Department of Pharmacology, University of South Alabama, USA) (Chinkers 1992)
<i>pGC-AΔ_{Lys³¹⁴-Gln³³⁰}</i>	Plasmid zur Expression einer Isoform der GC-A der 17 AS in der extrazellulären Domäne fehlen mit <i>pCMV3</i> -Rückgrat (Hartmann 2008)	AG Kuhn, Physiologisches Institut, Universität Würzburg
<i>pGC-A wt</i>	cDNA des wildtyp GC-A-Rezeptors (Ratte) mit <i>pCMV3.0</i> -Rückgrat (Ampicillinresistenz)	Dr. Ruey-Bing Yang (Academia Sinica, Taipei, Taiwan)

Bezeichnung	Information	Quelle
<i>pGES-DE2</i>	Plasmid zur Expression eines FRET- basierten Sensors für cGMP zur Messung intrazellulärer cGMP- Bildungskinetik in HEK 293- Zellen (Nikolaev 2006)	Dr. Viacheslav Nikolaev, Institut f. Pharmakologie, Universität Würzburg
<i>pαMHC</i>	Alpha Myosin Heavy Chain Promoter mit <i>pBS II SK (+)</i> - Rückgrat (clone 26) (Ampicillinresistenz) (Gulick 1991; Engelhardt 1999)	Prof. Dr. Stefan Engelhardt, Inst. f. Pharmakologie, Universität Würzburg

2.1.3.2 Generierte Plasmide

Die in Tabelle 4 genannten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert.

Tabelle 4: Übersicht der im Rahmen der Arbeit generierten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Quell- konstrukt(e)
<i>pFLAG-HA-GC-A</i>	cDNA eines FLAG-HA-Epitop getaggten GC-A-Rezeptors (Ratte) mit <i>pCMV5</i> -Rückgrat (Ampicillinresistenz) als Zwischenprodukt	<i>pFLAG-GC-A</i>
<i>pFLAG-HA-TEV-GC-A</i>	cDNA eines FLAG-HA-TEV-Epitop getaggten GC-A-Rezeptors (Ratte) mit <i>pCMV5</i> -Rückgrat (Ampicillinresistenz), die N-terminalen Epitope können über eine TEV-Erkennungssequenz abgespalten werden	<i>pFLAG-HA-GC-A</i>
<i>pHA-GC-A_{ΔLys³¹⁴-Gln³³⁰}</i>	Plasmid zur Expression einer HA-getaggten Isoform der GC-A (Hartmann 2008)	<i>pGC-A_{ΔLys³¹⁴-Gln³³⁰}</i>
<i>pαMHC-FLAG-GC-A</i>	Plasmid mit der FLAG-GC-A unter dem αMHC-Promoter, <i>pBS II SK(+)</i> - Rückgrat wird durch NotI-Restriktionsenzym vor Injektion abgespalten	<i>pFLAG-GC-A</i> , <i>pαMHC</i>
<i>pαMHC-FLAG-HA-TEV-GC-A</i>	Plasmid mit der FLAG-HA-TEV-GC-A unter dem αMHC-Promoter, <i>pBS II SK(+)</i> -Rückgrat wird durch NotI-Restriktionsenzym vor Injektion abgespalten	<i>pFLAG-HA-TEV-GC-A</i> , <i>pαMHC</i>

2.1.4 Oligonukleotide und Sequenzierung

Tabelle 5: Liste verwendeter Primer für die PCR-Ansätze

Name	Sequenz	Verwendung
Sall-GC-A forward	cgg tcg acc atg ccg ggc tcc cga cg	Generierung von Sall-Schnittstellen
Sall-GC-A reverse	cgg tcg act cag cct cga gtg cta cat c	Generierung von Sall-Schnittstellen
TEV rev	gac tgg aag tac agg ttc tcg cca ccc gcg tag tct ggg acg	Generierung der TEV-site für FLAG-HA-TEV-GC-A
TEV fwd	gag acc ctg tac ttc cag tct agc gac ctg acc gtg gc	Generierung der TEV-site für FLAG-HA-TEV-GC-A
FLAG Mut-f 23807	taa cca tac gac gtc cca gac tac gcg agc gac ctg acc gtg	Generierung der HA-site für FLAG-HA-GC-A
FLAG-Mut-r 23807	ggg acg tcg tat ggg taa cca ccc ttg tcg tca tcg tct ttg	Generierung der HA-site für FLAG-HA-GC-A
pCMV5-fwd	tct ggt acc ggc ccc ccc tga gag g	Forwardprimer für die Generierung der HA- und TEV-site
FLAG-GC-A rev	gcc agt gcg cgg tga ag	Reverseprimer für die Generierung der HA- und TEV-site
rGC-A fwd1145	tgc tct atg tcc agg cag tg	Sonde Southern Blot fwd
rGC-A rev2625	ctg gta aag caa ggc ctc ag	Sonde Southern Blot rev
aMyHC fwd200308	aga gtt tga gtc gac cat gc	Genotypisierung transgener Tiere (fwd)
FLAG rev230807	gcc agt gcg cgg tga ag	Genotypisierung transgener Tiere (rev)
splice Mut-r1128	ctg gga cgt cgt atg ggt acg cgt ggc cgc ccc gga gta gc	Generierung der HA-site für GC- $\Delta_{Lys}^{314} -Gln^{330}$

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG GmbH in Ebersberg (MWG) bezogen. Sequenzierungen wurden ebenfalls bei MWG in Auftrag gegeben. Die hierfür erforderliche DNA-Menge wurde für den Transport im Vakuum getrocknet und bei Raumtemperatur versendet. Sofern keine Standardprimer verwendet werden konnten, wurden spezifische Oligonukleotide zur Sequenzierung entworfen und an MWG übermittelt.

2.1.5 Zelllinien und Kulturbedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) der Firma ATCC (Manassas, USA) verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter, fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre (v/v), unter Verwendung von DMEM-Ham's F12 (+ 10 % FCS) kultiviert.

2.2 Versuchstiere

Für die Generierung von transgenen Mäusen wurde der Stamm FVB/N verwendet, da sich dieser sehr gut für transgene Experimente eignet. Diese Tiere zeichnen sich dabei durch hohe Reproduktionsraten und gleichbleibend große Würfe aus. Die pronukleäre Injektion wird für diesen Mausstamm aufgrund der großen und deutlich sichtbaren Pronuclei befruchteter Eier als einfach beschrieben (Taketo 1991). Die pronukleäre Injektion wurde gemäß Protokoll (Hogan 1986) von Dr. Boris Skryabin im Institut für Experimentelle Pathologie der Universität Münster durchgeführt (Khanam 2007). Im Rahmen der Versuchsreihen wurden auch Mäuse mit einer globalen Deletion der GC-A (GC-A KO) der AG Kuhn als Negativkontrolle verwendet (Lopez 1995).

2.2.1 Versuchstierhaltung

Die transgenen Tierlinien wurden durch die Verpaarung von transgenen Foundern mit FVB/N wt (Quelle der Tiere: ZEMM der Universität Würzburg) im Tierstall des Instituts für Physiologie der Universität Würzburg (AG Kuhn) gehalten. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 21 °C bis 23 °C in Standardkäfigen gehalten. Freier Zugang zu Wasser und Standardnahrung wurde jederzeit sichergestellt. Nachkommen wurden 19 Tage bis 23 Tage nach Geburt von der Mutter entwöhnt. Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-2531.01-72/09).

2.3 Bakterientransformation und Isolierung von Plasmiden

2.3.1 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurden One Shot[®]TOP10 chemisch kompetente E. coli Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Gemäß Vorgabe des Herstellers wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Das DNA-Bakterien-Gemisch wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in einem Thermomixer für 45 s bei 42 °C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde kurz auf Eis abgekühlt und mit 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium (vgl. Tabelle 6) für 45 min bis 60 min bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des SOC-Mediums

Komponente	Konzentration
Glukose	20,0 mM
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	20,0 mM
NaCl	10,0 mM
Tryptone	2,0 % (w/v)

Es wurden jeweils 10 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausplattiert. Der Rest der Bakteriensuspension wurde mit Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert. Je nach Resistenz wurden zur Selektion der Bakterien Agarplatten (1,5 % Agar in LB-Medium, vgl. Tabelle 7) verwendet, die mit 0,36 µg/ml Ampicillin versetzt waren. Im Rahmen von DNA-Modifizierungen wurden häufig Ligationsansätze (vgl. bspw. 2.5.1.4, Seite 37) zur Transformation verwendet. Aufgrund der zu erwartenden geringen Ausbeute an transformierten Bakterien wurde stets der gesamte Ligationsansatz ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des LB-Mediums (pH 7,0)

Komponente	Menge
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Aqua bidest	ad 1 l

2.3.2 Plasmidisolierung (Mini- und Midi-Präparation)

Für die Mini-Präparation von Plasmiden wurde eine einzelne Bakterienkolonie von der Agarplatte gepickt und in 5 ml LB-Medium, mit 1,8 µg Antibiotikum (z.B. Ampicillin) über Nacht, bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Alternativ wurde anstelle der gepickten Kolonie etwas Material aus dem Kryostock verwendet. Die Präparation der jeweiligen DNA erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel gemäß Anleitung des Herstellers.

Für Midi-Präparationen wurde zunächst ein 5 ml-Ansatz vorbereitet und für 8 h inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend in 200 ml LB-Medium mit 72 µg Antibiotikum überführt. Das Wachstum der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln. Die Präparation der DNA erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit der Firma Macherey-Nagel gemäß Anleitung des Herstellers.

2.3.3 Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)

Für die Generierung der transgenen Mäuse mittels pronukleärer Injektion wurde eine Maxi-Präparation der jeweiligen DNA angefertigt. Aus einem positiv getesteten und sequenzierten Klon wurde eine 5 ml Vorkultur angelegt und nach 8 h in 500 ml LB-Medium überführt. Zur Bestimmung einer ausreichenden Anzahl an Bakterien in der Suspension wurde die optische Dichte des Mediums nach 12 h am Spektrophotometer bei 600 nm gemessene (OD_{600}). Bei Erreichen eines Wertes von etwa 2 ($OD_{600} \approx 2$) wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5.000 g x 20 min, 4 °C)

pelletiert. Für die Isolation und Aufreinigung des Plasmids zur Verwendung für die Mikroinjektion in Oozyten und daraus resultierender Generierung von transgenen Tieren (vgl. 2.14.6, Seite 61), wurde die Präparation gemäß dem von Dr. Boris Skryabin (Institut für Experimentelle Pathophysiologie, Universität Münster) übermittelten Protokoll durchgeführt. Hierzu wurden die in Tabelle 8 genannten Lösungen verwendet.

Tabelle 8: Lösungen für die Plasmidpräparation (Maxi-Präparation)

Bezeichnung	Komponente	Menge
Lösung I, (autoklaviert, Lagerung bei 4 °C)	NaCl (5 M stock)	2,0 ml
	Tris-HCl (1 M stock, pH 8,0)	2,5 ml
	EDTA (0,5 M stock)	2,0 ml
	Aqua bidest	93,5 ml
	Lysozym (frisch zugegeben)	5,0 mg/ml
Lösung II, (vor Verwendung frisch angesetzt)	NaOH (10 N)	2,0 ml
	SDS (10 % stock)	10,0 ml
	Aqua bidest	88,0 ml
Lösung III (Lagerung bei -20 °C)	Kaliumacetat (5 M stock)	60,0 ml
	Essigsäure	11,5 ml
	Aqua bidest	28,5 ml

Zur Lyse der Bakterien wurde das Bakterienpellet zunächst in 10 ml Lösung I resuspendiert und nach Zugabe von 20 ml Lösung II für 10 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 15 ml eiskalter Lösung III und Inkubation auf Eis für 10 min wurde die bakterielle DNA sowie die Überreste der aufgebrochenen Bakterien pelletiert (5.000 g x 30 min, 4 °C) und der Überstand, in dem sich das Zielplasmid befindet, über einen Papierfilter in ein neues Plastikgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol (12 ml Isopropanol bei 20 ml vorhandenem Volumen) für 30 min bei RT präzipitiert und anschließend pelletiert (5.000 g x 30 min, RT). Zur Reinigung der DNA wurde das Pellet mit Ethanol (80 %) gewaschen, der Ethanol vollständig entfernt und das Pellet in 1,5 ml Wasser (RNAse- und DNase-frei) gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml Ammoniumacetat (10 M) und Inkubation auf Eis für 15 min wurde das

Gemisch zentrifugiert (5.000 g x 15 min, 4 °C) und der Überstand mit der DNA in ein neues Gefäß überführt. Eine kleine Probe des Überstandes wurde für die Analyse im DNA-Gel aserviert. Zum Rest wurden 5 ml Ethanol (-20 °C, 96 %) gegeben und das Gemisch über Nacht bei -20 °C gelagert. Die DNA wurde am Folgetag bei Raumtemperatur an Dr. Boris Skryabin (Institut für Experimentelle Pathologie, Universität Münster) zur Durchführung der pronukleären Injektion versendet.

Bei allen Präparationen wurde abschließend die Konzentration der DNA mittels Spektrophotometer (Absorption bei Wellenlänge 260 nm) bestimmt. Zur Überprüfung der Qualität der präparierten DNA wurde ein konstruktsspezifischer Restriktionsverdau angesetzt.

2.4 DNA-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente bspw. nach Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen oder PCR sichtbar zu machen, wurde ein DNA-Agarosegel hergestellt. Hierzu wurde 10 x TBE-Puffer (AfCS Solution Protocol PS00000079, Angela 2001) 1:10 verdünnt (entspricht 1 x TBE-Puffer) und unter Zugabe von Agarose (0,5 % bis 2 % (w/v)) aufgeköcht. Zu der TAE-Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid (0,5 mg/ml stock) im Verhältnis 1:1.000 hinzugegeben und diese Lösung in eine dafür vorgesehene Vorrichtung der Gelelektrophoresekammer gegossen. Durch den Einsatz entsprechender Käme wurden Beladetaschen für die erforderliche Probenmenge hergestellt (zwischen 20 µl und 50 µl). Während das Gel abkühlte und dabei polymerisierte wurden die Proben mit sechsfach Ladepuffer (AfCS Solution Protocol PS00000077, Angela 2002) versetzt und in das DNA-Agarosegel geladen. Als Größenstandard wurde die 2-Log DNA Ladder (0,1 kb – 10,0 kb) von NEB aufgetragen und eine Spannung von 80 V angelegt um die DNA/DNA-Fragmente in Richtung des Minuspols nach ihrer Größe aufzutrennen.

2.5 Modifizierung vorhandener Plasmide

Sowohl für den ersten als auch für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide mittels PCR modifiziert. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde an transfizierten HEK 293-Zellen die Interaktion des wildtypischen GC-A-Rezeptors mit der GC-A Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 überprüft. Um diese Isoform der GC-A im Rahmen von Koimmunpräzipitationsversuchen (Ko-IP) spezifisch nachweisen zu können, wurde in das vorhandene Plasmid *pGC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* die kodierende Sequenz für ein HA-tag eingefügt. Das HA-tag befindet sich im resultierenden Protein HA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 N-terminal, direkt hinter der Spaltstelle des Signalpeptids. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit verfolgte das Ziel posttranslationale Modifikationen der GC-A in vivo zu charakterisieren indem der Rezeptor aus murinem Gewebe isoliert und unter unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen analysiert werden sollte. Um die hierfür erforderliche Aufreinigung des Rezeptors zu optimieren und den Reinheitsgrad, insbesondere für die Proteomik, zu erhöhen ist die Verwendung von mehrfach getaggen Proteinen (Tandem-Epitop) ein anerkanntes Werkzeug (Zhang 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Tandem-Epitop-Strategie mit einem zusätzlichen HA-tag umgesetzt. In das Plasmid *pFLAG-GC-A* wurde hierfür, direkt hinter der kodierenden Sequenz für das FLAG-Epitop, die kodierende Sequenz für das HA-Epitop eingefügt. Um die Spezifität etablierter Elutionen (bisher: Verwendung von 3-fach FLAG-Peptid oder saure Elution) insbesondere für die geplanten massenspektrometrischen Analysen zu verbessern, wurde direkt hinter die kodierende Sequenz für das FLAG-HA-Tandem-Epitop noch eine kodierende Sequenz für eine sieben Aminosäuren umfassende Erkennungssequenz der TEV-Protease angefügt. Als TEV-Protease wird die katalytische Domäne des Nuclear Inclusion a (NIa) Proteins (~27 kDa) des Tobacco Etch Virus (TEV) bezeichnet. Dabei handelt sich um eine

hochspezifische und gegenüber den meisten Proteaseinhibitoren insensitive Protease (Parks 1994, Rigaut 1999).

2.5.1 Übersicht über die Methode zur Modifizierung von Plasmiden

Die Modifikation der Plasmide $pGC-A\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$ (Teil 1 dieser Arbeit) und $pFLAG-GC-A$ (Teil 2 dieser Arbeit) erfolgte durch Abwandlung eines in der Literatur beschriebenen Verfahrens (Yang 2004). Das nachfolgend in Abbildung 6 dargestellte Vorgehen wurde für alle Modifikationen gleichermaßen verwendet. Lediglich die eingesetzten Ausgangsplasmide sowie Primer unterschieden sich je nach Anforderung.

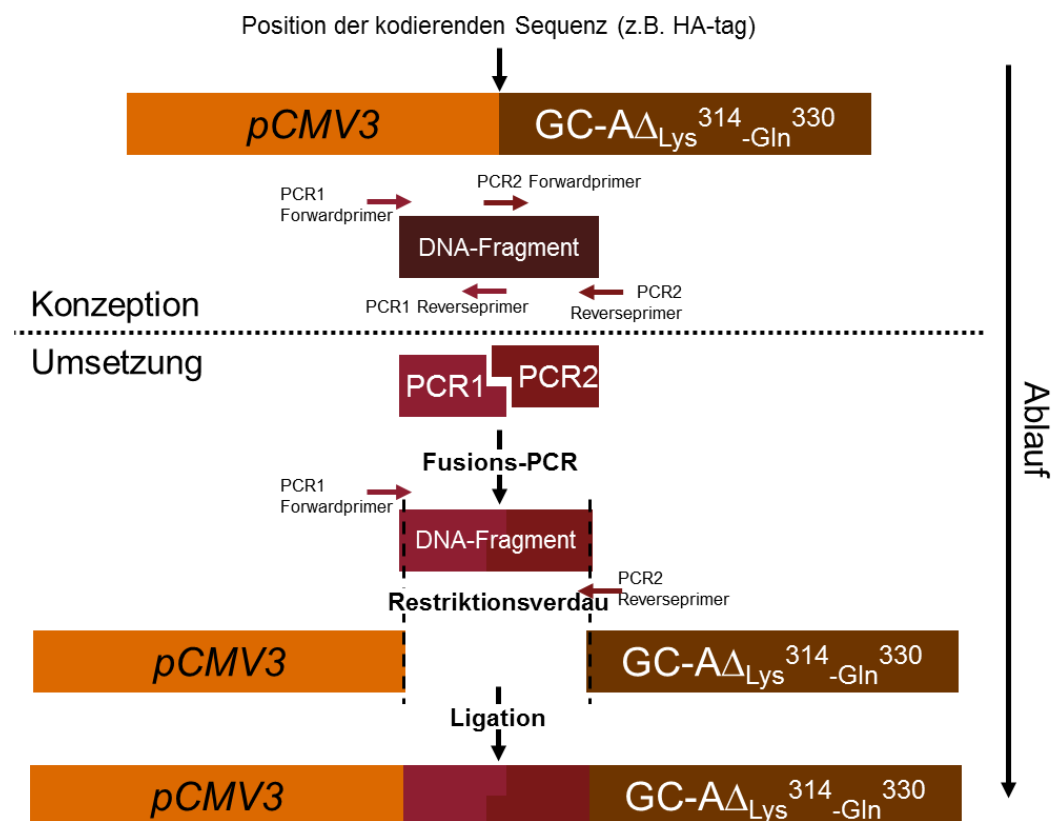


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vorgehens durch das im Rahmen der vorliegenden Arbeit Plasmide modifiziert wurden (hier: $pGC-A\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$).

2.5.1.1 Konzeption

Im ersten Schritt wurde definiert welche kodierende Sequenz (z.B. für ein HA-tag) an welcher Stelle im Plasmid eingefügt werden soll. Von dieser Stelle aus wurde etwa 300 bis 400 Basen up- und downstream nach Schnittstellen für Restriktionsenzyme gesucht, die das Plasmid nur einmal schneiden würden. Ausgehend von diesen Schnittstellen entsteht ein DNA-Fragment in dem sich die einzufügende kodierende Sequenz (in etwa mittig) befindet. Der Rest des Fragmentes besteht aus der kodierenden Sequenz des Ausgangsplasmids (z.B. *pFLAG-GC-A*). Nun wurde anhand der Sequenz des identifizierten DNA-Fragmentes der Forward- (PCR1 Forwardprimer) und Reverseprimer (PCR2 Reverseprimer) ermittelt. Der PCR1 Forwardprimer lag knapp vor und der PCR2 Reverseprimer knapp hinter den ermittelten Restriktionssequenzen um sicherzustellen, dass diese nach PCR fehlerfrei im DNA-Fragment enthalten sind. Um die Modifikation in das geplante DNA-Fragment einzufügen, wurde nun innerhalb des DNA-Fragmentes ein Reverseprimer (PCR1 Reverseprimer) gewählt. Dieser PCR1 Reverseprimer begann an der Stelle, an der die Modifikation im DNA-Fragment vorgesehen wurde. Er war zur Hälfte komplementär zum Ausgangsplasmid, wobei die zum Ausgangsplasmid komplementäre Sequenz des Primers an der Stelle endete, an der die Modifikation eingefügt werden sollte. Die andere Hälfte wurde durch die Modifikation (z.B. kodierende Sequenz für das HA-tag) gebildet. Da dieser Teil nicht komplementär zum Ausgangsplasmid war, wurde ein PCR-Produkt mit frei überhängenden Enden gebildet. Ebenso wurde innerhalb des geplanten DNA-Fragmentes ein Forwardprimer (PCR2 Forwardprimer) entworfen. Der PCR2 Forwardprimer trug am 5'-Ende die Sequenz der einzufügenden Modifikation und bildete damit etwa die Hälfte des Oligonukleotids. Die andere Hälfte des PCR2 Forwardprimers war zur Sequenz des Ausgangsplasmids komplementär.

2.5.1.2 Generierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Unter Verwendung der Primerpaarung „PCR1 Forwardprimer“ mit „PCR1 Reversprimer“ sowie „PCR2 Forwardprimer“ mit „PCR2 Reverseprimer“ und 10 ng des Ausgangsplasmids (z.B. *pFLAG-GC-A*) wurden zunächst zwei unabhängige PCRs in einem 20 µl Ansatz (1 x PCR Reaktionspuffer, 1 x Q-Solution, 0,1 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq-Polymerase) angesetzt. Die jeweiligen Primer wurden in einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt und die Reaktionsansätze im Thermocycler nach dem in nachfolgender Tabelle 9 dargestellten Programm prozessiert.

Tabelle 9: PCR Programm des Thermocyclers für die Erzeugung der DNA-Fragmente „PCR1“ und „PCR2“ zur Modifizierung von Plasmiden

Programmschritt	Temperatur	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung (initial)	94,0 °C	120	1
Denaturierung	94,0 °C	30	30
Annealing	52,5 °C	30	
Elongation	72,0 °C	60	
Finale Elongation	72,0 °C	180	1
Cool Down	4,0 °C	300	1

Die beiden erhaltenen DNA-Fragmente aus PCR1 und PCR2 wurden in einem DNA-Agarosegel (1 % (w/v)) aufgetrennt und die Produkte unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Aufreinigung der beiden DNA-Fragmente aus dem DNA-Agarosegel erfolgte mit dem NuleoSpin® Gel and PCR Clean-up Extraction Kit gemäß Anleitung des Herstellers. Das jeweilige DNA-Pellet wurde in 30 µl RNase- und DNase-freiem Wasser resuspendiert. Aufgrund der komplementären Überhänge der DNA-Fragmente aus PCR1 und PCR2 konnten diese in einer PCR an den freien Überhängen fusioniert und mit Primern amplifiziert werden.

2.5.1.3 Fusions-PCR und Aufreinigung des DNA-Fragmentes

Zur Fusion der beiden Fragmente wurde ein 50 µl PCR-Ansatz (1 x PCR-Reaktionspuffer, 1 x Q-Solution, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq-

Polymerase) hergestellt. Zu diesem Ansatz wurde je 1 µl der zuvor aufgereinigten Produkte der PCR1 und PCR2 gegeben und das in nachfolgender Tabelle 10 aufgeführte Programm im Thermocycler gestartet.

Tabelle 10: PCR Programm des Thermocyclers für die Fusions-PCR. Im ersten Teil des Programms erfolgt die Fusion der Produkte aus PCR1 und PCR2 zu dem DNA-Fragment mit der Modifikation. Im zweiten Teil wird dieses fusionierte DNA-Fragment, durch Zugabe der flankierenden Primer, amplifiziert.

Programmschritt	Temperatur	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung (initial)	94 °C	180	1
Denaturierung	94 °C	45	15
Annealing	50 °C	120	
Elongation	72 °C	120	
Cool Down	4 °C	<i>Pause</i>	1
Zugabe von frischer Taq-Polymerase (1 U) und der flankierenden Primer (1 µM PCR1 Forwardprimer, 1 µM PCR2 Reverseprimer) um das fusionierte DNA-Fragment zu amplifizieren			
Denaturierung (initial)	94 °C	180	1
Denaturierung	94 °C	60	25
Annealing	50 °C	120	
Elongation	72 °C	120	
Finale Elongation	72 °C	600	1
Cool Down	4 °C	300	1

Im ersten Teil des Programms wurde durch die gewählten Bedingungen die Fusion der Produkte aus PCR1 und PCR2 an den überhängenden Oligonukleotiden zum geplanten DNA-Fragment ermöglicht. Durch Zugabe von je 1 µM der flankierenden Primer für das DNA-Fragment (PCR1 Forwardprimer, PCR2 Reverseprimer) und frischer Taq-Polymerase (1 U) wurde das Fusionsprodukt amplifiziert. Zur Aufreinigung des so generierten DNA-Fragmentes wurden 50 µl eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol (Verhältnis 49:1) zugegeben und nach Durchmischung zentrifugiert (10.000 g x 5 min, 4 °C). Die obere Phase mit dem Produkt aus der Fusions-PCR wurde mit 3 µl einer Natriumacetatlösung (3 M, pH 5,0) sowie 75 µl Ethanol (100%, -20 °C) vermischt, für 30 min bei -20 °C

gelagert und das DNA-Fragment anschließend in der Zentrifuge (10.000 g x 8 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 25 µl RNase- und DNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.5.1.4 Restriktionsverdau und Ligation des modifizierten DNA-Fragmentes

Das in der Fusions-PCR erzeugte und nachfolgend aufgereinigte DNA-Fragment sowie das Plasmid in das dieses einzufügen war (z.B. *pFLAG-GC-A*), wurden einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen Apal und KpnI unterzogen. Zu einem 20 µl-Ansatz (1 x NEBuffer 4, 1 x BSA) mit 5 U Restriktionsenzym Apal wurde 1 µg des Plasmids bzw. 5 µl des DNA-Fragmentes aus der Fusions-PCR hinzugegeben. Der Verdau mit Apal erfolgte für 4 h bei 25 °C. Anschließend wurden 10 U des Enzyms KpnI zugegeben und die Temperatur auf 37 °C erhöht. Da die Reaktivität des Enzyms KpnI in diesem Puffer nur 25 % beträgt, erfolgte der Verdau über Nacht. Am Folgetag wurden beide Ansätze in einem 1 %igem DNA-Agarosegel (w/v) aufgetrennt. Das etwa 8 kb große, linearisierte Plasmid (Rückgrat), sowie das Fusionsprodukt wurden ausgeschnitten und mit dem Extraktionskit der Firma Macherey-Nagel gemäß Anleitung des Herstellers aus dem DNA-Agarosegel extrahiert. Die Ligation des erzeugten DNA-Fragmentes (Insert) in das linearisierte Plasmid erfolgte in 1 x T4-Ligasepuffer mit 10 U T4-Ligase über Nacht bei 14 °C. Das Ligationsprodukt wurde im Vakuum eingeengt und in Bakterien transformiert (vgl. 2.3.1, Seite 28). Erhaltene Bakterienkolonien wurden gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt. Die Plasmidisolierung erfolgte wie unter 2.3.2 (Seite 29) beschrieben. Die isolierte DNA potentieller Klone wurde anschließend mit dem Standardprimer CMV fwd (5'-cgc aaa tgg gcg gta ggc gtg-3') sequenziert (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg).

2.5.2 Generierung von $pHA-GC-A\Delta_{Lys}^{314-330}$

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde in das Plasmid $pGC-A\Delta_{Lys}^{314-330}$ eine kodierende Sequenz für ein HA-Epitop (tac cca tac gac gtc cca gac tac gcg) nach dem unter 2.5.1 (Seite 33) beschriebenen Vorgehen eingefügt. Hierzu wurden die in nachfolgender Tabelle 11 aufgeführten Primer verwendet um die PCR-Produkte PCR1 (~200 Basenpaare) und PCR2 (~300 Basenpaare) zu amplifizieren.

Tabelle 11: Übersicht über die für die Modifikation von $pGC-A\Delta_{Lys}^{314-330}$ verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
pCMV5-FLAG	tct ggt acc ggc ccc ccc tga gag g	PCR1 Forwardprimer
splice Mut-r1128	ctg gga cgt cgt atg ggt acg cgt ggc cgc ccc gga gta gc	PCR1 Reverseprimer
FLAG Mut-f 23807	tac cca tac gac gtc cca gac tac gcg agc gac ctg acc gtg	PCR2 Forwardprimer
FLAG-GC-A rev	gcc agt gcg cgg tga ag	PCR2 Reverseprimer

Die überlappenden Sequenzen der Oligonukleotide aus PCR1 und PCR2, die verwendeten Primer für dieses Fragment sowie der daraus resultierende Sequenzabschnitt des Plasmids $pHA-GC-A\Delta_{Lys}^{314-330}$ kann nachfolgender Abbildung 7 entnommen werden.

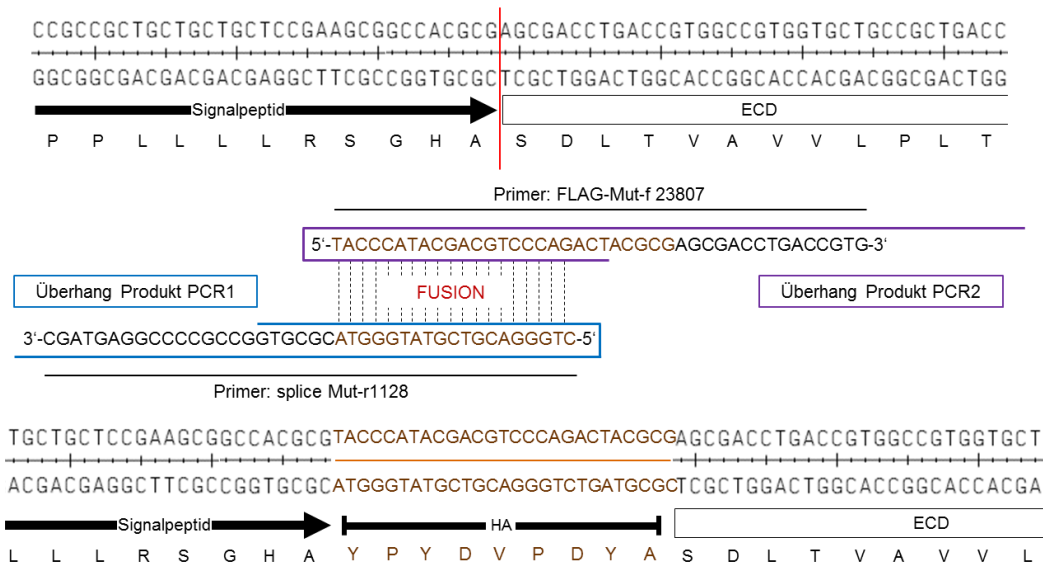


Abbildung 7: Darstellung der Position der kodierenden Sequenz für das HA-tag in $pGC-A\Delta_{Lys}^{314}-Gln^{330}$.

Die Darstellung enthält darüber hinaus die Zuordnung der beiden Primer und die überlappenden Sequenzabschnitte der Produkte PCR1 und PCR2 zur Generierung des Inserts für $pHA-GC-A\Delta_{Lys}^{314}-Gln^{330}$. Der Primer pCMV5-FLAG (PCR1 Forwardprimer) liegt etwa 200 Basenpaare upstream, der Primer FLAG-GC-A rev etwa 300 Basenpaare downstream. Beide Primer sind in dieser Abbildung nicht enthalten.

2.5.3 Generierung von pFLAG-HA-TEV-GC-A

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde in das Plasmid $pFLAG-GC-A$ die kodierende Sequenz für ein HA-tag, sowie die TEV-Erkennungssequenz gemäß dem unter 2.5.1 (Seite 33) beschriebenen Verfahren, eingefügt. Um die Detektion des FLAG- und des HA-Epitops durch die entsprechenden Antikörper sicherzustellen, wurde die einzufügende kodierende Sequenz so gewählt, dass das bestehende FLAG-Epitop durch zwei Glycine von dem HA-Epitop getrennt wurde. Daraus resultiert die nachfolgend in Klammern angegebene kodierende Sequenz für die Aminosäuresequenz GGYDYDVPDYA (ggt ggt tac cca tac gac gtc cca gac tac gcg). Ebenso wurden zwei Glycine zwischen dem HA-Epitop und der TEV-Erkennungssequenz vorgesehen. Für die Erkennungssequenz der TEV-Protease wurde die Aminosäuresequenz ENLYFQS gewählt (Dougherty 1989). Somit resultiert die nachfolgend in Klammern angegebene kodierende Sequenz für die Aminosäuresequenz

GGENLYFQS (ggg ggt taa cca tac gac gtc cca gac tac gcg). Die kodierende Sequenz für das HA-TEV-Epitop umfasste für diesen Ansatz insgesamt 66 Basen. Aufgrund dieser Anzahl wurde ein zweistufiger Ansatz gewählt um die Stabilität der Oligonukleotide und Fehlerfreiheit der PCR zu gewährleisten. Basierend auf dem Plasmid *pFLAG-GC-A* wurde somit zunächst das HA-Epitop eingefügt und das Plasmid *pHA-FLAG-GC-A* erzeugt. Hierzu wurden die in Tabelle 12 genannten Primer verwendet um die PCR-Produkte PCR1 (~200 Basenpaare) und PCR2 (~300 Basenpaare) zu amplifizieren.

Tabelle 12: Übersicht über die für die Modifikation von *pFLAG-GC-A* zu *pFLAG-HA-GC-A* verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
pCMV5-FLAG	tct ggt acc ggc ccc ccc tga gag g	PCR1 Forwardprimer
FLAG-Mut-r 23807	ggg acg tcg tat ggg taa cca ccc ttg tcg tca tcg tct ttg	PCR1 Reverseprimer
FLAG Mut-f 23807	tac cca tac gac gtc cca gac tac gcg agc gac ctg acc gtg	PCR2 Forwardprimer
FLAG-GC-A rev	gcc agt gcg cgg tga ag	PCR2 Reverseprimer

Die überlappenden Sequenzen der Oligonukleotide aus PCR1 und PCR2, die verwendeten Primer für dieses Fragment sowie der daraus resultierende Sequenzabschnitt des Plasmids *pFLAG-HA-GC-A* kann nachfolgender Abbildung 8 entnommen werden.

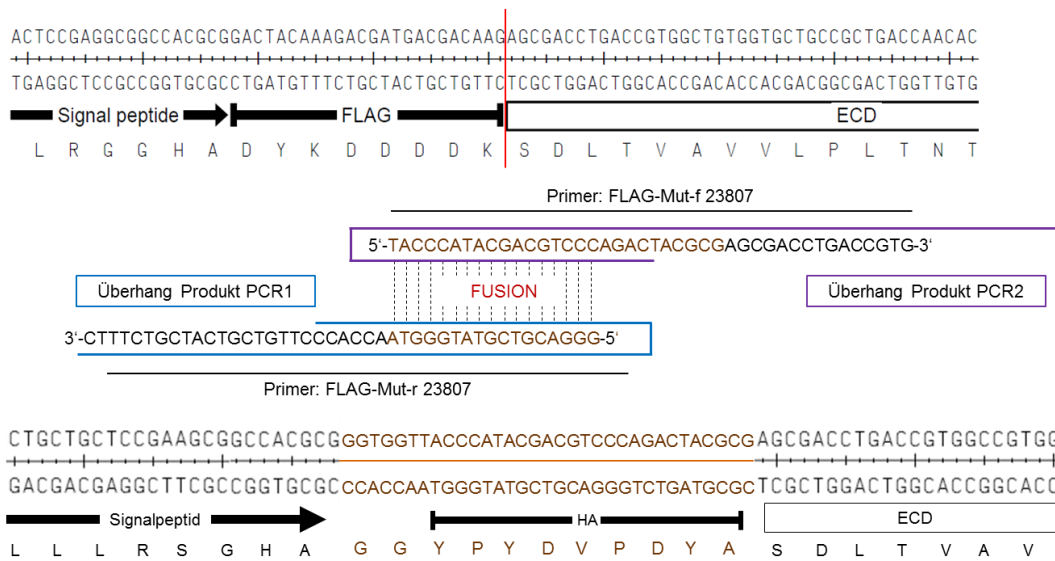


Abbildung 8: Darstellung der Position der kodierenden Sequenz für das HA-tag in *pFLAG-GC-A*.

Die Darstellung enthält darüber hinaus die Zuordnung der beiden Primer und die überlappenden Sequenzabschnitte der Produkte PCR1 und PCR2 zur Generierung des Inserts für *pFLAG-HA-GC-A*. Der Primer pCMV5-FLAG (PCR1 Forwardprimer) liegt etwa 200 Basenpaare upstream, der Primer FLAG-GC-A rev etwa 300 Basenpaare downstream. Beide Primer sind in dieser Abbildung nicht enthalten.

Die Sequenz des erhaltenen Plasmids *pHA-FLAG-GC-A* wurde durch Sequenzierung (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) mit dem Standardprimer CMV fwd (5'-cgc aaa tgg gcg gta ggc gtg-3') verifiziert. In das Plasmid *pFLAG-HA-GC-A* wurde anschließend die zuvor ermittelte kodierende Sequenz für die TEV-Erkennungssequenz eingefügt. Unter Verwendung von 10 ng des Plasmids *pFLAG-HA-GC-A* wurden PCR1 und PCR2 mit den in Tabelle 13 genannten Primer angesetzt und die PCR-Produkte PCR1 (~250 Basenpaare) und PCR2 (~300 Basenpaare) amplifiziert.

Tabelle 13: Übersicht über die für die Modifikation von *pFLAG-HA-GC-A* zu *pFLAG-HA-TEV-GC-A* verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
pCMV5-FLAG	tct ggt acc ggc ccc ccc tga gag g	PCR1 Forwardprimer
TEV rev	gac tgg aag tac agg ttc tcg cca ccc gcg tag tct ggg acg	PCR1 Reverseprimer
TEV fwd	gag aac ctg tac ttc cag tct agc gac ctg acc gtg gc	PCR2 Forwardprimer
FLAG-GC-A rev	gcc agt gcg cgg tga ag	PCR2 Reverseprimer

Die überlappenden Sequenzen der Oligonukleotide aus PCR1 und PCR2, die verwendeten Primer für dieses Fragment, sowie der daraus resultierende Sequenzabschnitt des Plasmids *pFLAG-HA-TEV-GC-A* kann nachfolgender Abbildung 9 entnommen werden.

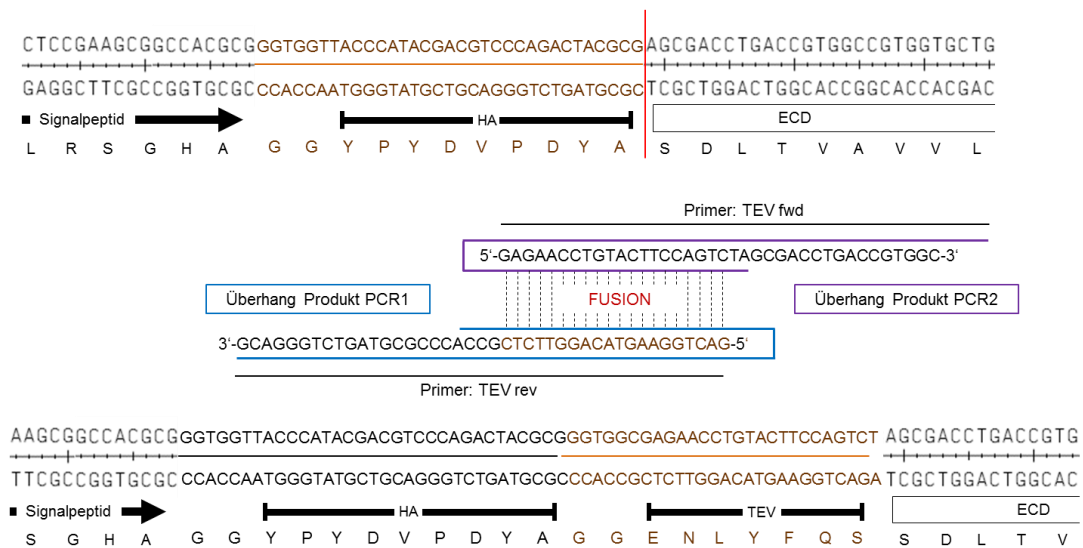


Abbildung 9: Darstellung der Position der kodierenden Sequenz für die TEV-Erkennungssequenz in *pFLAG-HA-GC-A*.

Die Darstellung enthält darüber hinaus die Zuordnung der beiden Primer und die überlappenden Sequenzabschnitte der Produkte PCR1 und PCR2 zur Generierung des Inserts für *pFLAG-HA-TEV-GC-A*. Der Primer pCMV5-FLAG (PCR1 Forwardprimer) liegt etwa 250 Basenpaare upstream, der Primer FLAG-GC-A rev etwa 300 Basenpaare downstream. Beide Primer sind in dieser Abbildung nicht enthalten.

2.6 Transfektion von HEK 293-Zellen

Zur transienten Expression von Plasmiden in HEK 293-Zellen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) wurde vornehmlich für die FRET-Experimente und die Herstellung von Proteinlysaten für Positivkontrollen im Western Blot verwendet. Die PEI-Stammlösung (1 mg/ml) wurde in der AG Kuhn steril angesetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Zur Transfektion von Plasmiden mittels PEI wurden HEK 293-Zellen bis zu einer Konfluenz von 30 % bis maximal 50 % kultiviert und für eine 10 cm Schale 10 µg DNA mit 30 µg PEI in 1 ml DMEM (-) gemischt. Dieser Transfektionsansatz wurde auf die Zellen verteilt und 8 h inkubiert. Anschließend wurde das DNA-PEI-haltige Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Die Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem kommerziell erhältlichen FuGENE[®]6 Transfektionsreagenz wurde vornehmlich für Versuche verwendet, bei denen eine hohe und gleichmäßige Anzahl transfizierter Zellen erforderlich war. Die Anwendung erfolgte nach Vorgabe des Herstellers.

2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA-Verfahren verwendet. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer zuvor pipettierten Eichkurve und der bei 562 nm gemessenen Absorption (Viktor² 1420 Multilabel Counter) bestimmt.

2.8 Western Blot Analysen

2.8.1 Verwendete Antikörper

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 14 genannten Primärantikörper sowie die hierzu korrespondierenden Sekundärantikörper (vgl.

Tabelle 15) in der dort angegebenen Verdünnung eingesetzt.

Tabelle 14: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Eingesetzte Verdünnung	Herkunft	Quelle
anti-HA	1:500	Maus	Covance, München
anti-FLAG	1:1.000	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
anti-GC-A	1:1.000	Kaninchen	AG Kuhn (polyklonales Serum, Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg)
anti-PMCA	1:750	Maus	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
anti-GAPDH	1:7.500	Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
anti-ERK ½	1:1.000	Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main

Tabelle 15: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Eingesetzte Verdünnung	Herkunft	Quelle
anti-Maus IgG (HRP)	1:10.000	Kaninchen	Bio Rad Hercules, USA
anti-Kaninchen IgG (HRP)	1:10.000	Ziege	Bio Rad Hercules, USA

2.8.2 Zielproteine und verwendete Proben

Unter Verwendung der unter 2.8.1 genannten Antikörper wurden die in nachfolgender Tabelle 16 aufgeführten Zielproteine im Western Blot nachgewiesen. Ergänzend hierzu erfolgte im Western Blot der Nachweis von Proteinen, die N-terminal über ein künstliches Epitop wie das FLAG-tag (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) bzw. HA-tag (Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) verfügten (z.B. FLAG-GC-A, HA-GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$). Der Nachweis dieser Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen das entsprechende Epitop.

Tabelle 16: Übersicht über die im Western Blot nachgewiesenen Proteine, deren Molekularmasse sowie die für den Western Blot verwendeten Proben zur Analyse

Zielprotein	Größe	Nachweis in
Guanylatzyklase A (GC-A)	130 kDa	<ul style="list-style-type: none"> • Zelllysate aus HEK 293-Zellen • Herzlysate (Gesamtherz) • Lungenlysate (Gesamtlunge) • Nierenlysate (Gesamtniere) • Lysate aus Kardiomyozyten
FLAG-GC-A	131 kDa	<ul style="list-style-type: none"> • Zelllysate aus HEK 293-Zellen • Herzlysate (Gesamtherz)
FLAG-HA-TEV-GC-A	133 kDa	<ul style="list-style-type: none"> • Zelllysate aus HEK 293-Zellen • Herzlysate (Gesamtherz) • Lysate aus Kardiomyozyten
Isoform der Guanylatzyklase A (GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}-\text{Gln}^{330}}$)	128 kDa	<ul style="list-style-type: none"> • Zelllysate aus HEK 293-Zellen
HA-GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}-\text{Gln}^{330}}$	129 kDa	<ul style="list-style-type: none"> • Zelllysate aus HEK 293-Zellen
Plasmamembran-Kalzium-ATPase (PMCA)	140 kDa	<ul style="list-style-type: none"> • Lysate aus Kardiomyozyten
extrazellulär geregelte Kinasen 1 und 2 (ERK 1/2)	44 kDa (ERK 1) 42 kDa (ERK 2)	<ul style="list-style-type: none"> • Lysate aus Kardiomyozyten
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	36 kDa	<ul style="list-style-type: none"> • Herzlysate (Gesamtherz)

2.8.3 Denaturierende Gel-Elektrophorese (SDS PAGE)

Die Denaturierung und Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (Ausubel 2002). Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gelsystem setzt sich aus einem Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel mit Beladetaschen zusammen. Die zur Herstellung der Gele verwendete Acrylamid-Stammlösung bestand zu etwa 97,4 % aus Acrylamid (AA) und zu etwa 2,6 % aus N,N'-Methylenbisacrylamid (BAA). Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist in

Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Geltyp	Komponente	Menge
Sammelgel (5% AA/BAA)	AA/BAA (ca. 38:2)	1,95 ml
	1 M Tris, pH 6,8	1,74 ml
	H ₂ O (Aqua bidest)	11,10 ml
	10 % SDS	150,0 µl
	TEMED	7,50 µl
	APS 10 %	150,0 µl
Trenngel (7,5% AA/BAA)	AA/BAA (ca. 38:2)	5,60 ml
	1 M Tris, pH 8,8	11,20 ml
	H ₂ O (Aqua bidest)	12,80 ml
	10 % SDS	300,0 µl
	TEMED	15,0 µl
	APS 10 %	300,0 µl

Proben für die Western Blot Analysen wurden mit dreifach Laemmli (vgl. Tabelle 18) versetzt (Ausubel 2002) und bei 72 °C für 15 min inkubiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Laemmli-Puffers (3-fach)

Komponente	Konzentration
Tris-HCl (pH 6,8)	187,5 mM
SDS	6,0 % (w/v)
Glycerol	30,0 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	15,0 % (v/v)
Bromphenolblau	0,003 % (w/v)

Das Beladen des Gels sowie die sich anschließende Elektrophorese erfolgte mit 1 x Laufpuffer (10 x stock: AfCS Solution Protocol PS00000054, Artega 2002). Zunächst wurde eine Spannung von 50 V angelegt bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald eine zielführende Auftrennung des sichtbaren Proteinmarkers erreicht war.

2.8.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Zum Nachweis der Zielproteine bzw. der daran gekoppelten Epitope wurden die zuvor durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel mittels Semi-Dry-Methode (2,5 mA/cm², 1 h) auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Aufbau aus Whatmanpapier, Nitrozellulosemembran und SDS-Gel erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von Transferpuffer (25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 192 mM Glycin).

Der erfolgreiche Transfer wurde mittels Ponceau-S-Färbung (0,1 % (v/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure) verifiziert. Anschließend wurde die Membran in 1 x TBS (10 x stock: 198 mM Tris, 946 mM NaCl, pH 7,4) mit 0,1 % Tween[®]20 (v/v) entfärbt. Unspezifische Bindungsstellen für den Primärantikörper wurden durch die Inkubation der Membran (30 min, RT) mit einer Magermilchpulverlösung (5 % (w/v) in 1 x TBS-T) geblockt und der jeweilige Primärantikörper (vgl. Tabelle 14, Seite 44) bei 4 °C über Nacht appliziert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit 1 x TBS-T gewaschen, um Reste von ungebundenem Primärantikörper zu entfernen. Die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (vgl.

Tabelle 15, Seite 44) erfolgte für etwa 2 h bei Raumtemperatur und unter leichter Bewegung der Flüssigkeit über die Membran. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1 x TBS-T entfernt.

Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase wird ein auf die Membran aufgebrachtes ECL Substrat umgesetzt. Die dabei entstehende Chemilumineszenz schwärzt auf die Membran aufgelegte Röntgenfilme an der entsprechenden Stelle. Unter Verwendung von handelsüblichem Entwickler und Fixierer wurden diese Belichtungen sichtbar gemacht. Neben der Verwendung von Röntgenfilmen wurden auch Bilder mit Hilfe eines Imagers der Firma Alpha Innotech (FluorChem SP

Chemilumineszens Detektions-System) erzeugt. Die vorbereitenden Schritte wurden analog zur Belichtung der Röntgenfilme durchgeführt. Abweichend wurde die Membran anschließend in die Belichtungskammer unter eine hochsensitive Kamera gelegt und das Signal über definierte Zeiträume aufgezeichnet.

2.8.5 Auswertung von Western Blots

Unter Verwendung der Analysesoftware ImageJ (Entwickelt vom National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>, abgerufen am 31.01.2014) wurde die Proteinexpression durch Messung der Intensität der Banden, unter Berücksichtigung des Hintergrunds, quantifiziert.

2.9 Biotinylierung der Zelloberfläche

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Isoform des GC-A Rezeptors (GC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$), ebenso wie die wildtypische GC-A, an der Zelloberfläche von transient transfizierten HEK 293-Zellen präsentiert wird oder ob das Fehlen der 17 Aminosäuren Auswirkungen auf die Lokalisation des Rezeptors hat. Hierzu wurden HEK 293-Zellen mittels FuGENE[®]6 Transfektionsreagenz transient (vgl. 2.6, Seite 43) entweder mit dem Plasmid *pGC-A wt* oder dem Plasmid *pGC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$* transfiziert. Die Zellen wurden mit 1-fach PBS (stock: AfCS Solution Protocol PS00000041, Grosseohme 2001) gewaschen und die Oberflächenproteine, nach Vorgaben des Herstellers mit NHS-LC-Biotin (0,5 mg/ml in PBS) inkubiert (30 min, 4 °C). Die Zellen wurden mit PBS (+ 0,1 % BSA) gewaschen, geerntet und abzentrifugiert (1.000 g x 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 500 μ l Lysispuffer (1 % Triton und 1 mM EDTA in PBS, pH 7,4) resuspendiert und durch eine 24 G Kanüle geschert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (1.000 g x 5 min, 4 °C) und der Proteingehalt bestimmt. Anschließend wurden 300 μ g Proteinextrakt zu 100 μ l Avidin-Agarose gegeben, um die biotinylierten Oberflächenproteine zu

präzipitieren. Die Inkubation des Zelllysates mit der Avidinagarose erfolgte für 3 h bei 4 °C unter leichter Bewegung. Anschließend wurde die Agarose mit dem gebundenen Protein zentrifugiert (2.000 g x 3 min, 4 °C), gewaschen und in 60 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Die mit Laemmli-Puffer versetzte Agarose wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert, zentrifugiert (2.000 g x 3 min, RT) und 30 µl des Überstandes sowie 20 µg Protein des Gesamtlysates im Western Blot mit einem Antikörper gegen GC-A analysiert.

2.10 ANP-Bindungsstudie an transient transfizierten HEK 293-Zellen

Im Rahmen des ersten Teils der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 , ebenso wie die wildtypische GC-A, in der Lage ist, den Liganden ANP zu binden. Die hierfür erforderlichen Experimente mit ^{125}I -ANP wurden von Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn (Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt. HEK 293-Zellen wurden transient mit dem Plasmid *pGC-A wt* oder *pGC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 20 min in serumfreiem Medium mit 100 pM ^{125}I -ANP und ANP in Konzentrationen von 10 pM bis 100 nM inkubiert. Die gemessene Radioaktivität wurde auf den Kontrollwert (100 pM ^{125}I -ANP ohne ANP) von GC-A wt normiert (100 %).

2.11 Immunpräzipitation (IP) an transient transfizierten HEK 293-Zellen

2.11.1 Lyse transient transfizierter HEK 293-Zellen

Die Lyse von transfizierten HEK 293-Zellen erfolgte in IP-Puffer (vgl. Tabelle 19) unter Zugabe von Protease- und/oder Phosphatase-Inhibitoren.

Tabelle 19: Zusammensetzung des IP-Puffers

Komponente	Konzentration
HEPES (pH 7,4)	50,0 mM
NaCl	150,0 mM
Na ₂ H ₂ PO ₄	10,0 mM
NaF	50,0 mM
EDTA (pH 8,0)	1,0 mM
Triton X100	1,0 % (v/v)
Glycerol	10,0 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Na ₃ VO ₄	0,1 mM

Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml IP-Puffer abgelöst. Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und alle 5 min mit dem Vortex® für etwa 45 s gemischt sowie mehrfach mit einer Tuberkulinspritze durch eine Nadel (24 G) geschert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (2.000 g x 10 min, 4 °C) und verworfen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt und eine Probe für die Analysen im Western Blot aserviert.

2.11.2 Immunpräzipitation (IP) mittels anti-FLAG-Agarosebeads

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Immunpräzipitation unter Verwendung einer kommerziell verfügbaren Agarosesuspension mit gebundenem anti-FLAG Antikörper (z.B. ANTI-FLAG® M2 affinity gel, Sigma-Aldrich) verwendet, um die Interaktion von FLAG-GC-A und HA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln³³⁰ zu untersuchen. Hierzu wurden HEK 293-Zellen transient mit den Plasmiden *pFLAG-GC-A* und *pHA-A Δ_{Lys}^{314} -Gln³³⁰* kotransfiziert. Als Kontrolle dienten HEK 293-Zellen, die transient mit den Plasmiden *pcDNA3* und *pFLAG-GC-A* bzw. *pcDNA3* und *pHA-A Δ_{Lys}^{314} -Gln³³⁰* kotransfiziert wurden. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die zuvor über den anti-FLAG Antikörper an die Agarose gebundene FLAG-HA-TEV-GC-A mittels TEV-Protease, durch die enzymatische Reaktion, abgetrennt werden kann. Dies diente der Untersuchung der

Funktionsfähigkeit des zuvor im Rahmen dieser Dissertationsarbeit generierten Plasmids *pFLAG-HA-TEV-GC-A*.

Für die IP wurden 40 µl der anti-FLAG-Agarosesuspension (je 10 cm Schale) zunächst gewaschen und mit BSA (10 mg/ml in PBS) rotierend für 30 min bei 4 °C inkubiert, um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Agarosebeads zu reduzieren. Anschließend wurde das zuvor präparierte Zelllysate zu den mit BSA-abgesättigten Agarosebeads gegeben. Nach Inkubation (3 h, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und die Agarosebeads mit IP-Puffer gewaschen. Aus jeder Fraktion wurden Aliquots für Proteinbestimmung und Analyse im Western Blot aserviert.

Für den ersten Teil der Arbeit wurde zu den Agarosebeads mit dem gebundenen Protein 30 µl Laemmli-Puffer gegeben und für 10 min bei 72 °C gekocht. Anschließend wurden aus jeder Fraktion 20 µg sowie 10 µl der gekochten Agarosebeads im Western Blot mit Antikörpern gegen GC-A, das FLAG- und das HA-Epitop analysiert.

2.11.2.1 Enzymatische Abspaltung von FLAG-HA-TEV-GC-A mittels TEV-Protease nach IP

Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der TEV-Erkennungssequenz wurde das Protein FLAG-HA-TEV-GC-A zunächst, wie zuvor beschrieben, an anti-FLAG-Agarose gekoppelt und die nachfolgenden unterschiedlichen Bedingungen (A – E) zur enzymatischen Abspaltung des Proteins getestet:

- (A): 100 U AcTEV-Protease in 200 µl TEV-Puffer, 3 h, 4 °C
- (B): 100 U AcTEV-Protease in 200 µl TEV-Puffer, über Nacht, 4 °C
- (C): 200 U AcTEV-Protease in 200 µl TEV-Puffer, 3 h, 4 °C
- (D): 200 U AcTEV-Protease in 200 µl TEV-Puffer, über Nacht, 4 °C
- (E): 200 µl TEV-Puffer ohne AcTEV, über Nacht, 4 °C

Hierzu wurden die angegebenen Mengen an AcTEV-Protease (Invitrogen, Karlsruhe) nach Vorgabe des Herstellers in beigefügtem TEV-Puffer

verwendet. Zum TEV-Puffer wurden Proteaseinhibitoren (cOmplete mini, Roche Diagnostic, Mannheim), welche die Aktivität der TEV-Protease nicht beeinflussen, gemäß Vorgaben des Herstellers hinzugeben. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Agarosebeads zentrifugiert (2.000 g x 5min, 4°C), der Überstand abgenommen und 30 µl (15 %) im Western Blot mit Antikörpern gegen GC-A und das FLAG-Epitop analysiert. Die Agarose wurde in 40 µl dreifach Laemmlipuffer bei 72 °C für 10 min gekocht, zentrifugiert und 20 µl des Überstandes ebenfalls mit den o.g. Antikörpern im Western Blot analysiert.

2.12 Stimulationsexperimente an transfizierten HEK 293-Zellen mit ANP

Die Stimulierbarkeit des GC-A-Rezeptors mit dem Liganden ANP wurde im Rahmen dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden analysiert. Zum einen wurden Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimente durchgeführt und der intrazelluläre Anstieg der cGMP-Konzentration mittels eines Sensors für cGMP in Echtzeit visualisiert und das Signal gemessen. Ferner wurden Zellen in 24-Loch-Platten mit ANP stimuliert, lysiert und die Menge an gebildetem cGMP im cGMP-Radioimmunassay (cGMP-RIA) quantifiziert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Methoden verwendet um die Stimulierbarkeit der Isoform des GC-A-Rezeptors (GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$) zu untersuchen. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionsfähigkeit der FLAG-HA-TEV-GC-A ebenso mit beiden Methoden analysiert.

2.12.1 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimente

Der für die FRET-Experimente verwendete Sensor für intrazelluläres cGMP liegt nach Transfektion von HEK 293-Zellen im Zytosol vor und verfügt über eine Bindungsstelle für cGMP. Diese Bindungsstelle beruht auf der

entsprechenden GAF-B Domäne der Phosphodiesterase 2A und verfügt sowohl über ein *cyan*-fluoreszierendes Protein (CFP) als Donor als auch ein *yellow*-fluoreszierendes Protein (YFP) als Akzeptor. Durch die cGMP-Bindung erfährt das Konstrukt eine Konformationsänderung durch die sich die beiden Fluorophore annähern. Dies führt zu einer Erhöhung der Energieübertragung von CFP auf YFP. Das Verhältnis YFP/CFP wird somit größer und visualisiert die Bildung von cGMP (Nikolaev 2006). Diese Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Viacheslav Nikolaev am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg.

Für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden HEK 293-Zellen transient mit dem Plasmid für den cGMP-Sensor (*pGES-DE2*) sowie dem Plasmid *pGC-A* $\Delta_{Lys}^{314-330}$ bzw. *pGC-A wt* kotransfiziert. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit dem Plasmid *pGES-DE2* und *pGC-A wt* bzw. dem neu generierten Plasmid *pFLAG-HA-TEV-GC-A* kotransfiziert (vgl. 2.6, Seite 43). Etwa 24 h nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, auf Polylysin-beschichtete Deckgläschen (Verhältnis 1:25 - 1:50) ausgesät und für 24 h weiter inkubiert. Für die FRET-Messungen wurden etwa 0,5 ml FRET-Puffer (2 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 5 mM KCl, MgCl₂, 144 mM NaCl, 1 mM, pH 7,3, RT) auf die Deckgläschen gegeben und die Messungen gestartet. Das Donorprotein wurde im Rahmen der Versuchsreihen alle 5 s bei 436 nm (\pm 10 nm) angeregt. Die Energieübertragung von CFP auf YFP wurde als Verhältnis YFP- zu CFP-Emission wiedergegeben. Das basale FRET-Signal wurde zunächst für bis zu 10 min in der FRET-Anlage des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg aufgezeichnet (Nikolaev 2004, Nikolaev 2006). Anschließend wurde ANP in einer finalen Konzentration von 10 nM zugegeben und die Veränderungen des FRET-Signals analysiert.

2.12.2 Stimulation der GC-A an transfizierten HEK 293-Zellen in 24-Loch-Platten

Serumfreies Medium wurde mit 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) in einer Endkonzentration von 0,5 mM versetzt und im Brutschrank äquilibriert. IBMX hemmt Phosphodiesterasen und unterbindet somit den Abbau von cGMP. Das auf den HEK 293-Zellen befindliche serumhaltige Medium wurde durch das IBMX-haltige Medium ersetzt und die Zellen für 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂ (v/v)) inkubiert. Zuvor verdünntes ANP wurde in Endkonzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM appliziert. Die Reaktion wurde nach einer Inkubation von exakt 10 min unterbrochen. Hierzu wurde das Medium zügig abgesaugt und 300 µl eiskalter Ethanol (70 %) zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei -80 °C eingefroren. Nach Abdampfen des Ethanols im Wasserbad wurden die Zellreste jeweils in 300 µl Natriumacetat (50 mM, pH 6,0) resuspendiert. Der cGMP-Gehalt der Proben wurde mittels cGMP-RIA) nach etabliertem Protokoll bestimmt (Hartmann 2008, Schröter 2010).

2.12.3 Quantifizierung der cGMP-Menge je Probe mittels cGMP-RIA

Der cGMP-RIA wurde dankenswerterweise von Frau Birgit Gaßner und Frau Alexandra Gazinski (beide Physiologisches Institut I, Universität Würzburg) im Radioaktivlabor der AG Kuhn durchgeführt. Die Methode basiert auf der immunologischen Fällung von cGMP das an einen zugegebenen Antikörper gegen cGMP gebunden ist. Zur Quantifizierung der cGMP-Menge wird zu jeder Probe ein radioaktiv markiertes cGMP-Analogon, der so genannte Tracer, hinzugegeben. Das cGMP Analogon konkurriert mit dem in der Probe vorhandenen cGMP um den Antikörper. Folglich wird in einer Probe mit sehr hoher cGMP-Konzentration sehr wenig Tracer detektiert (in *counts per minute*, kurz: CPM) und umgekehrt. Über eine zuvor erstellte Standardkurve kann der Gehalt an cGMP in der Probe ermittelt werden.

2.13 Real-Time quantitative RT-PCR

Im Tierversuch mit Angiotensin II wurde beobachtet, dass isolierte Zellmembranen aus Lungengewebe, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, mit einer reduzierten cGMP-Antwort auf die Stimulation mit ANP (vgl. Abbildung 51, Seite 139) reagieren (Hartmann 2008). Um zu testen inwieweit alternatives Spleißen hierbei eine Rolle spielen könnte, wurde Real-Time quantitative-RT-PCR eingesetzt um den Gehalt an mRNA für GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ und wt GC-A in murinem Gewebe von Kontrolltieren und Angiotensin II-behandelten Tieren zu ermitteln. Die Arbeiten fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Boris Skryabin am Institut für Experimentelle Pathologie der Universität Münster statt. Die Quantifizierung der mRNA wurde mit Hilfe eines LightCycler[®] 480 (Roche Applied Science) von Dr. Boris Skryabin durchgeführt (Potthast 2001). Hierzu wurden 20 μ l Reaktionsansätze (LightCycler[®] 480 Master Mix, Roche Applied Science, Mannheim), unter Verwendung von 200 nM Primer und 100 nM FAM- oder YAK-markierte TaqMan Sonde (TIB, Molbiol, Berlin) verwendet. Zur Quantifizierung der eingesetzten Proben wurde eine Standardkurve mit bekannter DNA-Konzentration der Ziel-DNA angefertigt. Als Referenzgen wurde Cytochrom C1 mRNA (Maus) quantifiziert und die erhaltenen Mengen auf dieses Produkt normalisiert. Die Berechnung der Mengen erfolgte auf Basis der eingesetzten Proben mit der Roche Applied Science LightCycler[®] 480 Software unter Verwendung der absoluten Quantifizierung/„Second Derivative Maximum“-Methode.

2.13.1 Isolierung von mRNA aus murinem Gewebe mittels TRIzol[®]

Zur Isolation von mRNA aus murinem Gewebe mit TRIzol[®] (Life Technologies GmbH, Darmstadt) für die Analysen im LightCycler[®] 480 wurden zwischen 50 mg und 100 mg Gewebe bei Raumtemperatur mit 1 ml TRIzol[®] homogenisiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurden die Proben geschüttelt und etwa 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch

anschließende Zentrifugation (12.000 g x 15min, 4 °C) konnte die in der oberen, wässrigen Phase enthaltenen RNA abgenommen und nach Vorgaben des Hersteller aufgereinigt werden.

2.14 Generierung von Plasmiden für transgene Mauslinien

Das Plasmid mit dem Promoter für die kardiomyozytenspezifische Expression des Zielgens in Mäusen (α MHC-Promoter, vgl. Tabelle 3, Seite 24) verfügt über eine Linkersequenz mit einer Sall- und einer HindIII-Schnittstelle. Da HindIII die Plasmide *pFLAG-GC-A* und *pFLAG-HA-TEV-GC-A* innerhalb der GC-A-kodierenden Sequenz an zwei Stellen schneidet, war es für die Klonierungsmaßnahmen nicht geeignet. Um die kodierende Sequenz für die FLAG-getaggte GC-A und die FLAG-HA-TEV-getaggte GC-A über die Sall-Schnittstelle in das Plasmid *p α MHC* zu bringen, musste zunächst die kodierende Sequenz für das Protein FLAG-GC-A mit jeweils einer Sall-Schnittstelle umrahmt werden (d.h. Einfügen vor dem Start- und nach dem Stopcodon).

2.14.1 Einfügen von Sall-Schnittstellen in *pFLAG-GC-A* mittels PCR

Die Sall-Schnittstellen wurden flankierend vor dem Start- und nach dem Stopcodon der kodierenden Sequenz für die FLAG-getaggte GC-A mittels PCR eingefügt. Hierzu wurde ein 100 μ l PCR-Ansatz (1 x PCR Reaktionspuffer, 1 x Q-Solution, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM MgCl₂, 2,5 U Taq-Polymerase) hergestellt und 1 ng des Plasmids *pFLAG-GC-A* als Template zugegeben. Der Forward-Primer Sall-GC-A forward (cgg tcg acc atg ccg ggc tcc cga cg) sowie der Reverse-Primer Sall-GC-A reverse (cgg tcg act cag cct cga gtg cta cat c) wurden in einer Endkonzentration von 0,25 μ M eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde im Thermocycler gemäß dem in Tabelle 20 aufgeführte PCR-Programm prozessiert.

Tabelle 20: Programm des Thermocyclers für die Generierung der Sall-Schnittstellen

Programmschritt	Temperatur	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung (initial)	94 °C	180	1
Denaturierung	94 °C	60	25
Annealing	60 °C	60	
Elongation	72 °C	180	
Finale Elongation	72 °C	600	1
Cool Down	4 °C	300	1

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in einem 1 %igem DNA-Agarosegel (w/v) aufgetragen und gemäß vorgaben des Hersteller mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel, Düren) extrahiert.

2.14.2 Zwischenschritt zur Sequenzierung

Um die Sequenz des aufgereinigten PCR-Produktes zu verifizieren und für die weiteren Schritte amplifizieren zu können, wurde der Vektor *pCR[®]2.1-TOPO[®]* verwendet um das PCR-Produkt darin zu integrieren. Dabei handelt es sich um ein kommerziell verfügbares linearisiertes Plasmid mit einzelnen 3'-Thymidin (T) Überhängen und gebundener Typ I Topoisomerase. Durch die Desoxyribonukleotidyltransferaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase erhält das PCR-Produkt einzelne Deoxyadenosin (A) Überhänge am 3'-Ende. Über diese komplementären Nukleinsäuren kann ein PCR-Produkt in den Vektor integriert werden. Der Ansatz wurde gemäß Vorgaben des Herstellers mit 10 ng des Plasmids *pCR[®]2.1-TOPO[®]* sowie 25 ng des aufgereinigten PCR-Produktes vorbereitet und für 15 min bei 22 °C inkubiert.

Das resultierende Plasmid *pCR[®]2.1-TOPO[®]-Sall-FLAG-GC-A-Sall* wurde, wie unter 2.3.1 (Seite 28) beschrieben, in Bakterien transformiert. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden gepickt und einzelne Mini-Präparationen (vgl. 2.3.2, Seite 29) angefertigt. Das präparierte Plasmid der jeweiligen Kolonie wurde mit dem Restriktionsenzym Sall nach Vorgabe

des Herstellers verdaut und in einem 0,75 %igem DNA-Agarosegel (w/v) analysiert. Der geringe Agaroseanteil wurde gewählt um die beiden fast gleichgroßen Fragmente aus dem Rückgrat (*pCR[®]2.1-TOPO[®]*) und Insert (Sall-FLAG-GC-A-Sall) sauber trennen zu können. Plasmide mit einem positiven Insertsignal wurden sequenziert. Neben den Standardprimern für das Plasmid *pCR[®]2.1-TOPO[®]* (M13 Forward (-20) und M13 Reverse) wurden zur Sequenzierung auch mehrere interne Primer zur Amplifizierung der kodierenden Sequenz der FLAG-GC-A angegeben.

2.14.3 Generierung des Plasmids *pCR[®]2.1-FLAG-HA-TEV-GC-A*

Die Plasmide *pCR[®]2.1-TOPO[®]-Sall-FLAG-GC-A-Sall* sowie *pCMV5-FLAG-HA-TEV-GC-A* wurden gleichzeitig mit den Restriktionsenzymen MluI und Apal verdaut und in einem 1 %igem DNA-Agarosegel (w/v) aufgetrennt. Das Enzym MluI schneidet in beiden Plasmiden die kodierende Sequenz der FLAG-GC-A sowie der FLAG-HA-TEV-GC-A innerhalb des Plasmids spezifisch nur einmal direkt hinter dem ATG (nach ca. 15 Basen). Im Doppelverdau mit Apal wird ein etwa 500 Basenpaare großes Fragment in beiden Ansätzen ausgeschnitten. Dieses Fragment enthält in der Spur des Plasmids *pCR[®]2.1-TOPO[®]-Sall-FLAG-GC-A-Sall* die kodierende Sequenz für die FLAG-Epitop-Region und in der Spur des Plasmids *pCMV5-FLAG-HA-TEV-GC-A* die kodierende Sequenz für die FLAG-HA-TEV-Epitop-Region. Um nun *pCR[®]2.1-TOPO[®]-Sall-FLAG-HA-TEV-GC-A-Sall* zu generieren, also eine kodierende Sequenz für FLAG-HA-TEV-GC-A, die flankierend vor dem Start- und nach dem Stopcodon über eine Sall-Schnittstelle verfügt, wurden aus dem Ansatz mit dem verdauten Plasmid *pCR[®]2.1-TOPO[®]-Sall-FLAG-GC-A-Sall* das etwa achttausend Basenpaare umfassende Fragment aus dem DNA-Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Aus dem Verdauansatz für das Plasmid *pCMV5-FLAG-HA-TEV-GC-A* wurde das etwa 500 Basenpaare umfassende Fragment mit der kodierenden Sequenz für die modifizierte FLAG-HA-TEV-Epitop-Region

ausgeschnitten und ebenfalls aufgereinigt. Beide Fragmente wurden im Verhältnis 1:3 unter Verwendung von T4-Ligase nach Vorgabe des Herstellers in einem 20 µl-Ansatz bei 14 °C über Nacht ligiert. Der Ligationsansatz wurde im Vakuum eingeeengt und vollständig in Bakterien transformiert. Aus den entstandenen Bakterienkolonien wurden Mini-Präparationen (vgl. 2.3.2, Seite 29) angefertigt und unter Verwendung des Standardprimers M13 Forward (-20) das Vorhandensein der kodierenden Sequenz für die FLAG-HA-TEV-Epitopregion verifiziert.

2.14.4 Generierung des Plasmids *paMHC-FLAG-GC-A*

Das Plasmid mit der fehlerfreien FLAG-GC-A-kodierenden Nukleotidsequenz und den erforderlichen Sall-Schnittstellen wurde mit dem Restriktionsenzym Sall verdaut. Ebenso wurde das Plasmid *paMHC* durch den Restriktionsverdau mit Sall linearisiert. Das linearisierte Plasmid *paMHC* (Rückgrat) wurde zusätzlich mit Phosphatase behandelt, um die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Ringbildung im weiteren Prozess zu reduzieren. Rückgrat und Insert wurde in einem 0,75 %igem DNA-Agarosegel (w/v) aufgetrennt und unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Aufreinigung aus dem Gelfragment erfolgte mit dem Extraktionskit der Firma Macherey-Nagel gemäß Anleitung des Herstellers. Das etwa 3,5 kb große DNA-Fragment „Sall-FLAG-GC-A-Sall“ wurde mit dem linearisierten Plasmid *paMHC* (Verhältnis 5:1), 15 U Ligase und 1 x T4-Ligasepuffer versetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C. Der Ligationsansatz wurde im Vakuum eingeeengt und vollständig transformiert. Mit den erhaltenen Bakterienkolonien wurden Mini-Präparation (vgl. 2.3.2, Seite 29) angefertigt und je 1 µg des isolierten Plasmids mit dem Restriktionsenzym Sall verdaut. Gemäß dem Versuchsansatz wurde eine positive Ligation durch das Auftauchen von Rückgrat und Insert im DNA-Agarosegel nachgewiesen. Die richtige Orientierung des Inserts im Plasmid wurde durch Sequenzierung (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) mit zwei internen

Primern der kodierenden Sequenz für GC-A analysiert. Die gewählten Sequenzen lagen etwa 200 Basen hinter dem Startcodon bzw. 200 Basen vor dem Stopcodon der kodierenden Sequenz für das Protein GC-A. Ausgehend von diesen Primern wurde jeweils in Richtung des *paMHC*-Rückgrats sequenziert.

2.14.5 Generierung des Plasmids *paMHC-FLAG-HA-TEV-GC-A*

Analog zur zuvor beschriebenen Generierung des Plasmids *paMHC-FLAG-GC-A* wurde aus den Plasmiden *pCR[®]2.1-TOPO[®]-Sall-FLAG-HA-TEV-GC-A-Sall* und *paMHC* das Plasmid *paMHC-FLAG-HA-TEV-GC-A* durch Ligation erzeugt. Erhaltene Klone und Verifizierung der Orientierung erfolgten analog dem unter 2.14.4 (Seite 60) beschriebenen Vorgehen.

2.14.6 Generierung transgener Mäuse durch Mikroinjektion in Oozyten

Von den Plasmiden *paMHC-FLAG-GC-A* und *paMHC-FLAG-HA-TEV-GC-A* wurde jeweils eine Maxi-Präparation hergestellt (vgl. 2.3.3, Seite 29). Die DNA der Maxi-Präparation wurde an Dr. Boris Skryabin (Institut für Experimentelle Pathologie, Universität Münster) gesendet. Dieser reinigte die erhaltene DNA auf und verdaute diese mit dem Enzym NotI. Hierdurch wurde das DNA-Fragment mit der Ampicillinresistenz entfernt und die linearisierte DNA mit dem α MHC-Promoter und der anhängigen kodierenden Sequenz für FLAG-GC-A bzw. FLAG-HA-TEV-GC-A konnte in befruchtete Oozyten von Mäusen (FVB/N-Stamm) injiziert werden. Die resultierenden Embryonen wurden in die Eileiter von Ammentieren übertragen (Kirchhefer 2005, Cho 2009). Nach der Geburt der Tiere wurden diese mittels Southern Blot genotypisiert. Die hierfür erforderliche Sonde wurde wie nachfolgend beschrieben bereitgestellt.

2.14.7 Amplifizieren einer Sonde für den Southern Blot

Um transgene Founder identifizieren zu können wurde mit Hilfe der Primer rGC-A fwd1145 (tgc tct atg tcc agg cag tg) und rGC-A rev2625 (ctg gta aag

caa ggc ctc ag) sowie 10 ng des Plasmids *pFLAG-GC-A* bzw. *pFLAG-HA-TEV-GC-A* mittels PCR ein etwa 1.500 Basenpaare großes Fragment der kodierenden Sequenz für das Protein FLAG-GC-A bzw. FLAG-HA-TEV-GC-A erzeugt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie die PCR-Bedingungen sind unter 2.5.1.2 (Seite 35) aufgeführt. Die Primer wurden in einer finalen Konzentration von 1 µM eingesetzt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde, wie unter 2.14.2 (Seite 58) beschrieben, für jedes Ausgangsplasmid in den Vektor *pCR[®]2.1-TOPO[®]* ligiert, in Bakterien transformiert (vgl. 2.3.1, Seite 28) und Mini-Präparationen (vgl. 2.3.2, Seite 29) angefertigt. Die erfolgreiche Ligation wurde durch EcoRI/XhoI-Doppelverdau und Analyse in einem 1 %igem DNA-Agarosegel (w/v) nachgewiesen. Für Plasmide mit einem positiven Restriktionsschema wurden Sequenzierungen (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) mit den Standardprimern M13 und T7 für das Plasmid *pCR[®]2.1-TOPO[®]* in Auftrag gegeben. Von Plasmiden mit übereinstimmender kodierender Sequenz für den entsprechenden Abschnitt der FLAG-GC-A bzw. FLAG-HA-TEV-GC-A wurden jeweils Midi-Präparationen angefertigt. Die erhaltenen Plasmide wurden an Dr. Boris Skryabin (Institut für Experimentelle Pathologie, Universität Münster) gesendet. Dieser isolierte das DNA-Fragment durch Doppelverdau mit den Enzymen EcoRI und XhoI aus dem Plasmid und fertigte damit einen Southern Blot mit der genomischen DNA der transgenen Tiere an.

2.15 Genotypisierung der Mauslinien

Die für das Transgen durch Southern Blot identifizierten positiven Founder der jeweiligen Kolonie, wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Universität Würzburg mit wildtypischen FVB/N verpaart und die Nachkommen mittels PCR genotypisiert (Sabrane 2003, Sabrane 2005). Die initiale Genotypisierung mittels Southern Blot wurde im Institut für Experimentelle Pathologie der Universität Münster in der AG von Dr. Boris

Skyrabin durchgeführt. Die für diese Tierlinie erforderliche Genotypisierung mittels PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Auswahl geeigneter Primer und Reaktionsbedingungen in der AG Kuhn etabliert. Nachfolgend werden die relevanten Schritte kurz beschrieben.

2.15.1 DNA Extraktion aus Mausschwänzen

Schwanzbiopsien der Mäuse wurden mit 500 µl Verdau-Puffer (100 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % (w/v) SDS in RNase/DNase freiem Wasser) und 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 55 °C verdaut. Nach Zugabe von 700 µl Phenol wurden die Proben gemischt und zentrifugiert (13.000 g x 5 min, RT). Zu der oberen Phase mit der genomischen DNA wurden 700 µl Chloroform gegeben und die Proben zentrifugiert (13.000 g x 5 min, RT). Der Überstand wurde zu 500 µl Isopropanol gegeben, gemischt und die DNA mittels Zentrifugation (13.000 g x 3 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml hochreinem Ethanol (80 %) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 µl – 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 200 mM EDTA in RNase/DNase freiem Wasser) resuspendiert.

2.15.2 PCR zur Identifizierung transgener Tiere

Sowohl für die FLAG-GC-A-Kolonie als auch für die FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie konnten die gleichen Primer und Bedingungen zur Genotypisierung verwendet werden. Der Forwardprimer α MyHC fwd 200308 (aga gtt tga gtc gac cat gc) beginnt am Ende des α MHC-Promoters und amplifiziert mit dem Reverseprimer FLAG rev230807 (gcc agt gcg cgg tga ag) nur aus genomischer DNA transgener Tiere ein DNA-Fragment, das im DNA-Agarosegel detektiert werden kann. Zur Genotypisierung der Tiere wurde ein 20 µl PCR-Ansatz vorbereitet (0,1 mM dNTPs, 0,15 mM MgCl₂, 1 U Taq-Polymerase), dem jeweils 1 µM des Forward- bzw. Reverseprimers zugegeben wurde. Der PCR Reaktionspuffer sowie die Q-Solution wurden nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Zu jedem Reaktionsansatz

wurde 1 µl der isolierten genomischen DNA hinzugefügt und dieser im Thermocycler nach dem in Tabelle 21 aufgeführten Programm prozessiert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in einem 1,5 %igem DNA-Agarosegel (w/v) aufgetrennt.

Tabelle 21: PCR-Programm für die Genotypisierung

Programmschritt	Temperatur	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung (initial)	94 °C	120	1
Denaturierung	94 °C	30	29
Annealing	56 °C	30	
Elongation	72 °C	60	
Finale Elongation	72 °C	180	1
Cool Down	4 °C	350	1

2.16 Charakterisierung der transgenen Mauslinien

2.16.1 Homogenisierung von murinem Gewebe

Die Organe der Mäuse wurden unter tiefer Inhalationsnarkose (3 % Isofluran) entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, grob zerstoßen und im Mikro Dismembrator mit 200 µl Homogenisierungspuffer (3,2 mM NaHCO₃, 12,5 % (w/v) SDS) pulverisiert. Alle Lösungen wurden mit Proteaseinhibitoren (cOmplete mini, Roche Diagnostic, Mannheim) versetzt. Das aus dem Mikro Dismembrator erhaltene Pulver wurde anschließend mit 1 ml Homogenisierungspuffer für etwa 30 min auf Eis inkubiert, alle 5 min gevortext und zusätzlich zweimal mit der Ultraschallanzette behandelt. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (30.000 g x 30 min, 4 °C) wurde der Überstand mit einer Kanüle (Größe: 24 G) geschert. Der Proteingehalt der Proben wurde bestimmt und die Proben in Portionen á 75 µg bei -80 °C gelagert.

2.16.2 Isolierung von Kardiomyozyten

Murine adulte Kardiomyozyten wurden dankenswerterweise von Frau Katharina Völker (Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) gemäß dem Protokoll „Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from 1 Heart“ (AfCS Procedure Protocol PP00000125, O'Connell 2002) isoliert.

2.16.3 Fraktionierung von isolierten Kardiomyozyten

Zum Nachweis der membranständigen Expression des Proteins FLAG-GC-A in Kardiomyozyten transgener Mäuse wurden isolierte Kardiomyozyten lysiert und in Zytosol-, Membran- und Kernfraktion aufgetrennt. Hierzu wurden die kommerziell verfügbaren Puffer CF-Cyt (Zytosolfraktion) und CF-NE (Kernfraktion) nach Angaben des Herstellers (nanoTools, Teningen) verwendet. Die Membranfraktion wurde im Puffer CF-Mem (vgl. Tabelle 22) aufgenommen. Zu allen Puffern wurden Proteaseinhibitoren (cOmplete mini, Roche Diagnostic, Mannheim) frisch zugesetzt.

Frisch präparierte Kardiomyozyten wurden zentrifugiert (300 g x 5 min, 4 °C) und das Zellpellet in insgesamt 225 µl CF-Cyt-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 15 min (RT) wurden die Zellfragmente abzentrifugiert (1.000 g x 5 min, 4 °C) und der Überstand mit der Zytosolfraktion aserviert. Um die Membranfraktion zu gewinnen wurde das Pellet in 375 µl CF-Mem-Puffer resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (2.000 g x 5min, RT) wurde der Überstand mit der Membranfraktion aserviert. Das verbleibende Pellet wurde schließlich in 160 µl CF-NE-Puffer resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kernfraktion wurde nach Zentrifugation (12.000 g x 5min, RT) aserviert. Von allen Fraktionen wurden Aliquots für Proteinbestimmung und Western Blots getrennt aufbewahrt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des CF-Mem-Puffers

Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
Natriumpyrophosphat	2,5 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM

2.16.4 Immunpräzipitation an Kardiomyozyten transgener Tiere

Kardiomyozyten von zwei transgenen Mäusen der FLAG-HA-TEV-GC-A Kolonie wurden wie zuvor unter 2.16.2 (Seite 65) beschrieben isoliert und fraktioniert (vgl. 2.16.3, Seite 65). Für die IP wurden die Membranfraktionen gepoolt und für 1 h bei 4 °C mit 75 µl Protein A Agarose inkubiert um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Agarose zu beseitigen. Nach Zentrifugation (2.000 g x 5 min, 4 °C) wurde der Überstand auf die zuvor mit BSA (10 mg/ml BSA in PBS, 20 min, 4 °C) abgesättigten Agarosebeads mit dem gekoppelten anti-HA-Antikörper gegeben. Die Inkubation mit der anti-HA-Agarose erfolgte für 4 h bei 4 °C und unter leichter Rotation. Die Protein A-Agarose (Präabsorption) wurde mit 150 µl Laemmli-Puffer (3-fach) versetzt und bei 72 °C für 10 min gekocht um die unspezifische Bindung von FLAG-HA-TEV-GC-A an die Agarose im Western Blot überprüfen zu können. Die anti-HA-Agarose wurde dreimal mit 500 µl CF-Mem-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mittels pH-shift in einer Lösung aus 0,1 M Glycin und HCl (pH 2,5). Der Überstand mit der Elution wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Neutralisationspuffer (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 9,5) neutralisiert (pH 7,0). Dieser Elutionsschritt wurde zweimal jeweils für 10 min bei Raumtemperatur ausgeführt. Zu 1 ml Elutionspuffer wurden 91,33 µl Neutralisationspuffer gegeben. Die Methode des pH-shifts wurde gewählt, da die enzymatische

Trennung des Präzipitats mit Hilfe der TEV-Protease zu diesem Zeitpunkt noch nicht zufriedenstellend etabliert war (vgl. 3.2.2, Seite 90).

2.16.5 Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit ANP

Nach Präparation adulter Kardiomyozyten (vgl. 2.16.2, Seite 65) wurden 20 µl der Zellsuspension überführt um die Zellzahl zu bestimmen. Während des Zählvorgangs konnten sich die Kardiomyozyten für 30 min absetzen. Der Überstand mit toten Zellen und Zelltrümmern wurde abgenommen und das Pellet in 2 ml „Myocyte stopping buffer 2“ (AfCS Solution Protocol PS00000450, Kachura 2002) mit 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) (final: 1 mM) resuspendiert. Je 250 µl der Zellsuspension wurden auf Reaktionsgefäße verteilt und mit IBMX für 15 min inkubiert. Ein Reaktionsgefäß mit Kardiomyozyten wurde zur Proteinbestimmung verwendet.

Zu je 250 µl Zellsuspension wurde ANP in einer finalen Konzentration von 10 nM und 100 nM gegeben und für 10 min inkubiert. Durch die Zugabe von 550 µl Ethanol (100 %, -20 °C) wurde die Stimulation gestoppt und die Reaktionsansätze über Nacht bei -80 °C gelagert. Am Folgetag wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (16.000 g x 5 min, 4 °C) und der Überstand im Vakuum getrocknet.

Für den cGMP-RIA wurde der getrocknete Überstand anschließend in 250 µl einer 50 mM Natriumacetat-Lösung resuspendiert. Davon wurden 150 µl acetyliert und 2 x 50 µl in den cGMP-RIA gegeben (vgl. 2.12.3, Seite 55).

2.17 Behandlung von Tieren mit Angiotensin II über osmotische Minipumpen

Die Behandlung von Tieren mit Angiotensin II über osmotische Minipumpen erfolgte sowohl im ersten als auch im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit und wurde von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-2531.01-72/09). Für alle Versuche mit osmotischen Minipumpen

wurden nur männliche Tiere (etwa 10 – 12 Wochen alt) ausgewählt um mögliche Varianzen aufgrund geschlechtsspezifischer Unterschiede innerhalb der jeweiligen Gruppe auszuschließen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das alternative Spleißen eine Rolle bei der Angiotensin II-induzierten negativen Regulierung des NP/GC-A-Systems durch Angiotensin II spielt. Hierzu wurden die Tiere (C57BL/6) über einen Zeitraum von 7 Tagen mit 300 ng/kg/min Angiotensin II über osmotische Minipumpen (Model 2002, Fa. Alzet, Charles River, Sulzfeld) behandelt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Behandlung von Tieren mit Angiotensin II durchgeführt, um die Frage zu klären, ob die transgenen Tiere durch die kardiomyozytenspezifische Überexpression der GC-A gegen Angiotensin II-induzierte Herzhypertrophie und Fibrose geschützt sind. Hierzu wurden Tiere der FLAG-GC-A-Kolonie ausgewählt. Für die Applikation von Angiotensin II (300 ng/kg/min oder 1.000 ng/kg/min) über eine Dauer von 14 Tagen wurden osmotische Minipumpen (Model 2002, Fa. Alzet, Charles River, Sulzfeld) verwendet.

2.17.1 Vorbereitung und Aktivierung der Minipumpen

Die Pumpen wurden nach den Angaben des Herstellers mit der erforderlichen Menge an Angiotensin II gefüllt und über Nacht in einer sterilen 0,9 %igen NaCl-Lösung bei 37 °C aktiviert.

2.17.2 Implantation der Pumpen

Die Implantation der osmotischen Minipumpen wurde dankenswerterweise von Frau Katharina Völker (Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) vorgenommen. Das jeweilige Tier wurde mit 2 % Isofluran (Abbott, Ludwigshafen) betäubt und mit dem Bauch nach unten auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert. Der Operationsbereich wurde am Rücken enthaart, desinfiziert und durch einen medialen Schnitt eröffnet. Entlang der

Wirbelsäule wurde über diesen Schnitt unter der Haut ein Kanal in Richtung Kopf freigelegt. Die zuvor aktivierte osmotische Minipumpe wurde in diese subkutane Tasche geschoben und der Hautschnitt mit einem Faden (Prolene 7-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Die Nahtstelle wurde mit Bepanthen[®]-Creme versorgt und das Tier anschließend in einem Einzelkäfig unter eine Wärmelampe gelegt. Die Wärmelampe wurde entfernt sobald das Tier wieder vollständig wach und mobil war. Der Hautschnitt und der Sitz der Pumpe wurden mehrmals täglich kontrolliert. Kontrolltiere wurden ebenfalls operiert ohne jedoch eine Pumpe einzusetzen.

2.17.3 Blutdruckmessung an den Versuchstieren

Der Blutdruck der Versuchstiere aus der FLAG-GC-A-Kolonie wurde nicht invasiv mittels Schwanzplethysmographie ermittelt. Bereits vor Beginn der Messungen wurden die ausgewählten Tiere an die Versuchsapparatur gewöhnt. Die Apparatur bestand aus einer Röhre und zugehöriger Wärmeverrichtung, in der die Maus bei 32 °C fixiert werden konnte. Anschließend wurde die Blutdruckmanschette um den Schwanz der Maus gelegt. Die Messungen erfolgten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen für maximal 15 min jeweils zur gleichen Tageszeit. Die Werte wurden sowohl vor als auch nach Implantation von osmotischen Minipumpen erfasst. Die Aufzeichnung der Parameter erfolgte nach einer 3-tägigen Gewöhnungsphase.

2.17.4 Beendigung der Versuchsreihen

Nach der vorgesehenen Behandlungsdauer von 7 bzw. 14 Tagen wurden die Organe der Tiere unter tiefer Inhalationsnarkose (3 % Isofluran) zügig entfernt. Das Herz wurde in Krebs-Henseleit-Lösung (113 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂, 5,7 mM Glukose) überführt und das Gesamtgewicht (HG) sowie das

Gewicht von linkem (LV) und rechten Ventrikel (RV) notiert. Für morphometrische und histologische Untersuchungen wurden Gewebeproben von linkem und rechtem Ventrikel in Formalin (4 %) fixiert. Neben dem Herz wurden auch Lunge, Nieren, teile der Leber sowie die Milz entnommen. Alle Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.17.5 Extraktion von cGMP aus murinem Gewebe

Die tiefgefrorenen linken Ventrikel der FLAG-GC-A-Mäuse aus der Angiotensin II Studie wurden im Mikro Dismembrator homogenisiert (vgl. 2.16.1, Seite 64). Ein Teil des Homogenates wurde in eiskalten Ethanol (70 %) überführt und für 30 min auf Eis inkubiert und mit der Ultraschalllanze bearbeitet. Die Proben wurden zentrifugiert (12.000 g x 10 min, 4 °C) und je 250 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde zur Proteinbestimmung verwendet. Der Überstand wurde im Vakuum eingengt, in 300 µl Natriumacetat (pH 6,0) aufgenommen und im cGMP-RIA eingesetzt. Der cGMP-Gehalt jeder Probe wurde auf die zuvor ermittelte Proteinmenge normiert.

2.17.6 Histologie und Morphometrie

Zur Erfassung möglicher Unterschiede zwischen transgenen und wildtypischen Tieren in der Entwicklung einer Angiotensin II-induzierten Herzhypertrophie wurden die Durchmesser der Kardiomyozyten von Tieren aus der Kontroll- und Angiotensin II-Gruppe erfasst. Hierzu wurden die zuvor von transgenen und wildtypischen Tieren in Formalin (4 %) fixierten Proben in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hideo Baba (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen) in Paraffin eingebettet und geschnitten. Um für die Vermessung der Kardiomyozytendurchmesser die lipidreichen Zellmembranen und den Zellkern gut darzustellen wurden die Schnitte mittels PAS-Reaktion gefärbt

(Klaiber 2010). Das Material aus dem linken Ventrikel wurde von Alexandra Gazinski in einer als Blindstudie angelegten Auswertung analysiert. Hierzu wurden zunächst unter dem Mikroskop, bei zwanzigfacher Vergrößerung mit einer aufgesetzten Farbkamera, Bilder der gefärbten Kardiomyozyten aufgenommen und mit der cell^M Software (Olympus Europe, Hamburg) ausgewertet. Der Durchmesser der Kardiomyozyten aus den linken Ventrikeln wurde auf Höhe des Zellkerns erfasst (Holtwick 2002).

2.18 Echokardiographie

Einen Tag vor und 2 Wochen nach Implantation der osmotischen Minipumpen (1.000 ng/kg/min Ang II) wurden die Versuchstiere der FLAG-GC-A-Kolonie dankenswerterweise von Frau Barbara Bayer (AG Prof. Dr. S. Frantz, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universität Würzburg) untersucht. Für die transthorakale Echokardiographie wurden die Tiere unter leichter Inhalationsnarkose (2 % Isofluran) in Rückenlage mit einem Klebeband auf einer Wärmeplatte fixiert und der linken Ventrikel parasternal (PA) mittels zweidimensionaler Bildgebung vermessen. Die enddiastolische (EDD) und der endsystolische (ESD) Durchmesser der linken Ventrikelkammer erfasst und anhand der Formel

$$(EDD - ESD) / EDD$$

die fraktionelle Verkürzung (FS, engl. Fractional Shortening) errechnet (Tanaka 1996, Frantz 2004, Grau 2009, Frantz 2013). Ebenso wurde auf dieser Ebene die enddiastolische Wanddicke der Vorder- (EDVW) und Hinterwand (EDPW) dokumentiert.

2.19 Datenauswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Erfassung und Auswertung sowie statistische Bewertung der Daten erfolgte in Microsoft Excel™. Mit dieser Software wurden die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Strichmarkierungen innerhalb der im Ergebnisteil eingebetteten Diagramme kennzeichnen die

Standardabweichung des Mittelwertes. Die Daten der FRET-Messungen wurden mittels Origin (Origin Lab Corporation, Northampton, USA) ausgewertet. Die graphische Aufbereitung der Ergebnisse erfolgte mittels SigmaPlot (Systat Software, Erkrath) sowie Origin. Zur Bewertung der erhaltenen Daten bei Vergleich von mindestens zwei Gruppen wurde der ungepaarte t-Test in Microsoft Excel™ herangezogen. Für alle Ergebnisse des t-Tests wurde ein Wert von kleiner 0,05 ($p < 0,05$) als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung einer Isoform des GC-A-Rezeptors

(GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330)

3.1.1 GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 wird translatiert und als membranständiges Protein exprimiert

Im Rahmen des ersten Teils der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die Isoform des GC-A-Rezeptors (GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330) untersucht. Dieser Isoform des GC-A-Rezeptors fehlen 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne. Aufgrund dessen wurde zunächst überprüft, ob die Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 , ebenso wie der wildtypische GC-A-Rezeptor, als Transmembranprotein in transient transfizierten HEK 293-Zellen exprimiert wird. Um dies zu überprüfen wurden in zwei unabhängigen Experimenten HEK 293-Zellen mittels FuGENE[®]6 Transfektionsreagenz transient mit dem Plasmid *pGC-A wt* oder *pGC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330* transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min mit NHS-LC-Biotin (Perbio Science, Bonn) inkubiert um die Oberflächenproteine zu biotinylieren. Die Zellen wurden geerntet, aufgebrochen und die biotinylierten Oberflächenproteine mittels Avidin-Agarose präzipitiert. Sowohl das Zelllysate als auch das Eluat aus dieser Immunpräzipitation (IP) mit Avidin-Agarose wurden auf ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Nachweis der Proteine wurde ein Antikörper gegen GC-A (vgl. Tabelle 14, Seite 44) verwendet. Abbildung 10 zeigt, dass sowohl GC-A wt als auch GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 gleichermaßen an der Oberfläche der transient transfizierten HEK 293-Zellen präsentiert werden. Die Auswertung der Bandenintensität zeigte, dass das Verhältnis von biotinyliertem GC-A-Protein zur Menge an GC-A-Protein im Zelllysate für die untersuchten Rezeptorisoformen annähernd gleich ist.

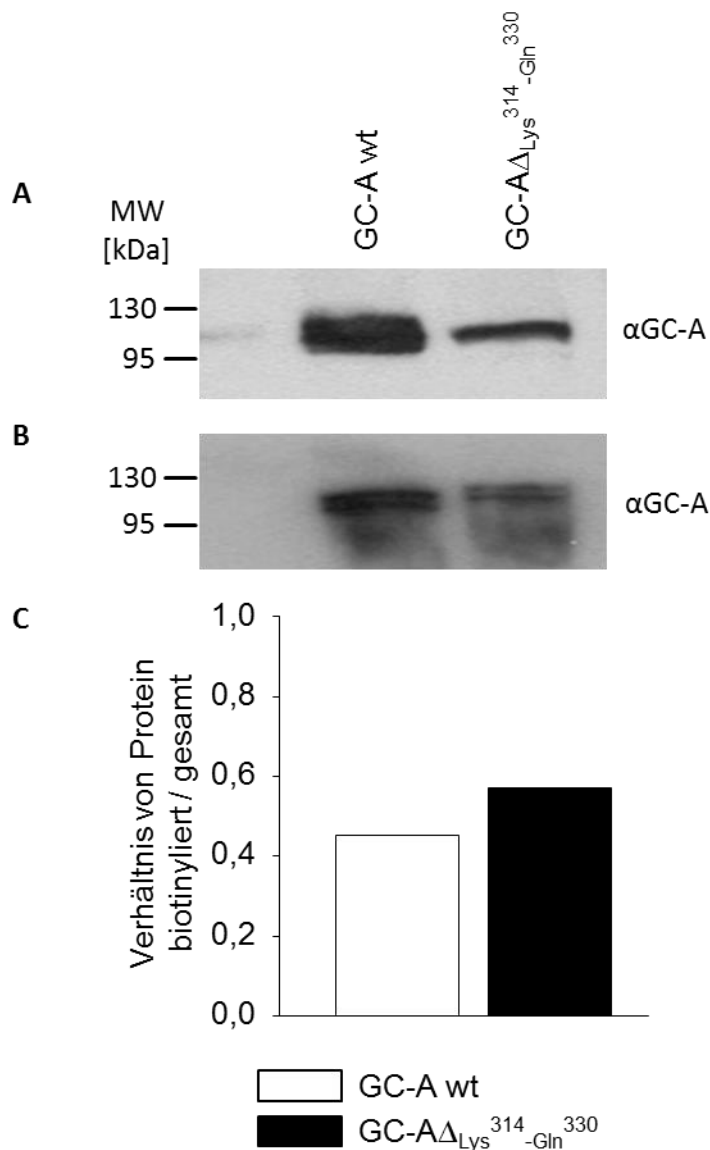


Abbildung 10: Western Blot nach Oberflächenbiotinylierung und Aufreinigung biotinylierter Proteine mit Avidin-Agarose sowie Densitometrie

HEK 293-Zellen wurden transient mit dem Plasmid *pGC-A wt* oder *pGC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$ -Gln* transfiziert und die Oberflächenproteine anschließend biotinyliert. In einem 7,5 %igem SDS-Gel wurden (A) 20 μ g Proteinextrakt (Zelllysate) und (B) 30 μ l der Elution nach Präzipitation biotinylierter Oberflächenproteine mit Avidin-Agarose aufgetragen. Beide Proben wurden mit einem Antikörper analysiert, der gegen den C-Terminus der GC-A gerichtet ist. Der Western Blot zeigte, dass beide GC-A-Rezeptoren exprimiert und biotinyliert werden. Sie werden somit an der Oberfläche von transient transfizierten HEK 293-Zellen präsentiert. (C) Die densitometrische Auswertung der Banden von Gesamtlysate (A) und Eluat (B) zeigte, dass das Verhältnis von biotinylierter GC-A zur Menge der GC-A im Gesamtlysate annähernd gleich ist. Das Fehlen der 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne scheint daher keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression der Isoform GC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$ -Gln zu haben.

Ergänzend zu den Biotinylierungsexperimenten wurden dankenswerterweise von Juliane Schröter (Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) Zellfraktionierungsversuche an transient transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Isoform der GC-A als auch der wildtypische GC-A-Rezeptor gleichermaßen und überwiegend in der Membranfraktion transfizierter Zellen lokalisiert ist (vgl. Abbildung 11, Seite 76). Ein deutlich geringerer Anteil beider Rezeptoren wurde auch in der Zytosolfraktion dieser Zellen nachgewiesen. Dies ist möglicherweise auf die künstliche Überexpression zurück zu führen. Durch diese Experimente kann somit ausgeschlossen werden, dass die Deletion der Aminosäuren Lys³¹⁴ bis Gln³³⁰ einen Einfluss auf die Expression der Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ sowie dessen Membranlokalisation haben (Hartmann 2008).

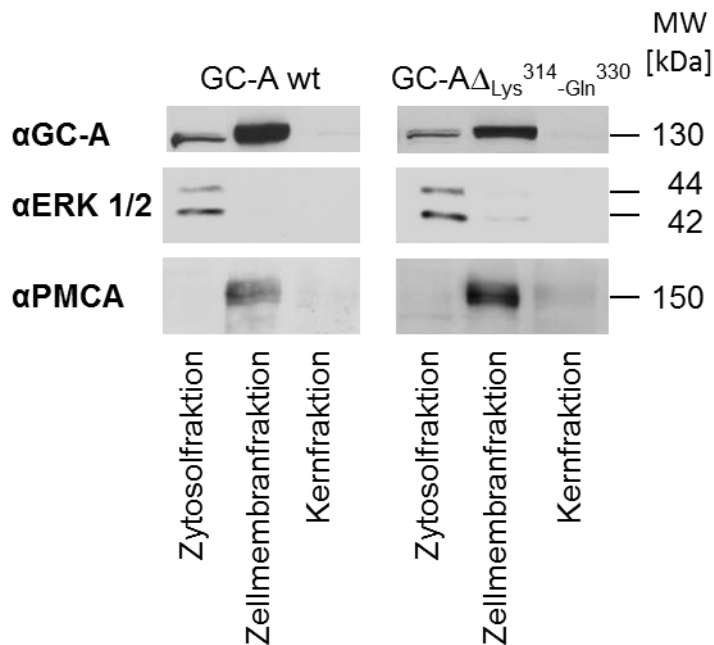


Abbildung 11: Zellfraktionierung an transient transfizierten HEK 293-Zellen zur Überprüfung der membranständigen Expression von GC-A und GC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$ (Hartmann 2008).

HEK 293-Zellen wurden transient mit den Plasmiden *pGC-A wt* oder *pGC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$* transfiziert, lysiert und in Zytosol-, Membran- und Kernfraktion aufgeteilt. Die Fraktionen wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen GC-A analysiert. Zur Charakterisierung der Zytosolfraction wurde ein Antikörper gegen die zytosolischen Proteine ERK 1/2 und für die Membranfraktion ein Antikörper gegen das membranständige Protein Plasmamembran-Kalzium-ATPase (PMCA) verwendet. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass sowohl GC-A wt, als auch die Isoform GC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$ vornehmlich in der Zellmembran lokalisiert sind. Diese Experimente wurden von Juliane Schröter (Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt.

3.1.2 Stimulierbarkeit der Isoform GC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$ mit ANP

Da durch die Biotinylierungsexperimente nachgewiesen werden konnte, dass GC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$ an der Zellmembran von transient transfizierten HEK 293-Zellen lokalisiert ist, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Isoform GC-A $\Delta_{Lys}^{314-Gln}^{330}$ mit ANP zur Bildung von cGMP stimuliert werden kann. Hierzu wurden Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimente durchgeführt und der intrazelluläre Anstieg der cGMP-Konzentration mittels eines Sensors für cGMP in Echtzeit visualisiert und das Signal gemessen. Ergänzend wurden Zellen in 24-Loch-Platten mit

ANP stimuliert und anschließend die Menge an gebildetem cGMP im cGMP-Radioimmunoassay (cGMP-RIA) quantifiziert.

3.1.2.1 Analyse der ANP-vermittelten Bildung von cGMP mittels FRET

Für FRET-Experimente wurden HEK 293-Zellen mit dem Plasmid für den cGMP-Sensor (*pGES-DE2*) und dem Plasmid *pGC-A wt* oder *pGC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* kotransfiziert. Am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg wurde das FRET-Signal (YFP/CFP) basal, sowie nach extrazellulärer Applikation von 10 nM ANP, aufgezeichnet. Die intrazelluläre Bildung von cGMP konnte über diese Methode an einzelnen Zellen in Echtzeit gemessen werden (vgl. Abbildung 12 A, Seite 78). Die Auswertung der FRET-Signale (vgl. Abbildung 12 B, Seite 78) zeigte, dass HEK 293-Zellen, die den wildtypischen GC-A-Rezeptor und den Sensor für cGMP koexprimieren, nach Zugabe von 10 nM ANP einen schnellen und anhaltenden Anstieg des FRET-Signals aufweisen. Extrazellulär appliziertes ANP führt somit in diesen Zellen zur intrazellulären Bildung von cGMP. Im Vergleich dazu zeigen die Messungen an HEK 293-Zellen, welche die Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 und den cGMP-Sensor koexprimieren, keine Änderung des FRET-Signals.

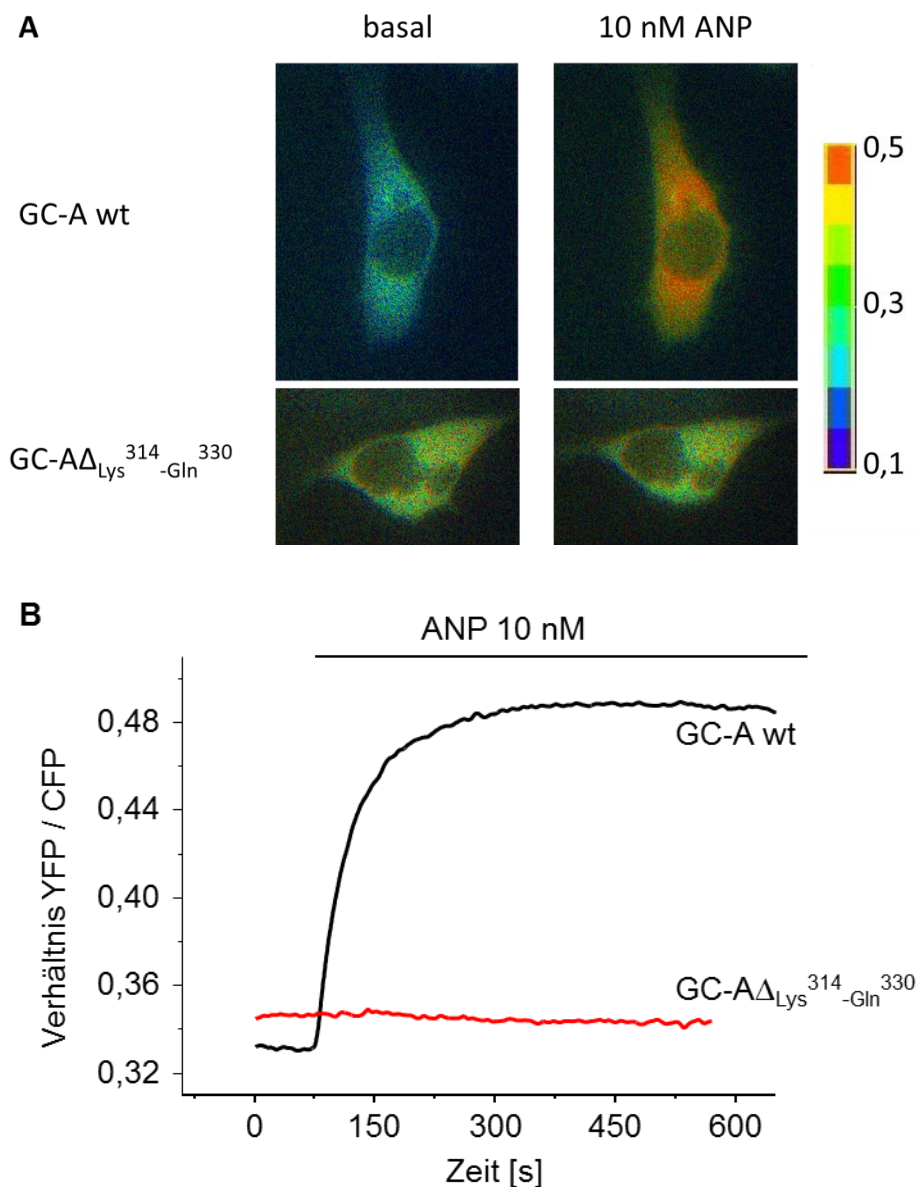


Abbildung 12: FRET-Experimente an transient transfizierten HEK 293-Zellen zur Überprüfung der ANP-vermittelten cGMP-Bildung.

(A) Ratiometrische Aufnahmen einzelner, transient transfizierter HEK 293-Zellen vor und 5 min nach Stimulation mit 10 nM ANP. (B) Repräsentative Aufzeichnungen der FRET-Signale von einzelnen HEK 293-Zellen, die den Sensor für cGMP und entweder den wildtypischen GC-A-Rezeptor oder die Mutante GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ transient exprimieren. Die Ergebnisse zeigen, dass HEK 293-Zellen, die GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ exprimieren mit 10 nM ANP nicht zur intrazellulären Bildung von cGMP stimuliert werden können.

Die Auswertung mehrerer Versuchsreihen ($n = 6$) zeigt, dass nur HEK 293-Zellen, die den Sensor für cGMP und den wildtypischen GC-A-Rezeptor koexprimieren mit einem Anstieg des FRET-Signals (dargestellt als

Verhältnis YFP/CFP) reagieren. Dies konnte bei keiner der analysierten HEK 293-Zellen, die GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 und den Sensor für cGMP transient koexprimieren, nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 13). Diese Experimente lassen den Schluss zu, dass die Rezeptor-Mutante GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 inaktiv ist.

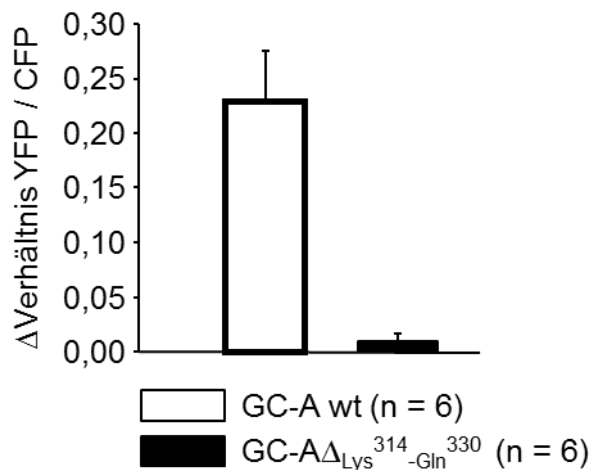


Abbildung 13: Zusammenfassung der FRET-Experimente an transient transfizierten HEK 293-Zellen.

Die Auswertung mehrerer Messungen ($n = 6$) an transient transfizierten HEK 293-Zellen, die mit dem Sensor für cGMP und dem wildtypischen GC-A-Rezeptor oder GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 kotransfiziert wurden, zeigen, dass GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 , im Vergleich zum wildtypischen GC-A-Rezeptor, mit 10 nM ANP nicht zur intrazellulären Bildung von cGMP stimuliert werden kann.

3.1.2.2 ANP-Stimulation und Quantifizierung des gebildeten cGMPs mittels cGMP-RIA

Um die Ergebnisse der FRET-Experimente zu bestätigen, wurde die unter ANP-Stimulation gebildete Menge an cGMP in transient mit dem Plasmid $pGC-A$ wt oder $pGC-A\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 transfizierten HEK 293-Zellen quantifiziert. Die Expression des jeweiligen GC-A-Rezeptors wurde im Western Blot mit einem Antikörper gegen GC-A (vgl. Tabelle 14, Seite 44) nachgewiesen. Wie in nachfolgender Abbildung 14 (Einschub) dargestellt, ist die im Western Blot analysierte Expression von GC-A wt mit der von GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 vergleichbar. Jedoch gibt es zwischen den beiden GC-A-Isoformen deutliche Unterschiede in der im cGMP-RIA ermittelten Menge

an cGMP. Während HEK 293-Zellen, die transient den wildtypischen GC-A-Rezeptor exprimieren, nach Applikation von ANP in Konzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM einen konzentrationsabhängigen Anstieg des gemessenen cGMPs aufweisen, zeigten Zellen, die GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ exprimieren, keine Reaktion.

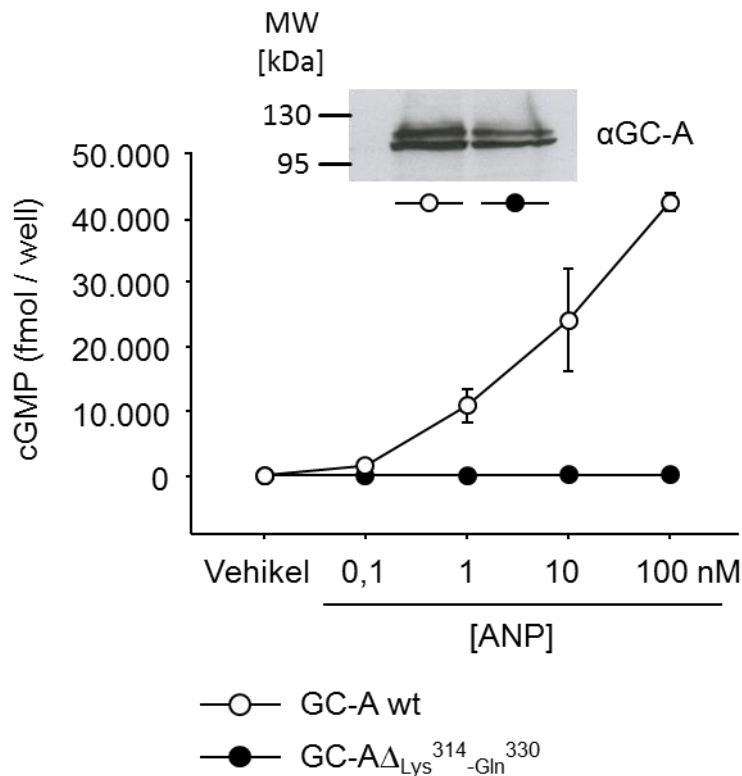


Abbildung 14: Aktivität des wildtypischen GC-A-Rezeptors und der Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$.

Ermittelte Menge an cGMP ($n = 4$) nach Stimulation mit der angegebenen Konzentration an ANP über 10 min. Die HEK 293-Zellen wurden transient mit dem Plasmid für GC-A wt bzw. GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ transfiziert und intrazellulär gebildetes cGMP im cGMP-RIA gemessen. Der Nachweis in etwa gleicher Proteinmengen für GC-A wt und die Isoform wurde mittels eines Antikörpers gegen GC-A (Einschub) im Western Blot nachgewiesen. Nur der wildtypische GC-A-Rezeptor bildet durch Stimulation mit ANP konzentrationsabhängige Mengen an cGMP. Dieser Effekt konnte für die Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ nicht beobachtet werden.

3.1.2.3 Die Mutation zu GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ führt zum Verlust der ANP-Bindungsfähigkeit

Mittels Biotinylierungsexperimenten an transient transfizierten HEK 293-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ an

der Zelloberfläche präsentiert wird (vgl. 3.1.1, Seite 73). Jedoch zeigten die Stimulationsexperimente mit dem Liganden ANP keine intrazelluläre cGMP-Bildung. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde überprüft, ob das Fehlen von 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne die Bindung des Liganden ANP an diese Domäne negativ beeinflusst. Hierzu wurden in der AG Kuhn ANP-Bindungsassays an transient mit *pGC-A wt* oder *pGC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$* transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt.

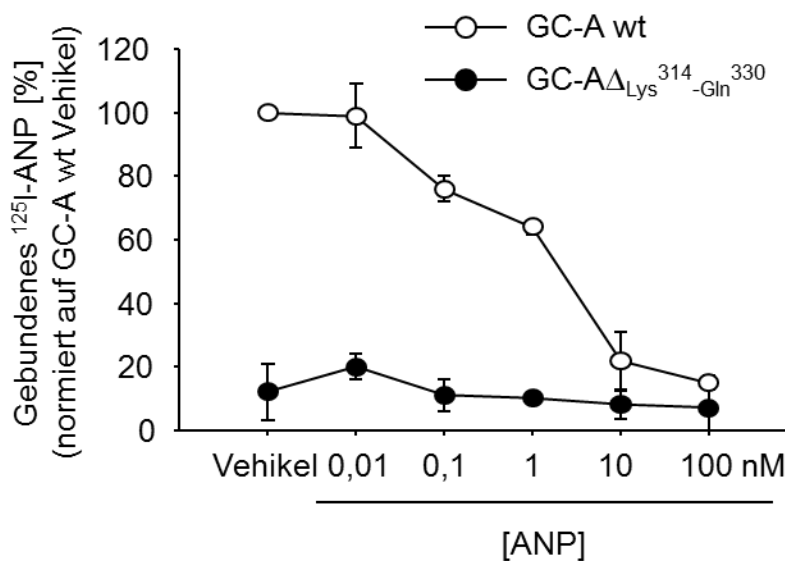


Abbildung 15: Bindung von ANP an den wildtypischen GC-A-Rezeptor und an die Isoform GC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$ (Hartmann 2008).

HEK 293-Zellen wurden transient mit dem Plasmid für GC-A wt oder GC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$ transfiziert und nachfolgend mit ^{125}I -ANP, in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen von nicht markiertem ANP, inkubiert. Die Menge an gebundenem ^{125}I -ANP wurde mit einem γ -Counter quantifiziert ($n = 4$). Die Bindung von ^{125}I -ANP an den wildtypischen GC-A-Rezeptor, in Abwesenheit von nicht markiertem ANP, wurde als 100 % gesetzt. Die spezifische Aktivität von ^{125}I -ANP lag bei 904 Ci/mmol.

Das Ergebnis dieser Bindungsstudien (vgl. Abbildung 15) zeigt, dass das Protein GC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$ nicht in der Lage ist ANP zu binden und somit die katalytische Zyklasedomäne über diesen Weg auch nicht aktiviert werden kann (Hartmann 2008).

3.1.3 Der wildtypische GC-A-Rezeptor und die Mutante GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 bilden Heterodimere

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war die Untersuchung inaktivierender posttranslationaler Modifikationen des GC-A-Rezeptors. Im Zuge der Charakterisierung der Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 konnte durch die zuvor geschilderten Ergebnisse gezeigt werden, dass dieses Protein zwar an der Oberfläche von transient transfizierten HEK 293-Zellen exprimiert wird, jedoch nicht in der Lage ist den Liganden ANP zu binden. Da der Isoform lediglich 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne fehlen und somit keine strukturellen Auswirkungen auf die intrazelluläre Dimerisierungsdomäne vermutet wurden, erfolgte im nächsten Schritt die Analyse, ob der wildtypische GC-A-Rezeptor mit der Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 Heterodimere bilden kann. Da sich der wildtypische Rezeptor (~130 kDa) und die Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 (~128 kDa) nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden, war ein spezifischer Nachweis nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Gel mit einem Antikörper gegen GC-A nicht realisierbar. Um diese eindeutige Unterscheidung zwischen dem wildtypischen GC-A-Rezeptor und der Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 herbeiführen zu können, wurde für die geplanten Koimmunpräzipitationsexperimente, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, das Plasmid *pHA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* generiert. Diesem Plasmid wurde, analog zum Plasmid *pFLAG-GC-A* (Chinkers 1989), mittels PCR-Mutagenese (vgl. 2.5.1, Seite 33 sowie 2.5.2, Seite 38) unmittelbar hinter dem Signalpeptid die kodierende Sequenz für ein HA-tag eingefügt.

Die Hypothese der Bildung von Heterodimeren des FLAG-Epitop-getaggen, wildtypischen GC-A-Rezeptors mit der HA-Epitop-getaggen Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 wurde im Rahmen von Koimmunpräzipitationsversuchen überprüft. Hierzu wurden HEK 293-Zellen mittels FuGENE[®]6 Transfektionsreagenz transient transfiziert. Transfektionsansatz 1 (Tr1) enthielt die Plasmide *pFLAG-GC-A* und

pcDNA3, Transfektionsansatz 2 (Tr2) die Plasmide *pFLAG-GC-A* und *pHA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* und Transfektionsansatz 3 (Tr3) die Plasmide *pHA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* und *pcDNA3*. Es wurde in allen Reaktionsansätzen eine annähernd gleiche Anzahl von Zellen mit der gleichen Menge an cDNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit IP-Puffer (vgl. 2.11.1, Seite 50) lysiert und das Zelllysate für die Immunpräzipitation mit anti-FLAG-M2-Agarosebeads (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Das Zelllysate sowie das Eluat der IP wurden in einem 7,5 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Zelllysate wurden die Zielproteine (FLAG-GC-A, HA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330) mit einem Antikörper gegen GC-A, das FLAG- sowie das HA-Epitop nachgewiesen. Der Nachweis der Proteine FLAG-GC-A und HA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 nach IP in den gekochten Agarosebeads erfolgte mit einem Antikörper gegen das FLAG- sowie gegen das HA-Epitop. Mit dem in Abbildung 16 dargestelltem Ergebnis der Koimmunpräzipitation wurde der Nachweis erbracht, dass der wildtypische GC-A-Rezeptor und die Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 Heterodimere bilden können.

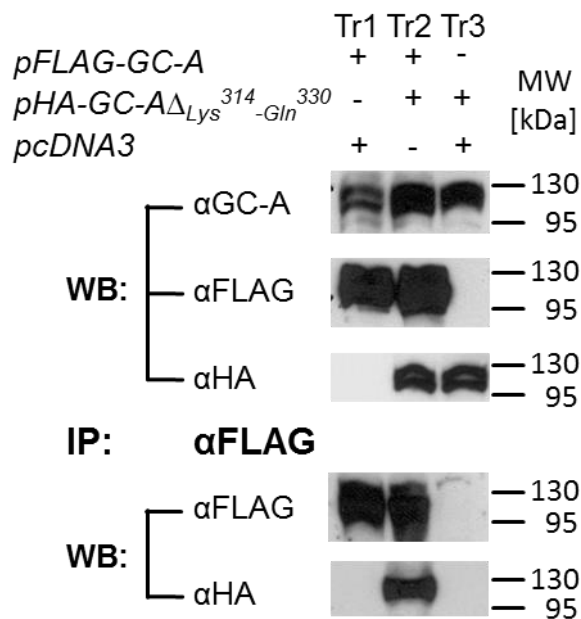


Abbildung 16: Koimmunpräzipitation von FLAG-GC-A und HA-GC-A Δ_{Lys}^{314} $_{-Gln}^{330}$. HEK 293-Zellen wurden wie dargestellt transient mit den Plasmiden *pFLAG-GC-A*, *pHA-GC-A Δ_{Lys}^{314} $_{-Gln}^{330}$* oder *pcDNA3* kotransfiziert. An den Zelllysaten der drei Transfektionsansätze (Tr1, Tr2, Tr3) wurde nachfolgend eine Immunpräzipitation (IP) mit anti-FLAG-Agarose durchgeführt. Anschließend wurden die Zelllysate und die gekochten Agarosebeads mit Antikörpern gegen GC-A, das FLAG- und das HA-Epitop im Western Blot analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass der FLAG-getaggte wildtypische Rezeptor mit der HA-getaggten Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} $_{-Gln}^{330}$ Heterodimere bildet.

3.1.4 Einfluss der Bildung von Heterodimeren auf die Aktivierbarkeit der GC-A durch den Liganden ANP

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} $_{-Gln}^{330}$, durch die Deletion von 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne, die Fähigkeit zur Bindung des Liganden ANP verloren hat, gleichzeitig aber in der Lage ist Heterodimere mit dem wildtypischen GC-A-Rezeptor zu bilden, wurde nachfolgend die Auswirkung der Heterodimerisierung, in Bezug auf die Stimulierbarkeit des GC-A-Rezeptors mit ANP, analysiert. Hierzu wurden HEK 293-Zellen transient mittels FuGENE[®]6 Transfektionsreagenz in 24-Loch-Platten transfiziert. Transfektionsansatz 1 enthielt das Plasmid *pFLAG-GC-A*, Transfektionsansatz 2 die Plasmide *pFLAG-GC-A* und *pHA-GC-A Δ_{Lys}^{314} $_{-Gln}^{330}$* . Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion zur Inhibition von Phosphodiesterasen (PDE) mit dem PDE-Inhibitor 3-Isobutyl-1-

Methylxanthin (IBMX, final: 0,5 mM) für 15 min vorbehandelt und danach mit ANP in einer finalen Konzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM für weitere 10 min inkubiert. Das auf diesen Stimulus hin gebildete cGMP wurde im cGMP-RIA quantifiziert. Zum Nachweis der Proteinmengen in den beiden Ansätzen, wurden 10 µg Proteinlysate im Western Blot mit einem Antikörper gegen GC-A analysiert.

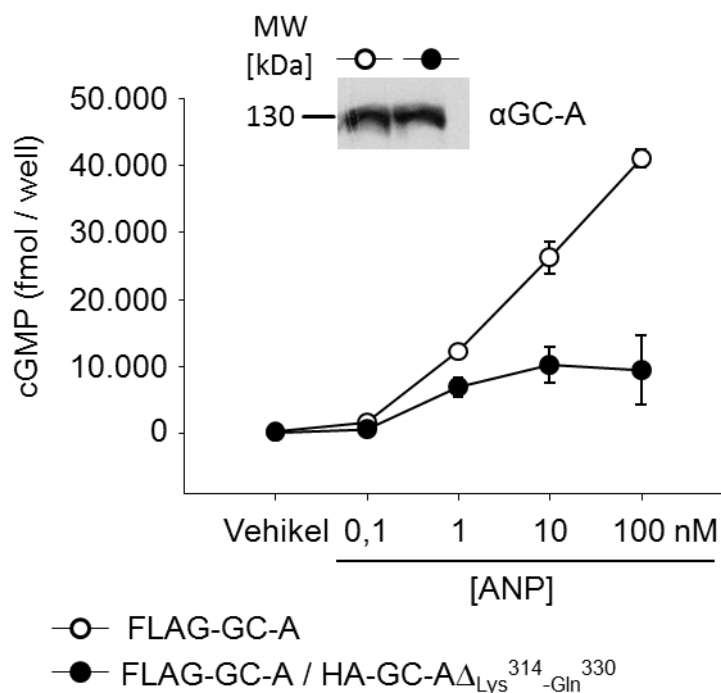


Abbildung 17: ANP-induzierte Aktivität der Guanylatzyklase an kotransfizierten HEK 293-Zellen.

Ermittelte Menge an cGMP ($n = 3$) nach Stimulation mit den angegebenen ANP-Konzentrationen über 10 min. Die HEK 293-Zellen wurden transient mit gleichen Mengen der Plasmide *pFLAG-GC-A* bzw. *pFLAG-GC-A* und *pHA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* transfiziert, mit ANP stimuliert und intrazellulär gebildetes cGMP im cGMP-RIA quantifiziert. Der Nachweis gleicher Proteinmengen für GC-A wurde mittels eines Antikörpers gegen GC-A (Einschub) im Western Blot erbracht. Das Experiment zeigt, dass die zuvor nachgewiesene Bildung von Heterodimeren die Aktivierbarkeit des wildtypischen GC-A-Rezeptors beeinträchtigt.

Wie Abbildung 17 zeigt, führt die Koexpression von wildtypischer FLAG-GC-A mit HA-getaggtter Isoform GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330 und nachfolgender Stimulation mit unterschiedlichen ANP-Konzentrationen zu einer signifikant verringerten Bildung von intrazellulärem cGMP. HEK 293-Zellen, welche die Plasmide *pFLAG-GC-A* exprimieren, zeigen einen

konzentrationsabhängigen Anstieg des intrazellulär gebildeten cGMPs. Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass der wildtypische GC-A-Rezeptor und die Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}\text{-Gln}^{330}$ nicht-funktionale Heterodimere bilden, wobei die Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}\text{-Gln}^{330}$ die Rolle eines dominant negativen Regulators einnimmt.

3.1.5 Bedeutung von GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}\text{-Gln}^{330}$ für die negative Regulation des NP/GC-A Systems durch Ang II in vivo

Aus den durchgeführten in vitro Versuchen zur Charakterisierung der Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}\text{-Gln}^{330}$ wurde abgeleitet, dass alternatives Spleißen des GC-A-Gens zur Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}\text{-Gln}^{330}$ regulierend auf den wildtypischen GC-A-Rezeptor wirken könnte. Um zu analysieren inwieweit das alternative Spleißen eine Bedeutung für die negative Regulation des NP/GC-A-Systems unter Angiotensin II in vivo hat, wurden Mäuse (n = 10) über einen Zeitraum von 7 Tagen mit einer Dosis von 300 ng/kg/min über osmotische Minipumpen behandelt. Dieser Ansatz wurde gewählt, da anhand von in vitro Studien gezeigt wurde, dass Angiotensin II den GC-A-Rezeptor desensibilisiert (Arise 2006). Teilweise wird diese Beobachtung der Dephosphorylierung intrazellulärer Domänen des GC-A-Rezeptors zugeschrieben (Potter 2001). Anhand dieses Experimentes sollte nun geprüft werden, ob Angiotensin II alternatives Spleißen fördert und zum Funktionsverlust der GC-A in vivo beiträgt.

Nach Ende der Versuchsreihe wurde die mRNA aus dem Lungengewebe von Tieren der Angiotensin II-Studie sowie von Kontrolltieren (Vehikel) unter Verwendung von TRIzol[®] (Life Technologies, Darmstadt) extrahiert. Mittels quantitativer Real-Time RT-PCR (LightCycler[®] 480, Roche, Mannheim) wurde die Mengen an mRNA in der jeweiligen Probe bestimmt und das Verhältnis von GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}\text{-Gln}^{330}$ zu GC-A wt je Probe gebildet.

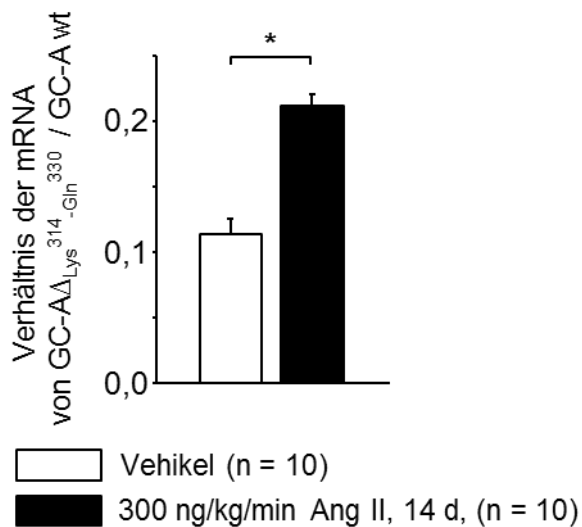


Abbildung 18: Auswirkungen der chronischen Behandlung von Mäusen mit Angiotensin II auf das alternative Spleißen der GC-A.

10 Mäuse erhielten für 7 Tage Angiotensin II (300 ng/kg/min) über osmotische Minipumpen. Anschließend wurde die mRNA aus den Lungen dieser Tiere, sowie von Kontrolltieren (n = 10 je Gruppe) isoliert und mittels quantitativer Real-Time RT-PCR das Verhältnis der mRNA von GC-AΔ_{Lys}³¹⁴_{-Gln}³³⁰ zu GC-A wt in beiden Gruppen ermittelt. Das Ergebnis zeigt, dass unter chronischer Gabe von Ang II das Verhältnis der mRNA von GC-AΔ_{Lys}³¹⁴_{-Gln}³³⁰ zu GC-A wt signifikant ansteigt (p < 0,05 gegen Vehikel).

Das Ergebnis der in vivo Studie (vgl. Abbildung 18, Seite 87) zeigte, dass der Anteil von mRNA der Isoform GC-AΔ_{Lys}³¹⁴_{-Gln}³³⁰ unter Angiotensin II im Lungengewebe signifikant zunimmt.

3.2 Charakterisierung des FLAG-HA-TEV-getaggen GC-A-Rezeptors

Der zweite Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit verfolgte insbesondere das Ziel posttranslationale Modifikationen sowie mögliche Interaktionspartner der GC-A in vivo im Herzen zu identifizieren. Aufgrund der hohen Bedeutung des ANP/GC-A-Signalwegs im Herzen, wurden deshalb zwei Mauslinien generiert, die entweder über eine kardiomyozytenspezifische Überexpression der FLAG-GC-A oder der FLAG-HA-TEV-GC-A verfügten. In der AG Kuhn lag ein Plasmid für einen GC-A-Rezeptor vor, der N-terminal über ein FLAG-Epitop verfügte (*pFLAG-GC-A*). Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Michael Chinkers (Department of Pharmacology, University of South Alabama, Mobile, USA) zur Verfügung gestellt (Chinkers 1992). Dieser GC-A-Rezeptor wurde in einer, innerhalb der AG Kuhn entstandenen, Arbeit charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass es keine funktionalen Unterschiede zwischen dem FLAG-Epitop-getaggen GC-A Rezeptor und dem wildtypischen GC-A-Rezeptor gibt (Schröter 2010). Zunächst wurde, basierend auf diesem Plasmid bzw. der darin enthaltenen cDNA-Sequenz für eine FLAG-getaggte GC-A, die kodierenden Sequenzen für ein HA-tag sowie eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease eingefügt (vgl. 2.5.3, Seite 39).

Das Einfügen der zusätzlichen Epitope wurde gewählt um die für die Charakterisierung in vivo erforderliche Aufreinigung des Rezeptors zu optimieren. Der Reinheitsgrad, insbesondere für die Proteomik, sollte damit erhöht werden. Die Verwendung von mehrfach getaggen Proteinen (Tandem-Epitop) bildet dabei ein anerkanntes Werkzeug (Zhang 2001).

Die kodierende Sequenz für das HA-Epitop wurde in das Plasmid *pFLAG-GC-A* direkt hinter der kodierenden Sequenz für das FLAG-Epitop eingefügt (FLAG-HA-Tandem-Epitop). Die Spezifität der Abspaltung von den Agarosebeads nach Immunpräzipitation (bisher etabliert: Elution mit 3-fach

FLAG-Peptid oder saure Elution) sollte durch das Einfügen der kodierenden Sequenz, für eine sieben Aminosäuren umfassende Erkennungssequenz, für die TEV-Protease, insbesondere für die geplanten massenspektrometrischen Analysen, verbessert werden. Bei der TEV-Protease handelt es sich um eine hochspezifische und gegenüber den meisten Proteaseinhibitoren insensitive Protease und ist die katalytische Domäne des Nuclear Inclusion a (NIa) Proteins (~27 kDa) des Tobacco Etch Virus (TEV) (Parks 1994, Rigaut 1999).

3.2.1 FLAG-HA-TEV-GC-A wird in HEK 293-Zellen exprimiert

HEK 293-Zellen wurden mittels PEI transient mit dem Plasmid *pGC-A wt*, *pFLAG-GC-A* sowie dem neu generierten Plasmid *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die 10 cm-Schalen mit den transfizierten Zellen lysiert (vgl. 2.11.1, Seite 50), der Proteingehalt des Zelllysates wurde ermittelt, 10 µg Proteinlysate auf ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper gegen GC-A (αGC-A), das FLAG- (αFLAG) sowie das HA-Epitop (αHA) verwendet.

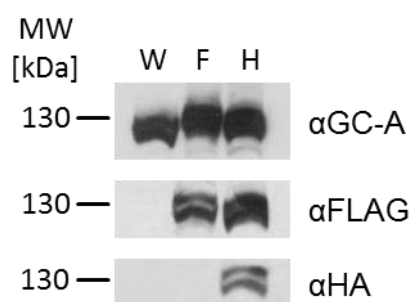


Abbildung 19: Western Blot zur Überprüfung der Expressionsfähigkeit der GC-A in HEK 293-Zellen sowie Nachweis der Epitope.

10 µg Zelllysate aus transient transfizierten HEK 293-Zellen wurde im Western Blot analysiert. In einem 7,5 %igem SDS-Gel wurden die Proteinextrakte aus HEK 293-Zellen, die transient mit den Plasmiden *pGC-A wt* (W), *pFLAG-GC-A* (F) oder *pFLAG-HA-TEV-GC-A* (H) transfiziert wurden, aufgetragen. Nach Expression des im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit generierten Plasmids *pFLAG-HA-TEV-GC-A* in HEK 293-Zellen kann das Protein GC-A, sowie die daran gekoppelten FLAG- und HA-Epitope, durch Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden.

Wie in Abbildung 19 dargestellt, wurde in den Lysaten aus transient mit *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen der GC-A-Rezeptor sowie das FLAG- und das HA-Epitop nachgewiesen. Das neu generierte Plasmid wurde somit wie vorgesehen translatiert.

3.2.2 Funktionsprüfung der TEV-Schnittstelle

Nach der Überprüfung der Expressionsfähigkeit des Plasmids *pFLAG-HA-TEV-GC-A* wurde die Funktionsfähigkeit der Erkennungssequenz für die TEV-Protease überprüft. Hierzu wurde eine 10 cm Schale mit HEK 293-Zellen transient mittels PEI mit dem Plasmid *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfiziert, in 1 ml IP-Puffer lysiert (vgl. 2.11.1, Seite 50) und dieses Lysat auf je 40 µl Agarosebeads mit gekoppeltem anti-FLAG-Antikörper aufgeteilt. Die enzymatische Abspaltung der gekoppelten GC-A mit Hilfe von TEV-Protease erfolgte im Rahmen dieses Tests unter unterschiedlichen Bedingungen (A – E). Die Agarosebeads mit dem gekoppelten Protein wurden mit 100 U oder 200 U AcTEV-Protease für 3 h (A, C) oder über Nacht (B, D) inkubiert. Zur Überprüfung der Spezifität der enzymatischen Reaktion wurden Agarosebeads mit gebundener FLAG-HA-TEV-GC-A lediglich mit TEV-Puffer (ohne AcTEV-Protease) über Nacht inkubiert (E). Alle Inkubationen wurden in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren durchgeführt. Im Western Blot wurden anschließend 20 µg Gesamtlisat (L) sowie eine Probe des Überstandes nach Inkubation des Lysates mit der Agarose (Unbound) aufgetragen. Aus den enzymatischen Reaktionen (Bedingung A – E) wurden jeweils 30 µl (15 %) im Western Blot aufgetragen. Zur Überprüfung der vollständigen Elution wurden 20 µl (50 %) der abschließend in Laemmli-Puffer gekochten Agarosebeads im Western Blot analysiert. Es wurden zwei 7,5 %ige SDS-Gele angefertigt und Antikörper gegen GC-A sowie gegen das FLAG-Epitop zur Detektion eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 dargestellt und zeigt, dass es möglich ist FLAG-HA-TEV-GC-A mit einem Antikörper gegen das FLAG-

Epitop zu präzipitieren und anschließend mit Hilfe von TEV-Protease, in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren, von den Agarosebeads enzymatisch abzuspalten. Zwischen den verwendeten Bedingungen A bis D konnte kein quantitativer Unterschied festgestellt werden. Der Antikörper gegen GC-A richtete sich gegen den C-terminalen Teil des Proteins. Durch die Anordnung der N-terminalen Epitope konnte somit von einer grundsätzlichen Funktionsfähigkeit der Schnittstelle für die TEV-Protease ausgegangen werden. Dies ist damit begründet, dass GC-A, nicht aber das FLAG-Epitop, in der Fraktion nachgewiesen werden konnte. In der Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne TEV-Protease) wurde keine GC-A nachgewiesen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die enzymatische Freisetzung der GC-A von den Agarosebeads sehr spezifisch ist. Aufgrund des sehr starken Signals für GC-A und das FLAG-Epitop in den, nach Verdau mit TEV-Protease gekochten Agarosebeads, kann davon ausgegangen werden, dass die Elutionsbedingungen noch nicht optimal gewählt waren. Die grundsätzliche Funktionalität der eingefügten Erkennungssequenz für die TEV-Protease, auch in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren, wurde aber bewiesen.

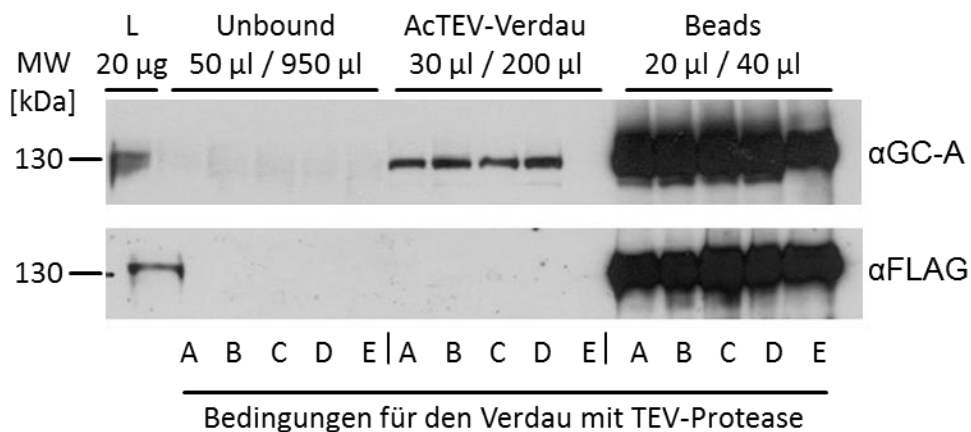


Abbildung 20: Nachweis der Funktionsfähigkeit der TEV-Erkennungssequenz nach IP. Western Blot mit der angegebenen Menge an Proteinlysate aus transient mit *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen nach IP mit anti-FLAG-M2-Agarosebeads. Die Bedingungen der enzymatischen Reaktion wurden, wie unter 2.11.2.1 (Seite 52) beschrieben, gewählt. Aufgetragen wurde zusätzlich: 20 µg Gesamtlysate transfizierter HEK 293-Zellen vor IP (L). Anhand des Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass der FLAG-HA-TEV-GC-A-Rezeptor mittels IP (anti-FLAG) aufgereinigt und mit TEV-Protease enzymatisch wieder abgespalten werden kann. Die Bedingungen der enzymatischen Reaktion waren aufgrund des extrem starken Signals in den gekochten Agarosebeads noch nicht optimal.

3.2.3 Überprüfung der subzellulären Lokalisation und Stimulierbarkeit der Epitop-getaggten GC-A in vitro

Die Erweiterung der N-terminalen Epitopregion der GC-A zu FLAG-HA-TEV erforderte die Überprüfung, ob die Stimulierbarkeit des Rezeptors mit dem Liganden ANP dadurch beeinflusst wird. Ferner wurde überprüft, ob dieser FLAG-HA-TEV-GC-A-Rezeptor als Transmembranprotein in transient transfizierten HEK 293-Zellen lokalisiert wird. Zur Klärung dieser Fragen wurden Stimulations- und FRET-Experimente unter Verwendung unterschiedlicher ANP-Konzentrationen durchgeführt.

Für die Quantifizierung der unter ANP-Stimulation gebildeten Menge an cGMP wurden HEK 293-Zellen zunächst mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert. Zur Inhibition von Phosphodiesterasen (PDE) wurden die Zellen mit dem PDE-Inhibitor 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, final: 0,5 mM) über 15 min vorbehandelt und danach mit unterschiedlichen ANP-Konzentrationen für weitere 10 min stimuliert. Das

auf diesen Stimulus hin intrazellulär gebildete cGMP wurde im cGMP-RIA quantifiziert.

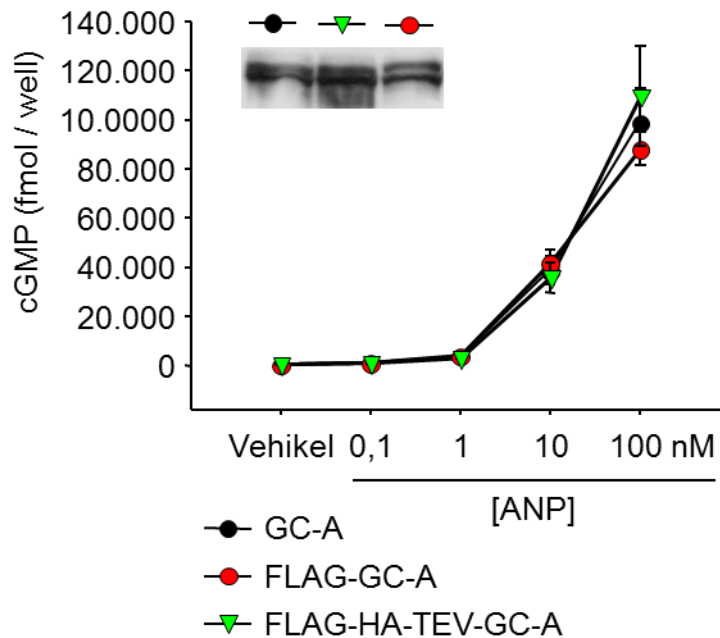


Abbildung 21: Aktivität wildtypischer und Epitop-getaggtter GC-A-Rezeptoren.

Ermittelte Menge an cGMP ($n = 2$) nach Stimulation mit der angegebenen Konzentration von ANP über 10 min. Die HEK 293-Zellen wurden transient mit dem Plasmid für den angegebenen GC-A-Rezeptor (GC-A wt, FLAG-GC-A bzw. FLAG-HA-TEV-GC-A) transfiziert und intrazellulär gebildetes cGMP im cGMP-RIA gemessen. In etwa gleiche Proteinmengen für GC-A wurden mittels eines Antikörpers gegen GC-A (Einschub) im Western Blot nachgewiesen. Die betrachteten GC-A-Rezeptoren bilden durch Stimulation mit ANP in etwa gleiche, konzentrationsabhängige Mengen an cGMP.

Die Stimulationsexperimente mit ANP an transient mit den Plasmiden *pGC-A wt*, *pFLAG-GC-A* oder *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der gebildeten cGMP-Menge (vgl. Abbildung 21). Zwischen den verwendeten Plasmiden wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Für die FRET-Experimente wurden HEK 293-Zellen mit dem Plasmid für den cGMP-Sensor (*pGES-DE2*) und *pGC-A wt* bzw. *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transient kotransfiziert. Die intrazelluläre Bildung von cGMP nach extrazellulär appliziertem ANP wurde an einzelnen Zellen in Echtzeit gemessen (Nikolaev 2006). Die Kinetik der intrazellulären cGMP-Bildung

des neu generierten FLAG-HA-TEV-GC-A Proteins wurde ausgewertet und mit dem des wildtypischen GC-A-Rezeptors verglichen (vgl. Abbildung 22).

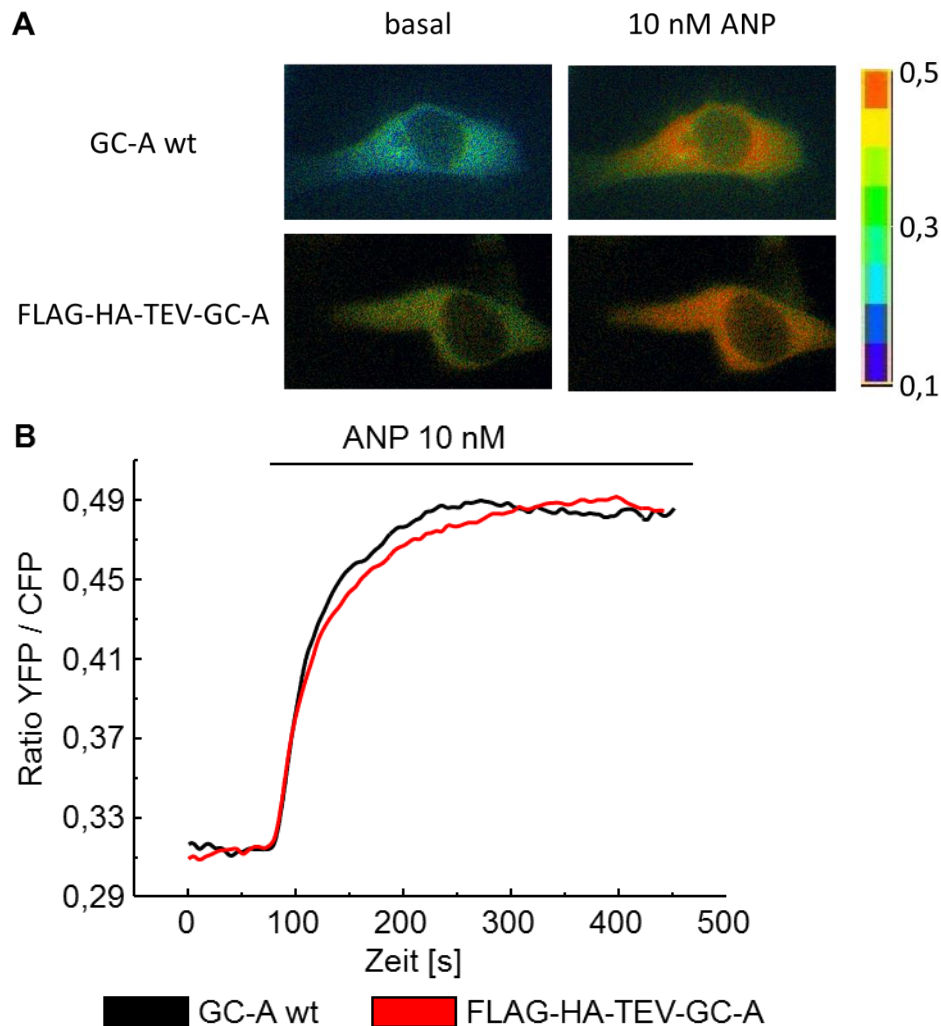


Abbildung 22: FRET-Experimente an transient transfizierten HEK 293-Zellen zur Überprüfung der ANP-vermittelten cGMP-Bildung.

(A) Ratiometrische Aufnahmen einzelner, transient transfizierter HEK 293-Zellen vor und 5 min nach Stimulation mit 10 nM ANP. (B) Repräsentative Aufzeichnungen der FRET-Signale von einzelnen HEK 293-Zellen, die den Sensor für cGMP und entweder den wildtypischen GC-A-Rezeptor oder FLAG-HA-TEV-GC-A transient koexprimieren. Das Ergebnis zeigt, dass beide Zellen mit einem vergleichbar starken Anstieg des intrazellulären cGMPs auf Stimulation mit 10 nM ANP reagieren.

Dabei wurde nicht nur die absolute Änderung des YFP/CFP-Ratio als Indikator für die cGMP-Bildung (vgl. Abbildung 23 A, Seite 95), sondern auch die Zeit ermittelt, bis sich das Verhältnis von YFP zu CFP auf den neuen Wert stabilisiert hatte (vgl. Abbildung 23 B, Seite 95).

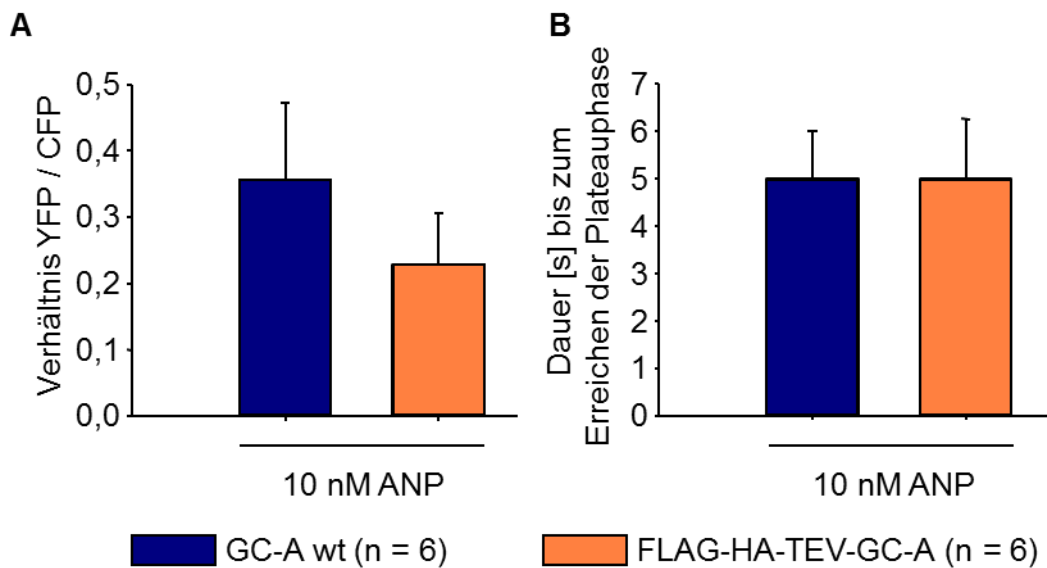


Abbildung 23: Ergebnisse der FRET-Experimente an transfizierten HEK 293-Zellen. (A) Sowohl HEK 293-Zellen, die den wildtypischen GC-A-Rezeptor exprimieren, als auch HEK 293-Zellen, die FLAG-HA-TEV-GC-A exprimieren, reagieren auf Stimulation mit 10 nM ANP mit einer deutlichen Änderung des YFP/CFP-Ratio. Dabei konnten hinsichtlich der absoluten Änderung keine signifikanten Unterschiede zwischen GC-A wt und FLAG-HA-TEV-GC-A festgestellt werden. (B) Die Kinetik des cGMP-Anstiegs, gemessen ab der Applikation von 10 nM ANP bis zum Erreichen der Plateauphase, war bei beiden GC-A-Rezeptoren gleich.

Die FRET-Experimente zeigen, dass der modifizierte, Epitop-getaggte GC-A-Rezeptor über eine cGMP-Bildungskinetik verfügt, die mit der von GC-A wt vergleichbar ist. Aufgrund des Versuchsaufbaus, bei dem mit extrazellulär appliziertem ANP einzelne Zellen gemessen werden, kann davon ausgegangen werden, dass der FLAG-HA-TEV-GC-A-Rezeptor, wie auch der wildtypische GC-A-Rezeptor in der Zellmembran lokalisiert ist. Die ANP-Bindungsdomäne wird dabei extrazellulär und die Zyklasedomäne intrazellulär präsentiert.

Zusammengefasst zeigte die Charakterisierung des neu generierten FLAG-HA-TEV-GC-A-Rezeptors, dass das Protein sowie das HA-tag als auch die Erkennungssequenz für die TEV-Protease funktionsfähig exprimiert wurden. Ebenso konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Stimulierbarkeit mit dem Liganden ANP zwischen wildtypischen GC-A-

Rezeptor und der neu generierten FLAG-HA-TEV-GC-A festgestellt werden.

3.3 Charakterisierung transgener Mäuse

Durch die Erweiterung der Epitopregion um das HA-Epitop stand somit ein zusätzliches Werkzeug zur Verfügung, um den Epitop-getaggen GC-A-Rezeptor anzureichern und aufzureinigen. Ergänzend ermöglicht es die TEV-Erkennungssequenz den zuvor mittels IP präzipitierten FLAG-HA-TEV-GC-A-Rezeptor hochspezifisch von den verwendeten Agarosebeads (z.B. mit gekoppeltem anti-FLAG- oder anti-HA-Antikörpern) enzymatisch abzuspalten und somit die Suche nach Interaktionspartnern sowie die Analyse von Modifikationen des Rezeptors mittels Massenspektrometrie zu optimieren.

Für die Generierung transgener Mäuse mit einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression wurde ein Plasmid mit einem α -MHC-Promoter (α -Myosin-Heavy-Chain-Promoter) aus der AG von Prof. Engelhardt (Engelhardt 1999) verwendet. Es gibt in der Literatur viele Referenzen für die Verwendung dieses Promoters zur Generierung transgener Tiere mit kardiomyozytenspezifischer Expression der inserierten kodierenden Sequenzen (Milano 1994, Robbins 2000). Durch Studien wurde belegt, dass der Promoter sowohl in embryonalen, als auch adulten Kardiomyozyten der Atria (Herzvorhöfe) exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wurde die Expression in ventrikulären Kardiomyozyten erst nach der Geburt beobachtet (Ng 1991, Palermo 1996).

Vor der Überprüfung der Überexpression in Kardiomyozyten transgener Tiere wurden zunächst die aus der Oocyteninjektionen hervorgegangenen Tiere („Founder“) sowie deren Nachkommen hinsichtlich des Vorhandenseins des Transgens auf Ebene der genomischen DNA analysiert.

3.3.1 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Die Oocyteninjektionen zum generieren transgener Mäuse wurde im Labor von Dr. Boris Skryabin (Institut für experimentelle Pathologie, Universität Münster) durchgeführt. Zur Genotypisierung wurde ein Stück der Schwanzspitze entnommen und die genomische DNA isoliert. Mit Hilfe der erzeugten Sonde für den Southern Blot (vgl. 2.14.7, Seite 61) wurden die Tiere im Labor von Dr. Boris Skryabin initial genotypisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Bedingungen für PCR entwickelt mit denen das Transgen in der genomischen DNA der Tiere eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Wie Abbildung 24 zeigt, lieferte die PCR eindeutige positive und negative Ergebnisse für das Transgen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich in der genomischen DNA einiger Tiere die künstlich inserierte DNA nachweisen lässt. Im nächsten Schritt wurde nun an den Nachkommen der jeweiligen Founder die kardiale Überexpression und subzelluläre Lokalisation der Epitop-getaggen GC-A analysiert. Zum Aufbau einer Kolonie für experimentelle Versuchsreihen wurden Verpaarungen mit wildtypischen Mäusen des Stammes FVB/N vorgenommen und die Nachkommen durch die etablierte PCR genotypisiert.

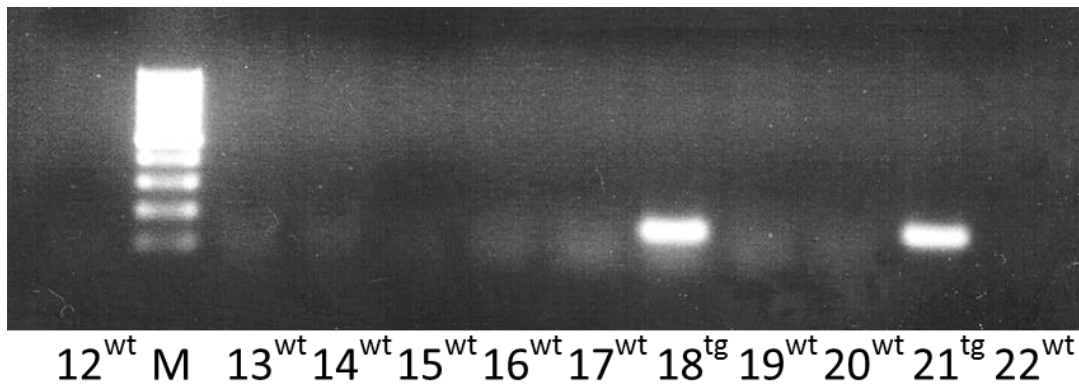


Abbildung 24: PCR zum Nachweis des Transgens.

Die zuvor aus einer Gewebeprobe (Mausschwanzspitze) isolierte genomische DNA der Tiere wurden in einer PCR (vgl. 2.15.2, Seite 63) für das Transgen analysiert. Die hier verwendete genomische DNA stammte von der ersten Generation transgener Tiere der FLAG-GC-A-Kolonie. Das Ergebnis zeigte, dass ein spezifischer Nachweis des Transgens in den Tieren mit der Nummer 18 und 21 mittels PCR möglich ist. Das Ergebnis der PCR für das Tier mit der Nummer 31 ist in dieser Abbildung nicht enthalten, zeigte aber ebenfalls ein positives Signal.

3.3.2 Expression der getaggten GC-A in murinem Gewebe

Aufgrund des gewählten Ansatzes zur Generierung transgener Tiere wurde erwartet, dass die Tiere eine deutliche Überexpression der GC-A ausschließlich im Herzgewebe zeigen. Darüber hinaus sollte es möglich sein das FLAG-Epitop mit einem Antikörper gegen dieses Epitop in der FLAG-GC-A-Kolonie nachweisen zu können. In der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie sollte sowohl der Nachweis des FLAG- als auch des HA-Epitops im murinen Herzen möglich sein.

Zur Überprüfung der Annahme wurden Gewebeprobe aus Herz, Lunge und Niere der genotypisierten Tiere homogenisiert. Der Proteingehalt wurde bestimmt und je 75 µg Protein im Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle für GC-A diente Gewebe von globalen GC-A KO Mäusen der AG Kuhn. Als Positivkontrolle wurden, je nach Anforderung, 10 µg Protein aus Zelllysat zuvor transient transfizierter HEK 293-Zellen im Western Blot eingesetzt. Als Positivkontrolle für das HA-tag wurde Zelllysat aus transient mit dem Plasmid *pHA-GC-A Δ_{Lys}^{314} -Gln 330* oder *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen verwendet. Zur Abschätzung der

Expressionsmenge und Verifizierung gleichmäßig aufgetragener Proteinmengen wurde der untere Teil der Membran mit einem Antikörper gegen GAPDH als Referenzgen inkubiert.

3.3.2.1 Expression der GC-A innerhalb der FLAG-GC-A-Kolonie

Aus der Oozyteninjektion für das Transgen „*FLAG-GC-A*“ gingen drei Mäuse (Founder) hervor, bei denen das Transgen nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 24, Seite 98, Tiere mit der Nummer 18 und 21, Nummer 31 nicht dargestellt). Diese drei Tiere wurden jeweils getrennt verpaart und daraus wurden drei einzelne Linien gezüchtet. In der F1-Generation jeder Linie wurde zunächst die kardiale Überexpression des GC-A-Rezeptors überprüft. Je Founder wurden anschließend vier transgene Nachkommen, ein FVB/N wt sowie ein Tier aus der Kolonie der globalen GC-A KO unter tiefer Inhalationsnarkose (3 % Isofluran) geopfert. Die Herzen wurden homogenisiert und 75 µg des Herzlysats im Western Blot mit einem Antikörper gegen GC-A analysiert. Der untere Teil der Membran wurde mit einem Antikörper gegen GAPDH inkubiert, um die gleichmäßige Beladung des SDS-Gels zu verifizieren. Die Intensität der Signale für GC-A und GAPDH wurde anschließend mit dem Programm ImageJ erfasst und daraus die Steigerung der Expression von GC-A in den transgenen Tieren, im Verhältnis zu wildtypischen Geschwistertieren, errechnet. Abbildung 25 zeigt, dass sich die kardiale Expression der GC-A je Founder deutlich unterscheidet, innerhalb der jeweiligen Linie jedoch homogen zu sein schien. Neben der Bande für GC-A, die in Höhe von etwa 130 kDa erwartet wurde, detektierte der Antikörper gegen GC-A zusätzlich noch ein etwa 110 kDa großes Protein. Bei den vier Proben des Founder 18 sieht man sehr deutlich, dass die Intensität der kleineren Bande mit der bei 130 kDa erwarteten korreliert.

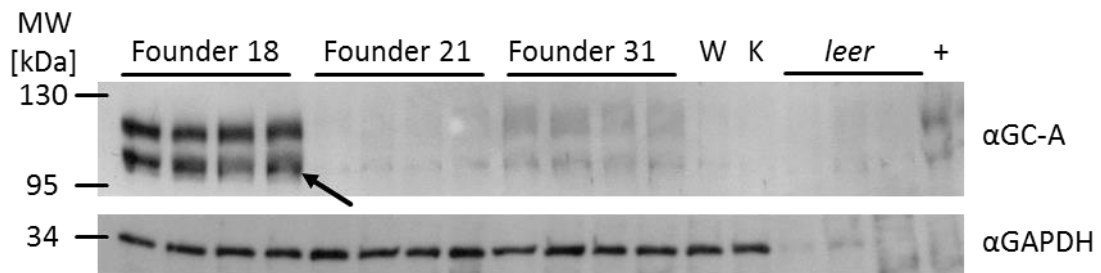


Abbildung 25: Nachweis der GC-A-Überexpression im Herzen transgener Tiere der FLAG-GC-A-Kolonie.

Im Western Blot wurden 75 μ g Proteinlysate aus murinen Herzen (Gesamtlysate) analysiert. Je Founder wurden vier Tiere geopfert und deren kardiale GC-A Expression mit FVB/N wt (W) sowie einer globalen GC-A KO Maus (K) verglichen. Als Positivkontrolle (+) wurden 10 μ g Zelllysate aus transient mit *pFLAG-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen aufgetragen. Als Referenz gleichmäßiger Proteinmengen diente der Nachweis des Proteins GAPDH. Der Western Blot zeigt eine deutliche Überexpression der GC-A im murinen Herzen der F1-Generation von Founder 18. Die anderen Founder weisen eine deutlich geringere Expression der GC-A auf. Neben der erwarteten Bande für GC-A bei ~130 kDa wird durch den Antikörper noch ein deutlich kleineres Protein (~110 kDa) detektiert (Pfeil), dessen Signalstärke mit dem für GC-A (~130 kDa) korreliert.

Wie Abbildung 25 und Abbildung 27 (vgl. S. 102) zeigen, ist das Signal für GC-A auch bei den eingesetzten 75 μ g Proteinextrakt aus Herzen für wildtypische Tiere extrem schwach. Eine densitometrische Auswertung war dennoch möglich. Diese Auswertung des Western Blots (vgl. Abbildung 25) zeigt, dass die Nachkommen von Founder 18 die etwa 12-fache Menge an GC-A im Herzen, verglichen mit wildtypischen Geschwistertieren, aufwiesen. Die Nachkommen der beiden anderen Founder wiesen, mit einer, im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren, etwa 1,25-fachen (Founder 21) bzw. 2-fachen (Founder 31) Menge, eine deutlich geringere Überexpression für GC-A im Herzen auf (vgl. Abbildung 26, Seite 101). Basierend auf diesem Ergebnis wurden die Linien der Founder 21 und 31 nicht weitergeführt.

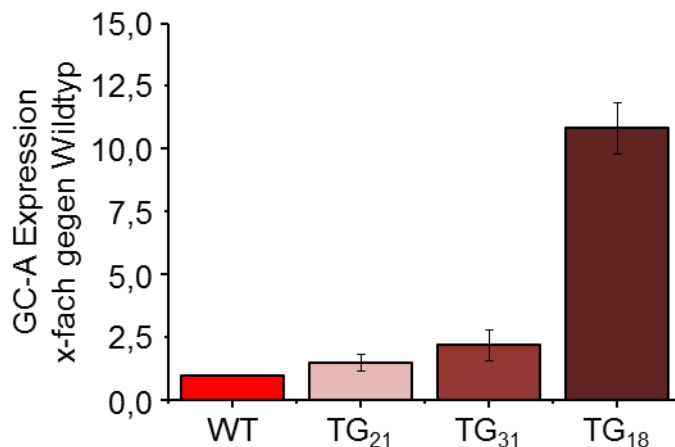


Abbildung 26: Auswertung der Intensität des GC-A-Signals im Western Blot an Herzen transgener und wildtypischer Tiere der FLAG-GC-A-Kolonie.

Die Signalstärke für GC-A im Herzen wurde für die Nachkommen der drei transgenen Founder (#18, #21, #31) sowie von wildtypischen Tieren ermittelt und auf GAPDH normiert. Das Ergebnis zeigte, dass die Nachkommen von Founder 18 die deutlichste Überexpression (etwa 12-fach) aufwiesen.

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass die Nachkommen (F1-Generation) des Founder 18 eine deutlich gesteigerte kardiale Expression des GC-A-Rezeptors aufweisen, wurde die Expression des Epitop-getaggten GC-A-Rezeptors in Lunge und Niere überprüft. Zudem wurde untersucht, ob die bei etwa 110 kDa detektierte unspezifische Bande auch in anderen Geweben nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden 75 µg Proteinlysate aus Herz, Lunge und Niere von wildtypischen (W1, W2, W3), transgenen (T18, T31) und einer GC-A KO Maus (KO) in einem 7,5 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des GC-A-Rezeptors erfolgte mit einem Antikörper gegen GC-A. Als Positivkontrolle für den GC-A-Rezeptor (+) dienen 4,5 µg des Proteins FLAG-GC-A, das zuvor mittels anti-FLAG IP aus transient mit *pFLAG-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen aufgereinigt wurde.

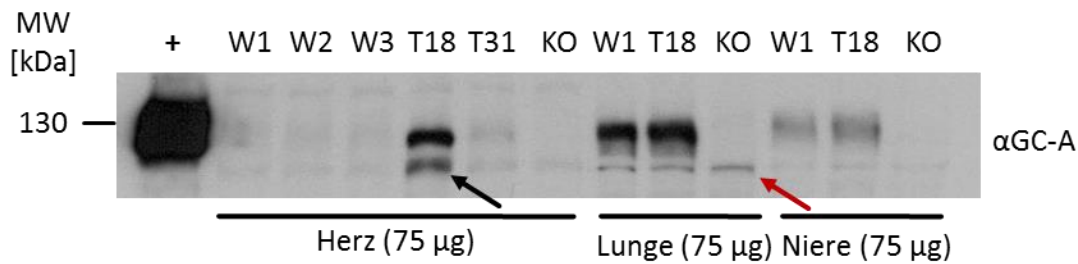


Abbildung 27: Expression von GC-A in Herz, Lunge und Niere.

Im Western Blot wurden je 75 µg Lysat aus Herz, Lunge und Niere von FVB/N wt (W1, W2 und W3), transgenen (T18 und T31) sowie einer globalen GC-A KO Maus (KO) analysiert. Neben der erwarteten Bande für GC-A bei ~130 kDa wird im Herzen, durch den Antikörper gegen GC-A, auch hier ein deutlich kleineres Protein (~110 kDa) detektiert (schwarzer Pfeil), dessen Signalstärke mit dem der GC-A (T18) korreliert. Auch im Gesamtlisat der Lunge wird eine solche unspezifische Bande, insbesondere auch in der Lunge von GC-A KO Mäusen (roter Pfeil), detektiert.

Wie Abbildung 27 zeigt, wurde erneut im Gesamtlisat aus dem Herz von transgenen Tieren (T18) eine möglicherweise unspezifische Bande bei etwa 110 kDa, die eine ähnliche Intensität wie die bei 130 kDa (GC-A) aufweist, detektiert. Eine vergleichbare Bande wurde auch im Gesamtlisat der Lunge durch den Antikörper gegen GC-A detektiert. Allerdings hier auch im Lysat aus Lungengewebe von Tieren der GC-A KO-Kolonie. Aufgrund des Zusammenhangs der Intensität der beiden Banden im Herzen von transgenen Tieren (T18) wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der auf Höhe von ~110 kDa detektierten Bande ebenfalls um GC-A handelt. Möglicherweise sind unterschiedliche Glykosilierungszustände (Miyagi 2000) für diese Beobachtung verantwortlich. Das Auftreten der Bande im Proteinextrakt aus Lungengewebe von Tieren der GC-A KO Kolonie (roter Pfeil, Abbildung 27) lässt sich möglicherweise durch die Generierung des Knockouts erklären. Durch die Insertion der Neomycin-Kassette im Exon 4 (Lopez 1995) könnte eine trunkeerte Form des GC-A-Rezeptors entstanden sein, die durch den Antikörper detektiert wird.

3.3.2.2 Expression der GC-A innerhalb der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie

Für die FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie wurden die beiden positiven Founder (Nr. 15 und Nr. 16) zur Etablierung von Kolonien mit FVB/N wt Tieren

verpaart. Im Rahmen der Genotypisierung wurde festgestellt, dass Founder 15 das Transgen nicht weitergibt. Entsprechend konnte aus diesem Founder keine Linie etabliert werden. Im ersten Schritt wurde auch für diese Kolonie die Expression der GC-A im Herzen analysiert. Hierzu wurden drei transgene Tiere aus der F1-Generation des Founder 16, drei FVB/N wt und eine globale GC-A KO Maus (KO) unter tiefer Inhalationsnarkose (3 % Isofluran) geopfert und 15 µg Proteinlysate aus den murinen Herzen im Western Blot aufgetragen. Als Positivkontrolle dienten 20 µg Lysat (+) aus transient, mit dem Plasmid *pHA-GC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$* transfizierten HEK 293-Zellen.

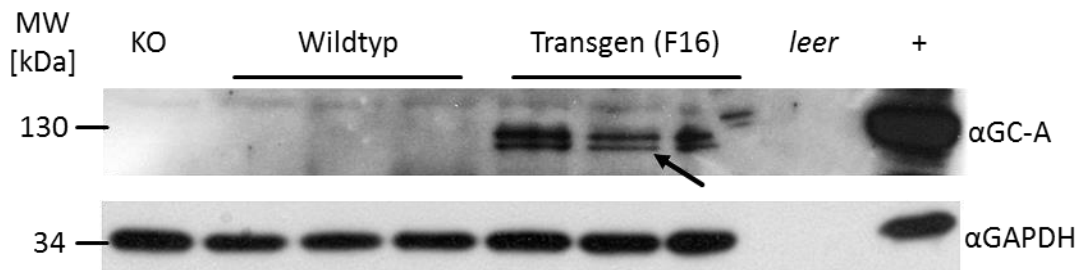


Abbildung 28: Nachweis der Überexpression im Herzen transgener Tiere der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie.

Im Western Blot wurden 15 µg Proteinlysate aus murinen Herzen (Gesamtlysate) analysiert. Aus der Kolonie wurden drei transgene Tiere geopfert und deren GC-A Expression mit FVB/N wt verglichen. Als Negativkontrolle diente Lysat aus dem Herz einer GC-A KO Maus (KO). Um Überlagerung der Signale zu vermeiden, wurde die Positivkontrolle (+) nicht direkt neben der letzten Gewebeprobe aufgetragen. Als Referenz gleichmäßiger Beladung diente der Nachweis von GAPDH. Der Western Blot zeigt eine deutliche Überexpression der GC-A im murinen Herzen der F1-Generation des Founder 16 (FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie). Neben der erwarteten Bande für GC-A bei ~130 kDa wird im Herzen durch den Antikörper gegen GC-A noch ein deutlich kleineres Protein (~110 kDa) detektiert (schwarzer Pfeil), dessen Signalstärke mit dem der GC-A korreliert.

Wie der Western Blot in Abbildung 28 zeigt, wiesen die Nachkommen des Founder 16 aus der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie eine deutliche Überexpression der GC-A im Herzen auf. Zum Nachweis gleichmäßig aufgetragener Proteinmengen wurde der untere Teil der Membran mit einem Antikörper gegen GAPDH inkubiert. Neben der Bande für GC-A, die in Höhe von etwa 130 kDa erwartet wurde, wird durch den Antikörper gegen GC-A zusätzlich noch ein etwa 110 kDa großes Protein detektiert.

Bei den vier Proben des Founder 18 sieht man sehr deutlich, dass die Intensität der kleineren Bande mit der bei 130 kDa korreliert. Das Auftreten des GC-A Rezeptors als Doppelbande wurde bereits zuvor in Arbeiten anderer Gruppen beschrieben und mit unterschiedlichen Glykosilierungsformen erklärt (Koller 1993, Miyagi 2000). So besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der hier detektierten kleineren Bande ebenfalls um GC-A, allerdings in unterschiedlichen Glykosilierungszuständen, handelt.

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass die Nachkommen (F1-Generation) des Founder 16 eine deutlich gesteigerte kardiale Expression des GC-A-Rezeptors aufweisen, wurde die Expression des GC-A-Rezeptors in Lunge und Niere überprüft. Auch hier wurde untersucht, ob die bei etwa 110 kDa detektierte unspezifische Bande auch in anderen Geweben nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden 75 µg Proteinlysate aus Herz, Lunge und Niere von wildtypischen (WT), transgenen (TG) und einer GC-A KO Maus (KO), in einem 7,5 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der GC-A-Rezeptor wurde mit einem Antikörper gegen GC-A nachgewiesen. Als Positivkontrolle dienten auch hier 20 µg Lysat (+) aus transient, mit dem Plasmid *pHA-GC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$* transfizierten HEK 293-Zellen.

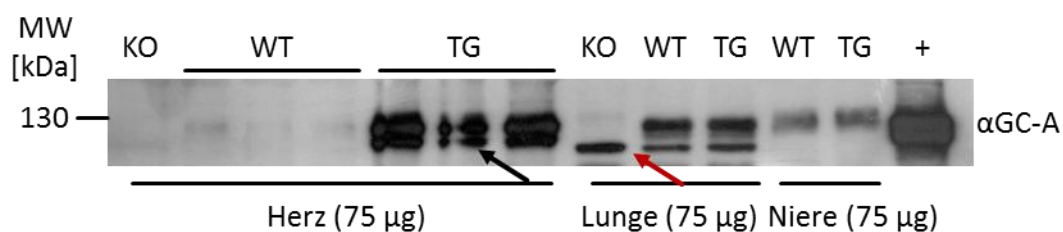


Abbildung 29: Vergleich der Expression von GC-A in Herz, Lunge und Niere.

Im Western Blot wurden je 75 µg Lysat aus Herz, Lunge und Niere sowie 20 µg Lysat aus transient mit dem Plasmid *pHA-GC-A $\Delta_{Lys}^{314-330}$* transfizierten HEK 293-Zellen als Positivkontrolle (+) analysiert. Neben der erwarteten Bande für GC-A bei ~130 kDa wird im Herzen durch den Antikörper gegen GC-A noch ein deutlich kleineres Protein (~110 kDa) detektiert (schwarzer Pfeil), dessen Signal mit dem der GC-A korreliert. Auch im Gesamtlisat der Lunge wird eine solche kleinere Bande (roter Pfeil) detektiert.

Wie Abbildung 28 (vgl. Seite 103) und Abbildung 29 (vgl. Seite 104) zeigen, ist das Signal für GC-A auch bei den eingesetzten 75 µg Proteinextrakt aus lysierten Herzen für wildtypische Tiere extrem schwach. Eine densitometrische Auswertung zur Quantifizierung der Überexpression war dennoch möglich. Diese Western Blot Analysen der Gesamtllysate aus Herz, Lunge und Niere von transgenen, wildtypischen FVB/N sowie einer globalen GC-A KO Maus (KO) zeigen, dass die transgenen Nachkommen des Founders 16 aus der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie über eine deutliche Überexpression des GC-A-Rezeptors im Herzen (etwa 14-fach) verfügen (vgl. Abbildung 30).

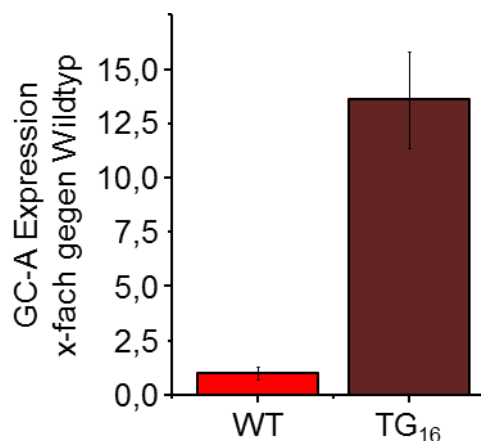


Abbildung 30: Auswertung der Intensität des GC-A-Signals im Western Blot an Herzen transgener und wildtypischer Tiere der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie.

Die Signalstärke für GC-A im Herzen wurde für die Nachkommen des transgenen Founder 16, sowie von wildtypischen Tieren ermittelt und auf GAPDH normiert. Das Ergebnis zeigt, dass die Nachkommen von Founder 16 ein etwa 14-fach so starkes Signal (verglichen mit Wildtyp) für GC-A im Herzlysate aufweisen.

Die Western Blot Analysen zeigen, dass im Herzen der transgenen Tiere, ähnlich wie in der FLAG-GC-A-Kolonie, neben der Bande für GC-A bei etwa 130 kDa, zusätzlich eine unspezifische Bande bei etwa 110 kDa detektiert wird. Diese kleinere Bande weist eine ähnliche Intensität wie die bei 130 kDa (GC-A) auf. Aufgrund des Zusammenhangs der Intensität der beiden Banden im Herzen von transgenen Tieren ist davon auszugehen, dass es sich bei der bei ~110 kDa im Herzen detektierten Bande ebenfalls

um GC-A handelt. Das Auftreten der Bande im Proteinextrakt aus Lungengewebe von Tieren der GC-A KO Kolonie (vgl. Abbildung 29, roter Pfeil) lässt sich möglicherweise durch die Generierung des Knockouts erklären. Durch die Insertion der Neomycin-Kassette im Exon 4 (Lopez 1995) könnte eine trunkierte Form des GC-A-Rezeptors entstanden sein, die mit dem Antikörper gegen GC-A nachgewiesen wurde. In der Niere wird diese kleinere Bande für die aufgetragenen Proben aus transgenen und wildtypischen Tieren nicht detektiert. Eine Vergleichsprobe aus einem Tier der GC-A KO-Kolonie liegt für das Nierengewebe nicht vor. Basierend auf den Ergebnissen der Western Blot Analysen, die eine deutliche Überexpression für den GC-A-Rezeptor im Herzen zeigten, wurde diese Linie im Tierstall der AG Kuhn gezüchtet.

3.3.2.3 Nachweis des FLAG-Epitops an GC-A innerhalb der FLAG-GC-A-Kolonie

Ziel dieser Arbeit war es zwei transgene Mauslinien zu generieren, die Epitop-getaggte GC-A-Rezeptoren im Herzen überexprimieren. Hierdurch sollte es ermöglicht werden den Rezeptor mittels IP über das jeweilige Epitop aufzureinigen und darüber im Mausmodell mögliche Modifikationen sowie Interaktionspartner unter (patho)physiologischen Bedingungen zu charakterisieren. Die Überexpression der GC-A konnte, wie zuvor dargestellt, in beiden Kolonien nachgewiesen werden. Entsprechend wurde nun geprüft, ob das FLAG-Epitop im Herzen der transgenen Tiere der FLAG-GC-A-Kolonie detektiert werden kann. Hierzu wurden 75 µg Gesamtlysat aus Herz im Western Blot mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Kaninchen IgG) analysiert. Als Positivkontrolle (+) dienten 4,5 µg über anti-FLAG IP aufgereinigte FLAG-GC-A aus transient transfizierten HEK 293-Zellen.

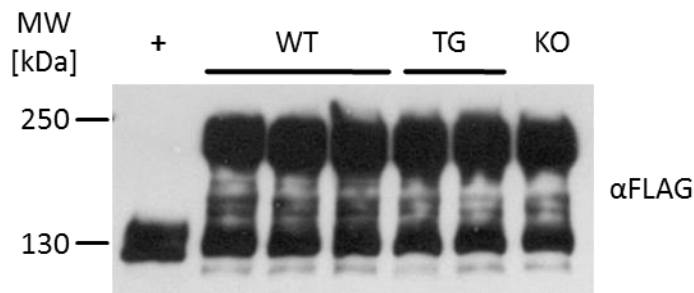


Abbildung 31: Nachweis des FLAG-tag im Lysat von Herzen der FLAG-GC-A-Kolonie.

Im Western Blot wurden je 75 µg Proteinlysate aus dem Herz von FVB/N wt (WT), transgenen (TG) sowie einer globalen GC-A KO Maus (KO) analysiert. Als Positivkontrolle (+) für das FLAG-tag wurden 4,5 µg über anti-FLAG IP aufgereinigte FLAG-GC-A aus transient mit *pFLAG-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen verwendet. Der Western Blot zeigt starke unspezifische Banden, die im Herzen aller analysierten Mäuse mit dem verwendeten anti-FLAG Antikörper nachgewiesen wurden. Ein eindeutiger Nachweis einer Überexpression der FLAG-GC-A konnte, mit dem verwendeten Antikörper, gegen das FLAG-Epitop nicht erbracht werden.

Der Western Blot gegen das FLAG Epitop (vgl. Abbildung 31) zeigte eine sehr starke unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers im Herzgewebe. Die unspezifische Bindung erfolgt sehr prominent in Höhe der GC-A (ca. 130 kDa), sowie bei etwa 200 kDa. Das Signal entsteht sowohl im Herzlysate von transgenen, wildtypischen als auch GC-A KO Tieren. Die Detektion des FLAG-tag wurde zusätzlich im Labor von Prof. Dr. Axel Gödecke (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf), unter Verwendung anderer Antikörper, versucht. Im Austausch mit Prof. Dr. Gödecke wurde dabei festgehalten, dass sich die Detektion des FLAG-Epitops im Herzen schwierig gestaltet und für IPs aus murinem Herzen eher ungeeignet ist, da der anti-FLAG-Antikörper zumindest an denaturierten Proben mit verschiedenen, unbekannt, kardialen Proteinen interagiert. Möglicherweise ist diese unspezifische Bindung auf die Denaturierung im Laemmli-Puffer zurück zu führen. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen, wie sie beispielsweise nach IP Anwendung finden würde, könnte der spezifische Nachweis unter Umständen möglich sein. Dieser Ansatz wurde aber im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht

weiter verfolgt, da das HA-Epitop spezifisch nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 33, Seite 109).

3.3.2.4 Nachweis der FLAG-tag GC-A innerhalb der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie

Analog zu dem in 3.3.2.3 beschriebenen Vorgehen wurde der Nachweis des FLAG-tag für Lysat aus Herzen der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie durchgeführt und ein vergleichbares Ergebnis (vgl. Abbildung 32) erhalten.

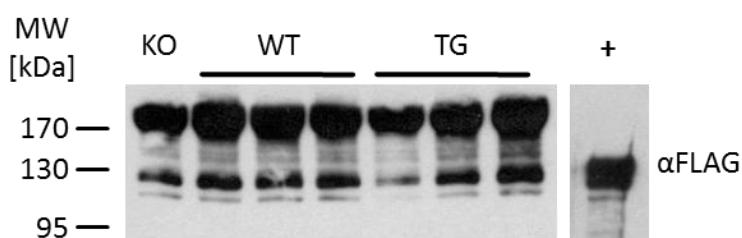


Abbildung 32: Nachweis des FLAG-tag im Lysat von Herzen der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie.

Im Western Blot wurden je 75 μ g Proteinlysate aus dem Herz von FVB/N wt (WT), transgenen (TG) sowie einer globalen GC-A KO Maus (KO) analysiert. Als Positivkontrolle (+) für das FLAG-tag wurden 4,5 μ g über anti-FLAG IP aufgereinigte FLAG-GC-A aus transient mit *pFLAG-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen verwendet. Der Western Blot zeigt starke unspezifische Banden, die im Herzen aller analysierten Mäuse mit dem verwendeten anti-FLAG Antikörper nachgewiesen wurden. Ein eindeutiger Nachweis einer Überexpression der FLAG-GC-A konnte mit dem verwendeten Antikörpern gegen das FLAG-Epitop nicht erbracht werden.

3.3.2.5 Nachweis des HA-tag innerhalb der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie

Zum Nachweis der GC-A über das angefügte HA-tag im Herzen, wurden 75 μ g Protein aus Gesamtlisat von Herz, Lunge und Niere aus transgenen (TG) und wildtypischen Mäusen (WT) sowie einer globalen GC-A KO Maus (KO) im Western Blot mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop, analysiert. Als Positivkontrolle dienten 20 μ g Lysat (+) aus transient, mit dem Plasmid *pHA-GC-A Δ _{Lys}³¹⁴_{-Gln}³³⁰* transfizierten HEK 293-Zellen.

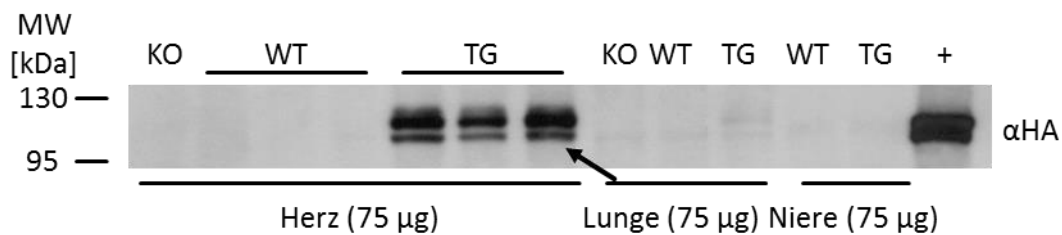


Abbildung 33: Nachweis des HA-tag im Lysat aus Herz, Lunge und Niere von Mäusen der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie.

Im Western Blot wurde die angegebene Proteinmenge der Lysate aus Herz, Lunge und Niere, sowie 20 µg Lysat aus transient mit $pGC-A\Delta_{Lys}^{314-330}$ transfizierten HEK 293-Zellen als Positivkontrolle (+), mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop analysiert. Der Western Blot zeigte ein deutliches Signal für das HA-Epitop, das exklusiv im Herzlysate der transgenen Mäuse (TG) nachgewiesen werden konnte. Neben der erwarteten Bande für GC-A bei ~130 kDa wird exklusiv im Herzen, durch den Antikörper gegen das HA-Epitop, noch ein deutlich kleineres Protein (~110 kDa) detektiert (schwarzer Pfeil), dessen Signal etwas schwächer ist, aber mit dem der GC-A bei 130 kDa korreliert. Aufgrund dieses Ergebnisses kann es als gesichert angesehen werden, dass es sich bei dieser Bande um HA-getaggte GC-A handelt, die im Herzen exprimiert wird.

Im Gegensatz zum FLAG-Epitop konnte das HA-Epitop sehr sauber und spezifisch im Lysat muriner Herzen transgener Tiere detektiert werden (vgl. Abbildung 33). Interessanterweise konnte die zuvor in den Western Blot Analysen der FLAG-GC-A- und FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie, mit dem Antikörper gegen GC-A (vgl. Abbildung 25, Seite 100 und Abbildung 28, Seite 103) nachgewiesene kleinere Bande (~110 kDa), ebenfalls mit dem Antikörper gegen das HA-Epitop detektiert werden. Somit kann mit ziemlicher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der bisher im Herzen detektierten kleineren Bande (~110 kDa) auch um GC-A handelt. Möglicherweise sind unterschiedliche Glykosilierungszustände des GC-A-Rezeptors, wie in der Literatur beschrieben, die Ursache für den Nachweis der GC-A als Doppelbande (Koller 1993, Miyagi 2000). Für die nachfolgenden Versuche zur Aufreinigung der GC-A aus transgenen Tieren mittels IP wurden die Tiere der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie herangezogen und der Ansatz über das FLAG-Epitop vorerst nicht weiter verfolgt.

3.3.3 Überexpression von FLAG-HA-TEV-tagged GC-A in Kardiomyozyten

Basierend auf den vorangegangenen Experimenten wurde die Überexpression der GC-A im Herzen transgener Tiere als erwiesen erachtet. Jedoch erlaubte die Analyse des Gesamtlisates keine Rückschlüsse auf die zelluläre sowie subzelluläre Lokalisation der Epitop-getaggten GC-A innerhalb des Organs. Im nächsten Schritt wurden daher Kardiomyozyten aus Herzen von einer globalen GC-A KO-Maus (K), drei wildtypischen (A, B, C) und zwei transgenen (D, E) Tieren isoliert. Die Zellen wurden anschließend durch die Verwendung unterschiedlicher Puffer in Zytosol- Membran- und Kernfraktion getrennt. Der Proteingehalt jeder Fraktion wurde bestimmt und je 25 µg Protein der Zytosol- (C), Membran- (M) und Kernfraktion (N) im Western Blot aufgetragen. Zum Nachweis des GC-A-Rezeptors wurde ein Antikörper gegen GC-A verwendet (vgl. Abbildung 34 A). Um den Nachweis einer erfolgreichen Zellfraktionierung zu erbringen, wurden ebenfalls 25 µg Proteinlysate in einem weiteren 7,5 %igem SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen zytosolische und membranständige Proteine analysiert. Die Zytosolfraction wurde mit dem Antikörper gegen die Zytosolproteine ERK 1/2 (extrazellulär geregelte Kinasen 1 und 2) analysiert (vgl. Tabelle 14, Seite 44). Zur Charakterisierung der Membranfraktion wurde ein Antikörper gegen das Transmembranprotein Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) verwendet.

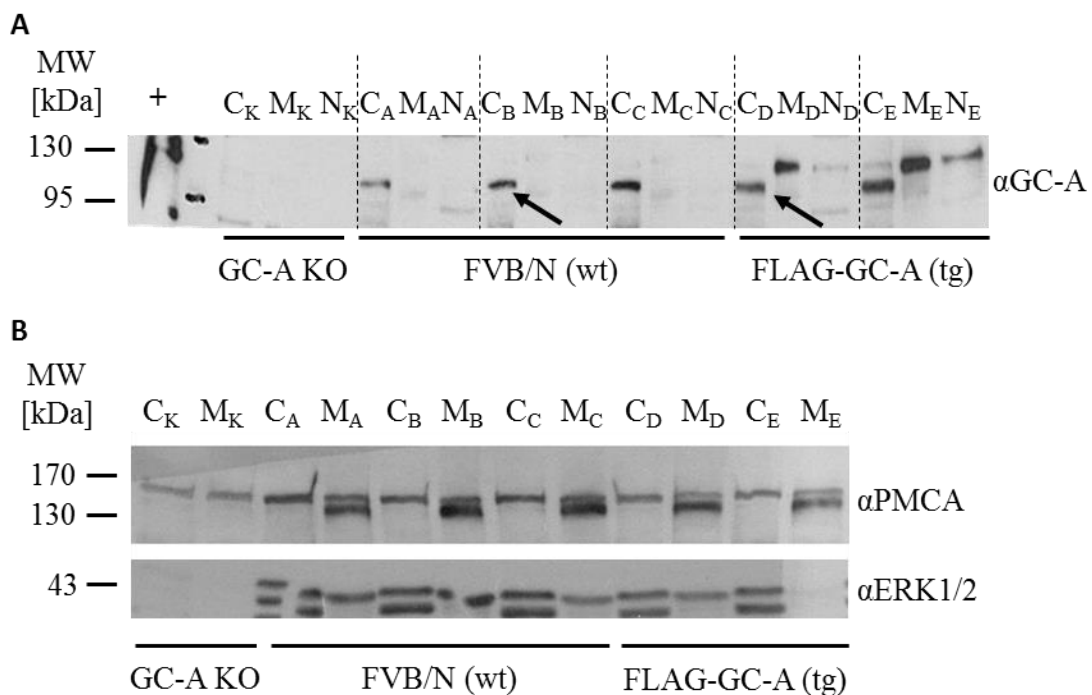


Abbildung 34: Überprüfung der Fraktionierung von Kardiomyozyten und Nachweis des GC-A-Rezeptors in den Fraktionen.

(A) Im Western Blot wurden je 25 µg Protein nach Zellfraktionierung von isolierten Kardiomyozyten einer GC-A KO Maus, drei wildtypischen und zwei transgenen Tieren der FLAG-GC-A-Kolonie analysiert. Es wurden Zytosol- (C) und Membranfraktion (M) sowie die Kernfraktion (N) aufgetragen. Für GC-A (~130 kDa) wurde ein starkes Signal in der Membranfraktion der transgenen Tiere, sowie ein deutlich schwächeres in deren Kernfraktion (N_D, N_E) detektiert. Darüber hinaus wurde sowohl im Herzen von wildtypischen als auch von transgenen Tieren eine etwas kleinere Bande (~110 kDa) (vgl. Pfeile) mit dem Antikörper gegen GC-A exklusiv im Zytosol der Kardiomyozyten detektiert. In Kardiomyozyten der globalen GC-A KO-Maus wurde diese Bande nicht nachgewiesen. (B) Zum Nachweis einer erfolgreichen Fraktionierung der Kardiomyozyten wurden je 25 µg Protein der Zytosol- (C) und Membranfraktion (M) mit Antikörpern gegen ERK1/2 (Zytosolprotein) und PMCA (Membranprotein) analysiert. In allen Zytosolfractionen zeigte sich ein sehr starkes Signal für ERK1/2 sowie ein etwas schwächeres Signal in der Membranfraktion. Die PMCA wurde ausschließlich in der Membranfraktion detektiert. Für PMCA wurde in allen Fraktionen eine etwas größere, unspezifische Bande detektiert. Grundsätzlich zeigt dieses Ergebnis aber eine erfolgreiche Fraktionierung.

Wie Abbildung 34 A zeigt, gab es für GC-A (~130 kDa) ein sehr starkes Signal in der Membranfraktion von transgenen Tieren sowie ein deutlich schwächeres Signal in der Kernfraktion (N_D, N_E). Wie die Ergebnisse der Western Blot Analyse in Abbildung 34 B zeigen, wurde das stärkste Signal für ERK1/2 in der Zytosolfraction sowie ein signifikant schwächeres ERK1/2-Signal in der Membranfraktion detektiert. Das Protein PMCA wurde

ausschließlich in der Membranfraktion detektiert. Somit kann die Fraktionierung als erfolgreich erachtet werden. Das Auftauchen von GC-A in der Kernfraktion transgener Tiere (N_D , N_E) könnte auf eine nicht vollständige Fraktionierung für diese beiden Proben hinweisen. Für nachfolgende Experimente wurden deshalb, zur Verbesserung der Fraktionierung, die einzelnen Schritte häufiger (bis zu dreimal) und mit kleineren Volumina der entsprechenden Puffer wiederholt.

Interessanterweise wurde die zuvor mit dem Antikörper gegen GC-A bereits mehrfach nachgewiesene etwas kleinere Bande, in diesem Experiment exklusiv in der Zytosolfraktion von transgenen und wildtypischen Kardiomyozyten nachgewiesen. Eine entsprechende Bande fand sich weder in der Zytosol-, der Membran- oder Kernfraktion der globalen GC-A KO-Maus. Wobei sich für die GC-A KO Maus die Banden insgesamt recht schwach darstellten und der Nachweis für PMCA bzw. ERK 1/2 in dieser Spur auch nicht erfolgreich war (vgl. Abbildung 34 B, Seite 111). Möglicherweise handelt es sich bei der im Zytosol detektierten Bande um GC-A die einen anderen Glykosilierungszustand aufweist als die in der Membran lokalisierte Form (Koller 1993, Miyagi 2000). Um zumindest für die transgenen Tiere überprüfen zu können, ob es sich bei dieser kleineren Bande in der Zytosolfraktion tatsächlich um GC-A handeln könnte, wurde die Fraktionierung an Tieren der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie, mit anschließender Western Blot Analyse, mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop, durchgeführt (vgl. Abbildung 35, Seite 113).

3.3.4 Immunpräzipitation der GC-A aus Kardiomyozyten

Aus der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie wurden zwei transgene Tiere (A, B) geopfert und die Kardiomyozyten isoliert. Diese wurden in Zytosol- (C_A , C_B) und Membranfraktion (M_A , M_B) aufgeteilt. Von jeder Fraktion und jedem Tier wurde eine Probe für die Proteinbestimmung und Analyse im Western Blot aserviert. Anschließend wurden die Membranfraktionen für die IP vereinigt.

Zunächst wurden die Proben einer Präabsorption mit Agarose A unterzogen, um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Agarose abzufangen. Anschließend wurde der Überstand mit anti-HA-Agarose inkubiert. Nach drei Waschschrritten erfolgte die Elution mittels pH-shift in einem Volumen von 100 μ l. Von der enzymatischen Abspaltung mit Hilfe der TEV-Protease wurde zu diesem Zeitpunkt abgesehen, da die Methode, wie Abbildung 20 (vgl. Seite 92) zeigt noch nicht optimiert war. Von der erhaltenen Elution wurden 30 μ l und aus jedem Zwischenschritt 15 μ g Protein im Western Blot aufgetragen und analysiert. Die für die Präabsorption verwendeten Agarosebeads wurden in 100 μ l Laemmli-Puffer (dreifach) gekocht und 30 μ l im Western Blot eingesetzt. Der Nachweis der GC-A erfolgte mittels Antikörpers gegen das HA-Epitop. Als Positivkontrolle dienten 10 μ g Lysat aus zuvor transient mit *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen.



Abbildung 35: Western Blot der Zellfraktionierung und IP an Tieren der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie mit anti-HA-Agarose.

Im Western Blot (anti-HA) wurden die einzelnen Fraktionen, sowie Proben der Zwischenschritte der IP mit anti-HA-Agarosebeads analysiert. Es wurden Kardiomyozyten von zwei transgenen Tieren der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie verwendet. Aufgetragen wurden: Zytosolfraktion Tier 1 (C_A) und Tier 2 (C_B), Membranfraktion Tier 1 (M_A) und Tier 2 (M_B), Präabsorption (P), Unbound (U), Waschschrritte (W1, W2 und W3) jeweils 15 μ g; Elution (E) 30 μ l; Lysat transient mit *pFLAG-HA-TEV-GC-A* transfizierten HEK 293-Zellen (+) 4,5 μ g. Der Western Blot zeigt, dass die GC-A über das HA-tag aufgereinigt und angereichert werden kann. Darüber hinaus wurden die zuvor detektierten etwas kleineren Banden (~110 kDa) (vgl. schwarzer Pfeil) exklusiv im Zytosol mit dem Antikörper gegen das HA-Epitop detektiert.

Wie in Abbildung 35 erkennbar, konnte die HA-getaggte GC-A mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop in der Membranfraktion detektiert werden. Ebenso war die IP gegen das HA-tag erfolgreich und zeigte eine

Aufreinigung und Anreicherung. Somit konnte gezeigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist, die überexprimierte FLAG-HA-TEV-GC-A mittels IP gegen das HA-tag aus Kardiomyozyten aufzureinigen. Auch mit dem Antikörper gegen das HA-Epitop wurde eine kleinere Bande (~110 kDa) in der Zytosolfraktion detektiert. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Western Blot Analysen mit dem Antikörper gegen GC-A an Gesamtlysat aus Herzen sowie isolierter Kardiomyozyten, scheint dieses Experiment, zumindest für die transgenen Tiere, das Ergebnis zu liefern, dass es sich bei der im Zytosol detektierten Bande (~110 kDa) möglicherweise um GC-A handelt. In der Literatur finden sich Studien zur Glykosylierung des GC-A-Rezeptors die zeigen, dass der GC-A-Rezeptor unterschiedlich glykosyliert sein kann und dementsprechend im Western Blot in unterschiedlicher Höhe detektiert wird (Koller 1993, Miyagi 2000). Diese unterschiedliche Glykosylierung könnte eine Erklärung für die hier gemachten Beobachtungen sein.

Im Rahmen des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit wurde somit der Nachweis erbracht, dass transgene Tiere beider Kolonien über eine membranlokalisierte, kardiomyozytenspezifische Überexpression der GC-A verfügen, die, im Falle der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie, dazu verwendet werden kann, den Rezeptor mittels IP gegen das HA-Epitop aus Kardiomyozyten zu präzipitieren. Leider wurde unerwarteterweise auch festgestellt, dass der verwendete Antikörper gegen das FLAG-Epitop, exklusiv im Herzen, mit anderen Proteinen interagiert. Aufgrund dessen wurde festgehalten, dass dieses Epitop für die Zielsetzung und das weitere Vorhaben der Dissertationsarbeit ungeeignet war. Neben diesen Erkenntnissen wurde bisher jedoch noch nicht der Nachweis erbracht, dass der überexprimierte Epitop-getaggte GC-A-Rezeptor funktionsfähig ist. Daher wurde im weiteren Verlauf des zweiten Teils der vorliegenden Dissertationsarbeit der Fokus auf das Erbringen dieses Nachweises und der Untersuchung der Auswirkungen unter pathophysiologischen

Bedingungen auf das Herz der transgenen Tiere gelegt und der Ansatz über Immunpräzipitation Interaktionspartner zu identifizieren im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

3.3.5 Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit ANP

In einem ersten Schritt wurden frisch isolierte Kardiomyozyten mit ANP stimuliert und die Bildung von cGMP im cGMP-RIA quantifiziert. Hierdurch sollte überprüft werden, ob adulte Kardiomyozyten transgener Tiere aufgrund der Überexpression von GC-A an der Zellmembran, auf appliziertes ANP mehr intrazelluläres cGMP bilden oder bereits basal über mehr cGMP verfügen.

Kardiomyozyten aus transgenen und wildtypischen Tieren wurden hierzu isoliert, zur Inhibition von Phosphodiesterasen (PDE) mit dem PDE-Inhibitor 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, final: 0,1 mM) über 15 min vorbehandelt und danach für 10 min mit unterschiedlichen ANP-Konzentrationen inkubiert. Die Stimulation mit ANP wurde durch die Zugabe von eiskaltem Ethanol abgestoppt und die Zellen über Nacht bei -80 °C eingefroren. Nach Pelletieren der Zelltrümmer wurde der Überstand überführt, abgedampft und in Natriumacetat (50 mM, pH 6,0) aufgenommen. Die Menge an gebildetem cGMP wurde im cGMP-RIA quantifiziert. Die Zelltrümmer wurden für die Proteinbestimmung verwendet und die ermittelte Menge an cGMP auf die eingesetzte Menge an Protein in der Probe normiert (vgl. Abbildung 36).

Die basal gemessenen Werte von intrazellulärem cGMP unterscheiden sich zwischen wildtypischen und transgenen Kardiomyozyten nicht. Durch Stimulation mit 10 nM ANP konnte in beiden Gruppen kein signifikanter Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration festgestellt werden. Erst die Stimulation mit 100 nM ANP führte zu einem cGMP-Anstieg, der sich signifikant ($p < 0,05$ gegen Kontrolle, $p < 0,05$ gegen 10 nM ANP) von den basalen Werten, sowie den Werten der Stimulation mit 10 nM ANP

unterscheidet (etwa 1,5-fach bezogen auf Kontrolle). Dieses Ergebnis bestätigte nicht die aufgestellte Hypothese, dass die Überexpression des GC-A-Rezeptors zu einer signifikant höheren Menge an cGMP, nach Stimulation mit ANP führt. Hierfür kommen ganz unterschiedliche Gründe in Frage. Aufgrund der geringen Menge an detektierten cGMP nach Stimulation mit 10 nM bzw. 100 nM in beiden Gruppen besteht die Möglichkeit, dass im Rahmen des Experimentes Fehler (z.B. Stress der Zellen, technische Fehler im cGMP-RIA) gemacht wurden oder es Unstimmigkeiten in der Ermittlung der Proteinmenge gab. Allerdings besteht auch die Möglichkeit dass die transgenen Tiere, trotz Überexpression, nur einen geringen Anteil an funktionsfähigem, sprich stimulierbaren Rezeptor an der Zellmembran der Kardiomyozyten präsentieren. Um die Funktionsfähigkeit genauer zu untersuchen, wurden nachfolgende Experimente zur Induktion kardialer Hypertrophie durch chronische Gabe von Angiotensin II durchgeführt.

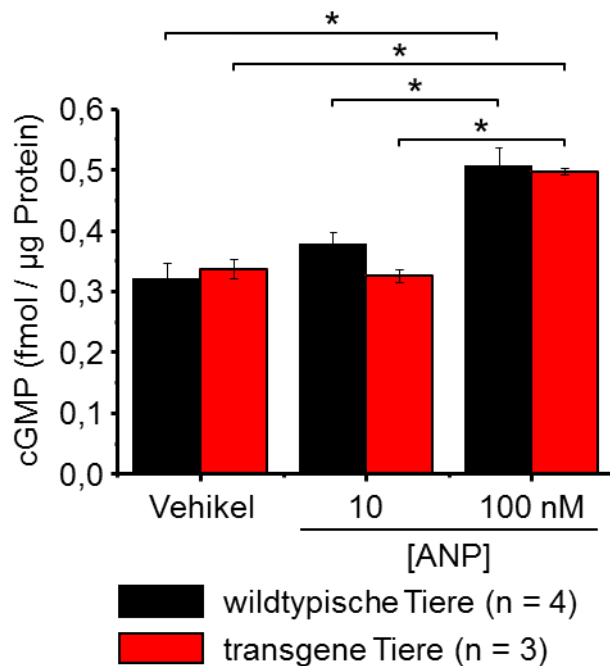


Abbildung 36: Intrazellulärer cGMP-Gehalt von Kardiomyozyten transgener und wildtypischer Tiere basal und nach ANP-Stimulation.

Der cGMP-Gehalt nach Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit den angegebenen ANP-Konzentrationen über 10 min, wurde im cGMP-RIA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied der basalen cGMP Menge zwischen den beiden Gruppen. Die Stimulation mit 10 nM ANP führt im Experiment zu keinem signifikanten Anstieg der gebildeten cGMP-Menge. Die Stimulation mit 100 nM ANP führt zu einer signifikant höheren cGMP Menge, die sich zwischen den Gruppen aber nicht unterscheidet ($p < 0,05$ für 100 nM ANP im Vergleich zu Vehikel).

3.4 Induktion kardialer Hypertrophie

Durch die Western Blot Analysen an adulten Kardiomyozyten gelang es die membranständige Überexpression des GC-A-Rezeptors nachzuweisen. Jedoch konnte durch die Stimulationsversuche mit ANP an frisch isolierten Kardiomyozyten der direkte Nachweis der Funktionsfähigkeit der Überexpression des GC-A-Rezeptors nicht erbracht werden. Da antihypertrophe Effekt des ANP/GC-A Signalweges in der Literatur bekannt sind (Kishimoto 2009, Klaiber 2010, Pandey 2011), wurde daher im nächsten Schritt die Aktivität des GC-A-Rezeptors in vivo untersucht. Ziel dieser Versuchsreihe war die Überprüfung der Hypothese, dass transgene Tiere durch die Überexpression des GC-A-Rezeptors in der Zellmembran

der Kardiomyozyten vor Hypertonie induzierter Herzhypertrophie geschützt sind.

3.4.1 Ergebnisse der Angiotensin II-Studien

Zur Induktion kardialer Hypertrophie in Folge von Hypertonie wurden insgesamt 13 transgene und 17 wildtypische Tiere der FLAG-GC-A-Kolonie in zwei Versuchsreihen, über implantierte osmotische Minipumpen mit Angiotensin II (300 ng/kg/min bzw. 1.000 ng/kg/min), über einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt. Insgesamt wurden im Rahmen der Studien 47 Tiere, davon 26 wildtypische und 21 transgene Tiere untersucht.

3.4.1.1 Effekt von Angiotensin II auf den arteriellen Blutdruck

Das Peptidhormon Angiotensin II aktiviert den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor und verursacht unter anderem eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur in den Arteriolen. Dadurch erhöht sich der periphere Gefäßwiderstand und der Blutdruck steigt (Schmidt 2007). Um diesen Effekt zu überwachen, wurde der arterielle Blutdruck der Versuchs- sowie der Kontrolltiere mittels Schwanzplethysmographie nicht invasiv gemessen. Zunächst erfolgte die Erfassung des basalen Blutdrucks von wildtypischen und transgenen Versuchstieren um Auswirkungen des Genotyps auf den basalen Blutdruck identifizieren zu können. Die Messung des Blutdrucks wurde nach Implantation der osmotischen Minipumpen fortgesetzt, um die hypertensive Wirkung von Angiotensin II erfassen und auch hier mögliche Effekte des Genotyps auf den Blutdruck darstellen zu können. Bereits vor Beginn der eigentlichen Messungen wurden die ausgewählten Tiere an die Versuchsapparatur gewöhnt. Die Apparatur bestand aus einer Röhre und zugehöriger Wärmevorrichtung, in der die Maus bei 32 °C fixiert werden konnte. Anschließend wurde die Blutdruckmanschette um den Schwanz der Maus gelegt. Die Messungen erfolgten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen für maximal 15 min jeweils zur gleichen Tageszeit. Die Ergebnisse der Messungen sind nachfolgend in Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt.

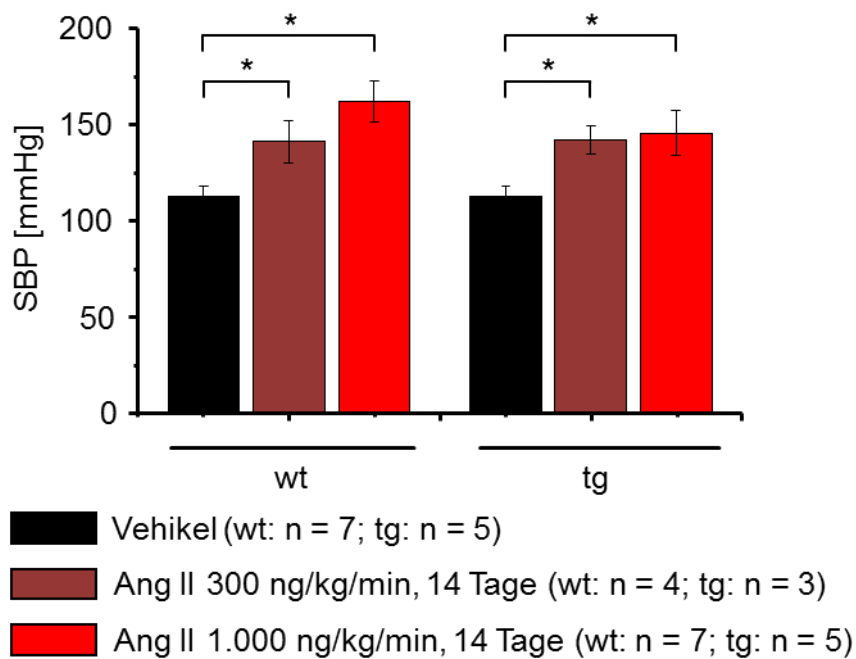


Abbildung 37: Arterieller systolischer Blutdruck von transgenen und wildtypischen Tieren (basal und unter Angiotensin II-Gabe).

Sowohl transgene als auch wildtypische Tiere entwickelten unter chronischer Angiotensin II-Gabe einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$ gegen Vehikel) des systolischen Blutdrucks (SBP). Zwischen transgenen und wildtypischen Versuchstieren gab es weder basal noch nach Applikation von Angiotensin II signifikante Unterschiede in den gemessenen Werten.

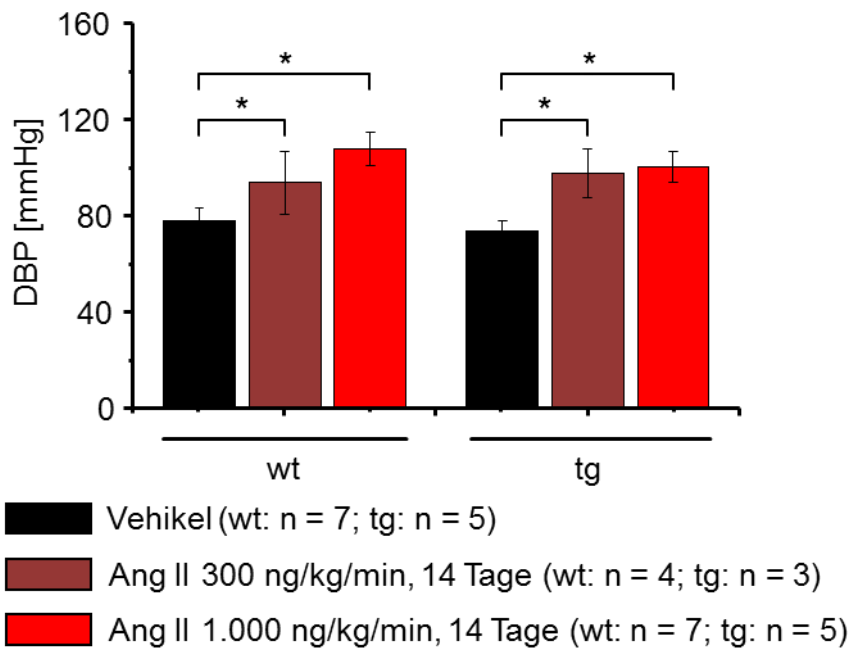


Abbildung 38: Arterieller diastolischer Blutdruck von transgenen und wildtypischen Tieren (basal und unter Angiotensin II-Gabe).

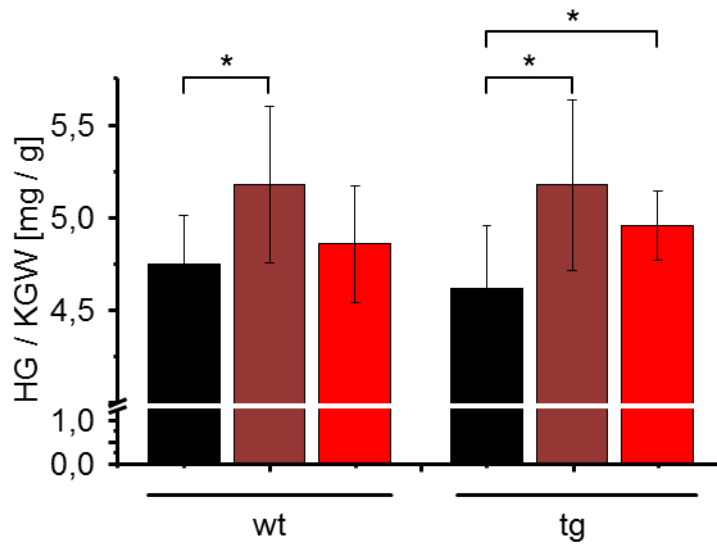
Sowohl transgene als auch wildtypische Tiere entwickelten unter chronischer Angiotensin II-Gabe einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$ gegen Vehikel) des diastolischen Blutdrucks (DBP). Zwischen transgenen und wildtypischen Versuchstieren gab es weder basal noch nach Applikation von Angiotensin II signifikante Unterschiede in den gemessenen Werten.

Unter basalen Bedingungen wurde zwischen wildtypischen (SBP: 117,23 mmHg \pm 10,31, n = 7) und transgenen Tieren (SBP: 117,56 mmHg \pm 6,57, n = 5), kein signifikanter Unterschied in den systolischen Blutdruckwerten festgestellt. Ebenso wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten basalen diastolischen Werten von wildtypischen (DBP: 77,60 mmHg \pm 5,77, n = 7) und transgenen (DBP: 73,78 mmHg \pm 6,78, n = 5) Tieren festgestellt. Die Applikation von Angiotensin II in einer Dosis von 300 ng/kg/min über osmotische Minipumpen führte sowohl bei wildtypischen (SBP: 141,31 mmHg \pm 10,96 n = 4) als auch transgenen (SBP: 142,10 mmHg \pm 7,43, n = 3) Tieren zu einem signifikanten ($p < 0,05$ gegen Vehikel) Anstieg des systolischen Blutdrucks. Ebenso stieg der diastolische Blutdruck bei wildtypischen (DBP: 93,92 mmHg \pm 13,11, n = 4) und transgenen (DBP: 97,92 mmHg \pm 10,08, n = 3) Tieren signifikant ($p < 0,05$ gegen Vehikel) an. Jedoch gab es zwischen wildtypischen und transgenen

Tieren keine signifikanten Unterschiede. Die Applikation von Angiotensin II in einer Dosis von 1.000 ng/kg/min führt bei wildtypischen (SBP: 162,10 mmHg \pm 10,72, n = 7) und transgenen Tieren (SBP: 145,71 mmHg \pm 11,90, n = 5) zu einem signifikanten ($p < 0,05$ gegen Vehikel) Anstieg des systolischen Blutdrucks. Ebenso stieg der diastolische Blutdruck bei wildtypischen (DBP: 107,84 mmHg \pm 6,83, n = 7) und transgenen Tieren (DBP: 100,57 mmHg \pm 6,22, n = 5) signifikant ($p < 0,05$ gegen Vehikel) an. Zwischen wildtypischen und transgenen Tieren wurden auch unter 1.000 ng/kg/min Angiotensin II keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

3.4.1.2 Kardiale Effekte der chronischen Angiotensin II-Gabe

Zur Beurteilung einer möglichen Herzhypertrophie, ausgelöst durch den zuvor nachgewiesenen Anstieg des Blutdrucks unter chronischer Gabe von Angiotensin II, wurden die Herzen der Versuchstiere nach Abschluss der Versuchsreihen untersucht. Ziel war es, anhand des Vergleichs der auf das Körpergewicht (KGW) normierten Gewichte des Gesamtherzens und der linken Ventrikel, mögliche Unterschiede zwischen transgenen Tieren und ihren wildtypischen Geschwistertieren aufzudecken. Die Herzen der Tiere wurden hierzu unter tiefer Inhalationsnarkose (3 % Isofluran) zügig entfernt und das Gewicht des vollständigen Herzens notiert. Anschließend wurden die Atria des jeweiligen Herzens entfernt, das Herz in linken und rechten Ventrikel geteilt und einzeln gewogen. Die Normierung der Gewichte erfolgte auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres (vgl. Abbildung 39, Seite 122 und Abbildung 40, Seite 123).



■ Vehikel (wt: n = 9; tg: n = 8)

■ Ang II 300 ng/kg/min, 14 Tage (wt: n = 9; tg: n = 7)

■ Ang II 1.000 ng/kg/min, 14 Tage (wt: n = 8; tg: n = 6)

Abbildung 39: Herzgewicht von wildtypischen und transgenen Tieren (basal und unter Angiotensin II-Gabe).

Sowohl transgene als auch wildtypische Tiere entwickelten unter chronischer Angiotensin II-Gabe eine signifikante Zunahme des Herzgewichts ($p < 0,05$ gegen Vehikel). Zwischen transgenen und wildtypischen Versuchstieren gab es weder basal noch nach Applikation von Angiotensin II signifikante Unterschiede in den gemessenen Werten.

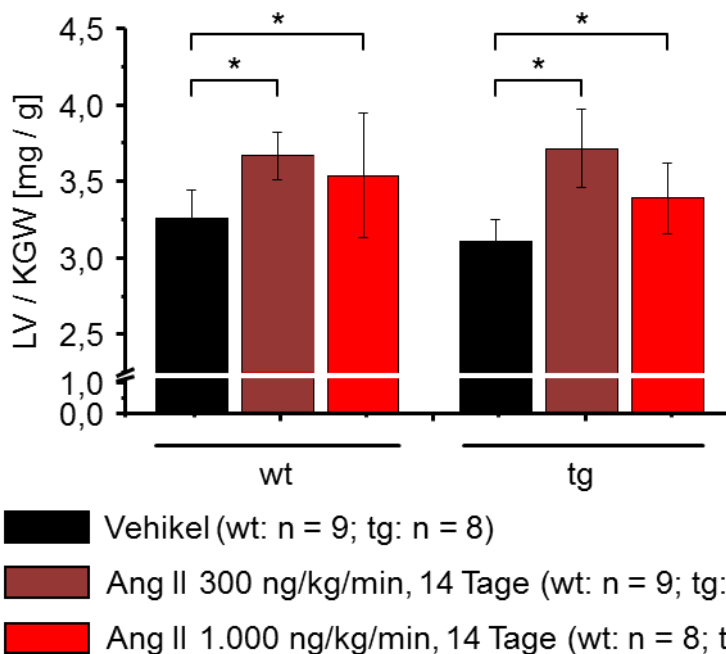


Abbildung 40: Gewicht der linken Ventrikel von wildtypischen und transgenen Tieren (basal und unter Angiotensin II-Gabe).

Sowohl transgene als auch wildtypische Tiere entwickelten unter chronischer Angiotensin II-Gabe eine signifikante Zunahme des Gewichts der linken Ventrikel ($p < 0,05$ gegen Vehikel). Zwischen transgenen und wildtypischen Versuchstieren gab es weder basal noch nach Applikation von Angiotensin II signifikante Unterschiede in den gemessenen Werten.

Die Auswertung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht zeigte basal keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischen ($4,75 \pm 0,27$, $n = 9$) und transgenen ($4,61 \pm 0,34$, $n = 8$) Geschwistertieren. Unter Angiotensin II in einer Dosis von 300 ng/kg/min erhöht sich gegenüber den Kontrolltieren (Vehikel) das Herzgewicht wildtypischer ($5,18 \pm 0,42$, $n = 9$) und transgener ($5,18 \pm 0,46$, $n = 7$) Tiere signifikant ($p < 0,05$ gegen Vehikel). Ebenso führte die Applikation von Angiotensin II in einer Dosis von 1.000 ng/kg/min zu einer signifikanten ($p < 0,05$ gegen Vehikel) Zunahme des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht bei wildtypischen ($4,86 \pm 0,32$, $n = 8$) und transgenen ($4,96 \pm 0,19$, $n = 6$) Tieren. Zwischen den Genotypen gab es allerdings in beiden Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede.

Das ermittelte Verhältnis des Gewichts des linken Ventrikels zum jeweiligen Körpergewicht zeigte basal keine signifikanten Unterschiede zwischen

wildtypischen ($3,26 \pm 0,19$, $n = 9$) und transgenen ($3,10 \pm 0,15$, $n = 8$) Geschwistertieren. Unter Angiotensin II in einer Dosis von 300 ng/kg/min erhöhte sich gegenüber den Kontrolltieren (Vehikel) das Verhältnis der Gewichte sowohl in wildtypischen ($3,67 \pm 0,16$, $n = 9$) als auch in transgenen ($3,72 \pm 0,26$, $n = 7$) Tieren signifikant ($p < 0,05$ gegen Vehikel). Ebenso führte die Applikation von Angiotensin II in einer Dosis von 1.000 ng/kg/min zu einer signifikanten ($p < 0,05$ gegen Vehikel) Zunahme des Verhältnisses der Gewichte in wildtypischen ($3,54 \pm 0,41$, $n = 8$) und transgenen ($3,39 \pm 0,23$, $n = 6$) Tieren. Zwischen den Genotypen gab es in beiden Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der Auswertung für die rechten Ventrikel sind in nachfolgender Abbildung 41 dargestellt.

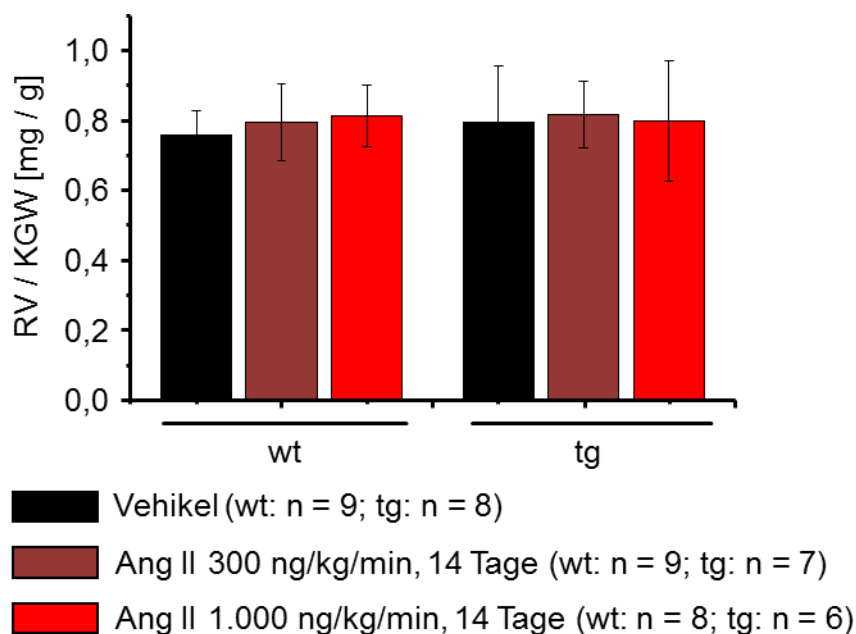


Abbildung 41: Gewicht der rechten Ventrikel von wildtypischen und transgenen Tieren (basal und unter Angiotensin II-Gabe).

Weder transgene noch wildtypische Tiere entwickelten unter chronischer Angiotensin II-Gabe eine signifikante Zunahme des Gewichts der rechten Ventrikel. Zudem gab es zwischen transgenen und wildtypischen Versuchstieren weder basal noch nach Applikation von Angiotensin II signifikante Unterschiede in den gemessenen Werten.

Die Auswertung des Verhältnisses des Gewichts der rechten Ventrikel zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres zeigte basal keine signifikanten

Unterschiede zwischen wildtypischen ($0,76 \pm 0,07$, $n = 9$) und transgenen ($0,79 \pm 0,16$, $n = 8$) Geschwistertieren. Es gab keine signifikanten Änderungen dieses Verhältnisses bei den Tieren, die über 14 Tage Angiotensin II in einer Dosis von 300 ng/kg/min oder 1.000 ng/kg/min erhalten hatten.

3.4.1.3 Kardiomyozytendurchmesser

Mittels Zellfraktionierung an isolierten Kardiomyozyten wurde zunächst nachgewiesen, dass transgene Tiere eine Überexpression des GC-A-Rezeptors in der Membran von Kardiomyozyten aufwiesen (vgl. Abbildung 34 A, Seite 111). Anhand von Proben des linken Ventrikels wurde nun untersucht, ob diese Überexpression des GC-A-Rezeptors einen Einfluss auf die Größe der Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen und nach Angiotensin II-induzierter (300 ng/kg/min, 14 Tage) Herzhypertrophie hat. Hierzu wurden die entnommenen Gewebeproben aus dem linken Ventrikel in Formalin fixiert und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hideo Baba (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen) mittels PAS-Reaktion gefärbt. Abbildung 42 zeigt die erfassten Kardiomyozytendurchmesser von wildtypischen und transgenen Tieren.

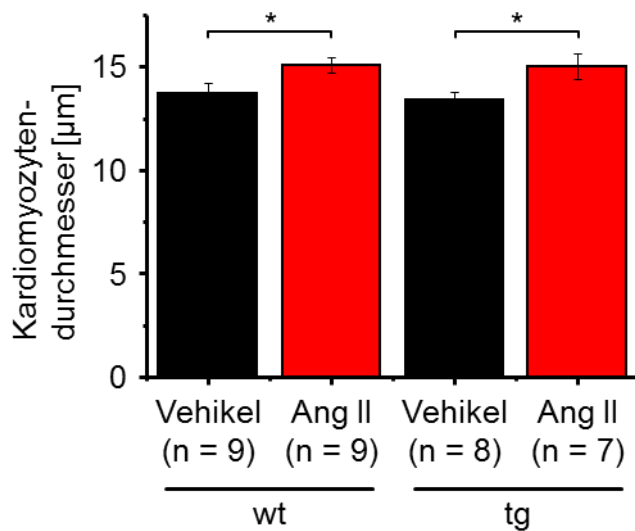


Abbildung 42: Durchmesser der linksventrikulären Myozyten von wildtypischen und transgenen Versuchstieren.

Sowohl wildtypische als auch transgene Tiere entwickelten unter chronischer Angiotensin II-Gabe (300 ng/kg/min, 14 Tage) eine signifikante Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers ($p < 0,05$ gegen Vehikel). Zwischen transgenen und wildtypischen Versuchstieren gab es weder basal noch nach Applikation von Angiotensin II signifikante Unterschiede in den gemessenen Werten.

Unter basalen Bedingungen konnten zwischen wildtypischen ($13,69 \mu\text{m} \pm 4,26$, $n = 9$) und transgenen ($13,43 \mu\text{m} \pm 4,26$, $n = 8$) Tieren keine signifikanten Unterschiede der Kardiomyozytendurchmesser festgestellt werden. Nach Applikation von Angiotensin II über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde sowohl in wildtypischen ($15,06 \mu\text{m} \pm 4,53$, $n = 9$) als auch in transgenen ($15,05 \mu\text{m} \pm 4,78$, $n = 7$) Geschwistertieren ein signifikanter Anstieg des Kardiomyozytendurchmessers ($p < 0,05$ gegen Vehikel) verzeichnet. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint die Überexpression des GC-A-Rezeptors weder basal noch nach chronischer Behandlung mit Angiotensin II in einer Dosis von 300 ng/kg/min, einen Einfluss auf den Kardiomyozytendurchmesser zu haben.

3.4.1.4 cGMP-Gehalt im LV nach 300 ng/kg/min Angiotensin II

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass die Applikation von Angiotensin II zu einem signifikanten Anstieg der im Plasma detektierten Konzentration von ANP führt (Focaccio 1993, Soualmia 1997, Dietz 2005). Da zuvor

nachgewiesen wurde, dass der GC-A-Rezeptor in den Kardiomyozyten transgener Mäuse überexprimiert wird, wurde vermutet, dass dies in Anwesenheit einer erhöhten Konzentration frei zirkulierenden ANP zu mehr detektierbarem cGMP im Herzen führt. Aufgrund dessen wurde das cGMP aus Proben des linken Ventrikels von Angiotensin II behandelten transgenen und wildtypischen Tieren extrahiert und im cGMP-RIA quantifiziert. Die ermittelte cGMP-Menge wurde auf die eingesetzte Proteinmenge normiert. Das in Abbildung 43 dargestellte Ergebnis dieser Auswertung zeigt allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischen und transgenen Tieren.

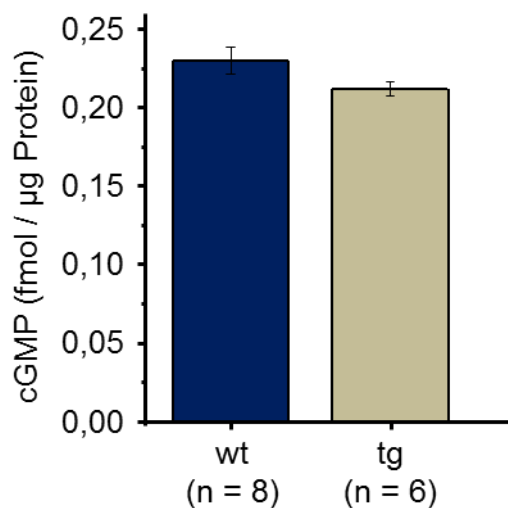


Abbildung 43: cGMP-Gehalt der Proben aus dem linken Ventrikel transgener und wildtypischer Tiere nach Behandlung mit Angiotensin II.

Der cGMP-Gehalt in Proben der linken Ventrikel wurde nach Behandlung von transgenen (n = 6) und wildtypischen (n = 8) Mäusen der FLAG-GC-A-Kolonie mit 300 ng/kg/min Angiotensin II für 14 Tage ermittelt. Zwischen beiden Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede im ermittelten cGMP Gehalt.

3.4.1.5 Echokardiographie

Die Ultraschalluntersuchung des Herzens ist eine wichtige, nicht invasive Methode um strukturelle und funktionale Veränderungen des Herzens untersuchen zu können. Ziel dieser Untersuchungen war es, funktionale Unterschiede der Herzen von transgenen und wildtypischen Tieren, unter basalen Bedingungen und nach Angiotensin II-induzierter Hypertonie, zu

identifizieren und damit Rückschlüsse auf die Auswirkungen der Überexpression des GC-A-Rezeptors zu ermöglichen. Die 13 ausgewählten Tiere (wt: n = 7; tg: n = 6) wurden mittels Echokardiographie einen Tag vor der Implantation von osmotische Minipumpen (vgl. 2.17.2, Seite 68) untersucht. Anschließend erhielten die Tiere über diese Minipumpen Angiotensin II in einer Dosis von 1.000 ng/kg/min über einen Zeitraum von 14 Tagen. Einen Tag vor Abschluss der Versuchsreihe erfolgte eine erneute Untersuchung dieser Tiere mittels Echokardiographie. Nachfolgend sind die prä- und postoperativ ermittelten Werte dargestellt.

a) Vergleich der Wandstärken

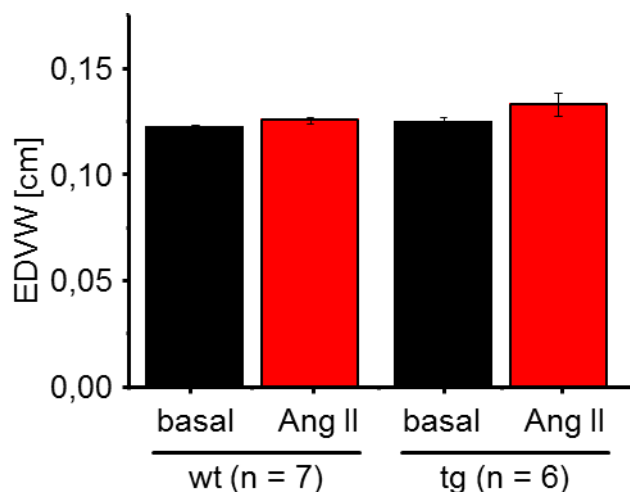


Abbildung 44: Messung der enddiastolischen Vorderwanddicke (EDVW) mittels Echokardiographie.

Die Auswertung der erfassten enddiastolischen Vorderwanddicke (EDVW) der Tiere ergab, dass es basal keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen (n = 6) und wildtypischen (n = 7) Tieren gibt. Die chronische Behandlung der Tiere mit Angiotensin II (1.000 ng/kg/min) führt nach 13 Tagen weder in der transgenen noch in der wildtypischen Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der enddiastolischen Vorderwanddicke.

Wie Abbildung 44 zeigt, wiesen die untersuchten transgenen und wildtypischen Tiere unter basalen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ermittelten enddiastolischen Vorderwanddicke auf. Die Applikation von Angiotensin II (1.000 ng/kg/min) über einen Zeitraum von 13 Tagen führte weder in wildtypischen noch in transgenen Tieren zu einer signifikanten Änderung der gemessenen enddiastolischen

Vorderwanddicke. Ebenso zeigen die Ergebnisse der ermittelten enddiastolischen Hinterwanddicke von transgenen und wildtypischen Tieren (vgl. Abbildung 45) basal keine signifikanten Unterschiede. Auch hier führt die Applikation von Angiotensin II über 13 Tage zu keiner signifikanten Änderung der enddiastolischen Hinterwanddicke. Diese Ergebnisse der Echokardiographie sind nicht mit den zuvor erhobenen Daten der Nekropsie (vgl. 3.4.1.2, Seite 121) und Morphometrie (vgl. 3.4.1.3, Seite 125) konsistent. Beide Gruppen zeigten unter Angiotensin II (1000 ng/kg/min, 14 Tage) einen signifikanten Anstieg des Gewichtes des linken Ventrikels. Ferner wurde eine Zunahme des Durchmessers linksventrikulärer Myozyten unter Angiotensin II (300 ng/kg/min, 14 Tage) beobachtet. Die abweichenden Ergebnisse resultieren möglicherweise daraus, dass die Echokardiographie weniger sensitiv für leichte Veränderungen der Morphologie des Herzens ist.

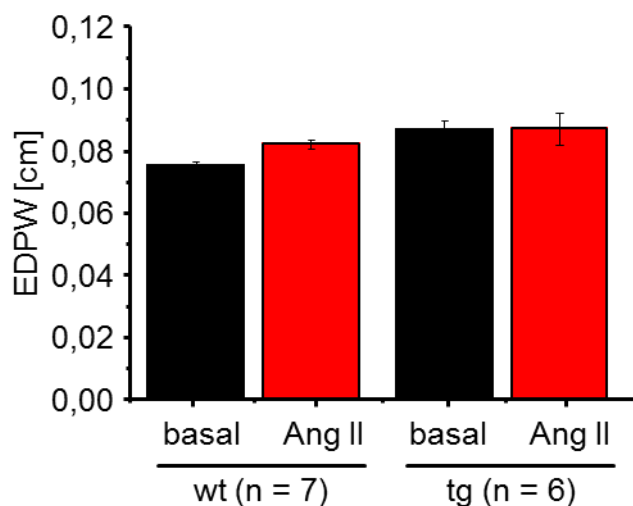


Abbildung 45: Messung der enddiastolischen Hinterwanddicke (EDPW) mittels Echokardiographie.

Die Auswertung der erfassten enddiastolischen Hinterwanddicke (EDPW) der Tiere ergab, dass es basal keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen (n = 6) und wildtypischen (n = 7) Tieren gibt. Die chronische Behandlung der Tiere mit Angiotensin II (1.000 ng/kg/min) führt nach 13 Tagen weder in der transgenen noch in der wildtypischen Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der enddiastolischen Hinterwanddicke.

b) Fraktionelle Verkürzung des Durchmessers der linken Ventrikelkammer
Im Rahmen der Echokardiographie wurden der endsystolische (ESD, vgl. Abbildung 46) sowie der enddiastolische (EDD, vgl. Abbildung 47, Seite 131) Durchmesser der linken Ventrikelkammer basal und 13 Tage nach chronischer Behandlung mit Angiotensin II (1.000 ng/kg/min) von transgenen und wildtypischen Tieren mittels Echokardiographie erfasst.

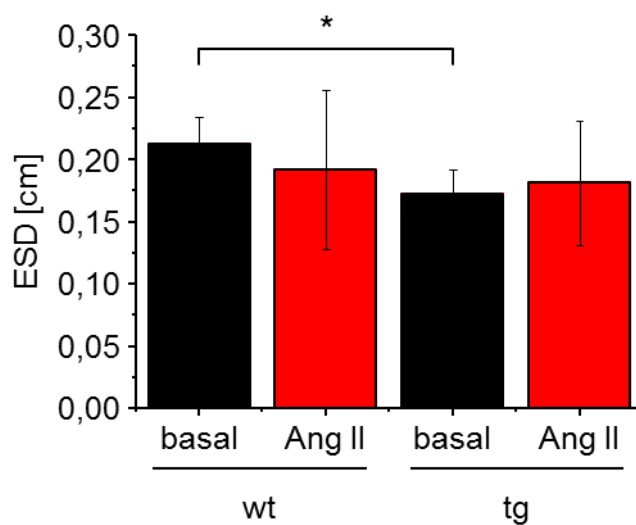


Abbildung 46: Messung des endsystolischen Kammerdurchmessers des linken Ventrikels (ESD) mittels Echokardiographie.

Die Auswertung des erfassten endsystolischen Kammerdurchmessers ergab, dass transgene Tiere basal über eine signifikant geringere Fläche ($p < 0,05$ gegen wt) als ihre wildtypischen Geschwistertiere verfügen.

Transgene Tiere wiesen basal einen signifikant geringeren endsystolischen Kammerdurchmesser (ESD) der linken Ventrikelkammer ($p < 0,05$ gegen wt) auf als die wildtypischen Geschwistertiere. Dies könnte auf eine bessere Kontraktilität der Herzen hindeuten.

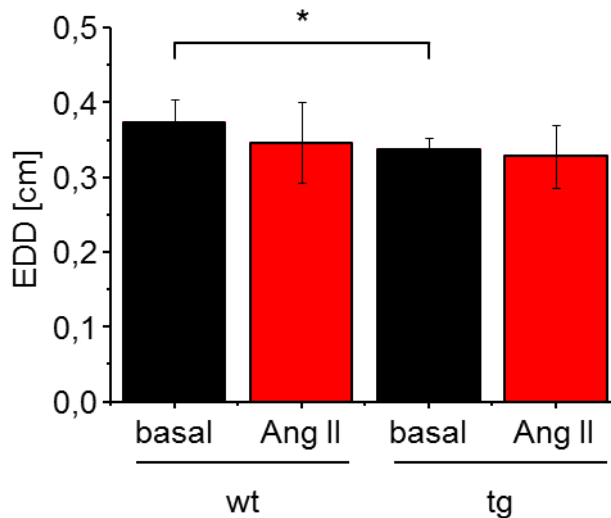


Abbildung 47: Messung des enddiastolischen Kammerdurchmessers des linken Ventrikels (EDD) mittels Echokardiographie.

Die Auswertung des erfassten enddiastolischen Kammerdurchmessers ergab, dass transgene Tiere basal über eine signifikant geringere Fläche ($p < 0,05$ gegen wt) als ihre wildtypischen Geschwistertiere verfügen.

Die erfassten Werte des enddiastolischen Kammerdurchmessers (EDD) der transgenen Tiere zeigten allerdings, dass diese Flächen basal ebenfalls signifikant kleiner sind ($p < 0,05$ gegen wt). Da bei diesen Tieren weder die Vorder- noch Hinterwanddicke größer ist, als bei den wildtypischen Geschwistertieren, könnte dies bedeuten, dass die Herzen der transgenen Tiere insgesamt etwas kleiner sind. Allerdings bestätigt sich dies anhand der erfassten Gewichte des Gesamtherzens bzw. der linken Ventrikel (vgl. Abbildung 39, Seite 122 sowie Abbildung 40, Seite 123) nicht. Die Dimensionen der Herzen wurden allerdings nicht erfasst.

Zur Beurteilung der systolischen Linksventrikelfunktion wurde die fraktionelle Verkürzung der linken Ventrikelkammer anhand der zuvor erfassten Werte nach der Formel $((EDD - ESD) / EDD)$ errechnet. Wie Abbildung 48 zeigt, gibt es weder basal noch nach chronischer Gabe von Angiotensin II signifikante Unterschiede bzw. Änderungen der linksventrikulären Funktion des Herzens.

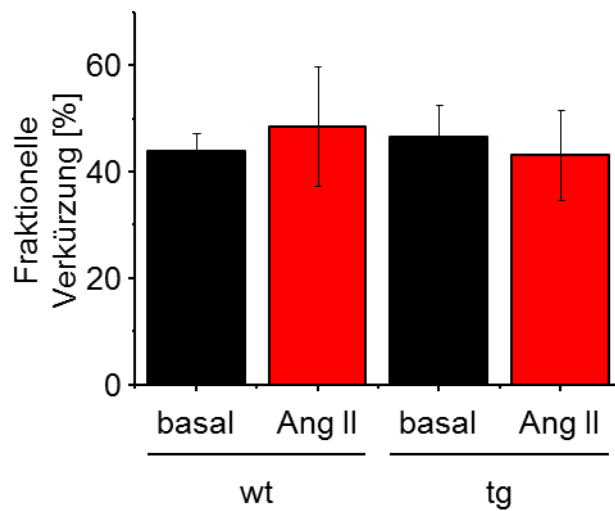


Abbildung 48: Berechnete fraktionelle Verkürzung des Durchmessers des linken Ventrikels der transgenen und wildtypischen Tiere (basal und unter Angiotensin II). Basierend auf den zuvor ermittelten Parametern (EDD, ESD) wurde die fraktionelle Verkürzung des Durchmessers des linken Ventrikels (FS) errechnet. Weder basal noch unter 1.000 ng/kg/min Angiotensin II konnten signifikante Unterschiede zwischen wildtypischen und transgenen Tieren ermittelt werden.

Zusammengefasst zeigte die Echokardiographie, dass es basal keine Unterschiede der systolischen Linksventrikelfunktion zwischen wildtypischen und transgenen Tieren gibt. Auch nach chronischer Behandlung der Tiere beider Gruppen mit Angiotensin II konnten nach 13 Tagen keine signifikanten Unterschiede zu den basalen Werten der jeweiligen Gruppe oder zwischen transgenen und wildtypischen Tieren mittels Echokardiographie ermittelt werden.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung einer neuartigen Isoform des GC-A-Rezeptors (GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330)

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine neuentdeckte Isoform des GC-A-Rezeptors charakterisiert. Die mRNA dieser Isoform wurde in einer Vielzahl von Mausgeweben mittels RT-PCR nachgewiesen (vgl. Abbildung 49). Diese Isoform (GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330) entsteht durch das alternative Spleißen des Exon 4 (Hartmann 2008).

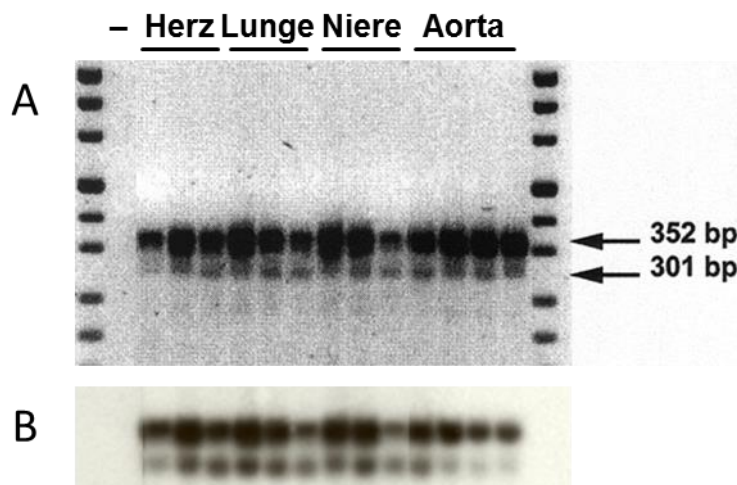


Abbildung 49: Nachweis von GC-A wt und GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330 mRNA mittels Reverse Transkriptase-PCR (modifiziert nach Hartmann 2008).

(A) Die mRNA wurde aus unterschiedlichen Geweben der Maus isoliert und in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Anschließend durchgeführte spezifische PCRs wiesen die wildtypische GC-A (352 bp) und die Isoform (301 bp) in den entsprechenden Geweben nach. (B) Mittels Southern Blot mit einer spezifischen Sonde für GC-A konnten wildtypische GC-A und Isoform ebenfalls detektiert werden. Das Ergebnis zeigt, dass die mRNA für die Isoform in einer weit geringeren Menge in den untersuchten Geweben vorliegt. Dieses Experiment wurde von Dr. Boris Skryabin (Institut für experimentelle Pathologie, Universität Münster) durchgeführt.

Durch Translation der verkürzten mRNA entsteht eine Isoform des GC-A-Rezeptors dem, im Vergleich zum wildtypischen GC-A-Rezeptor, 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne fehlen (GC-A $\Delta_{\text{Lys}}^{314}$ -Gln 330). Im Rahmen der Charakterisierung dieser Isoform wurde die extrazelluläre Domäne dieser Isoform von Prof. Dr. Thomas Müller (Julius-von-Sachs-

Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg) modelliert und mit der extrazellulären Domäne des wildtypischen Rezeptors verglichen. Als Vorlage für die Modellierung der Struktur der Mutante $\text{GC-A}_{\Delta\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ wurde die Kristallstruktur der Ektodomäne des nativen GC-A-Rezeptors der Ratte (MMDB ID: 13914) verwendet (vgl. Abbildung 50).

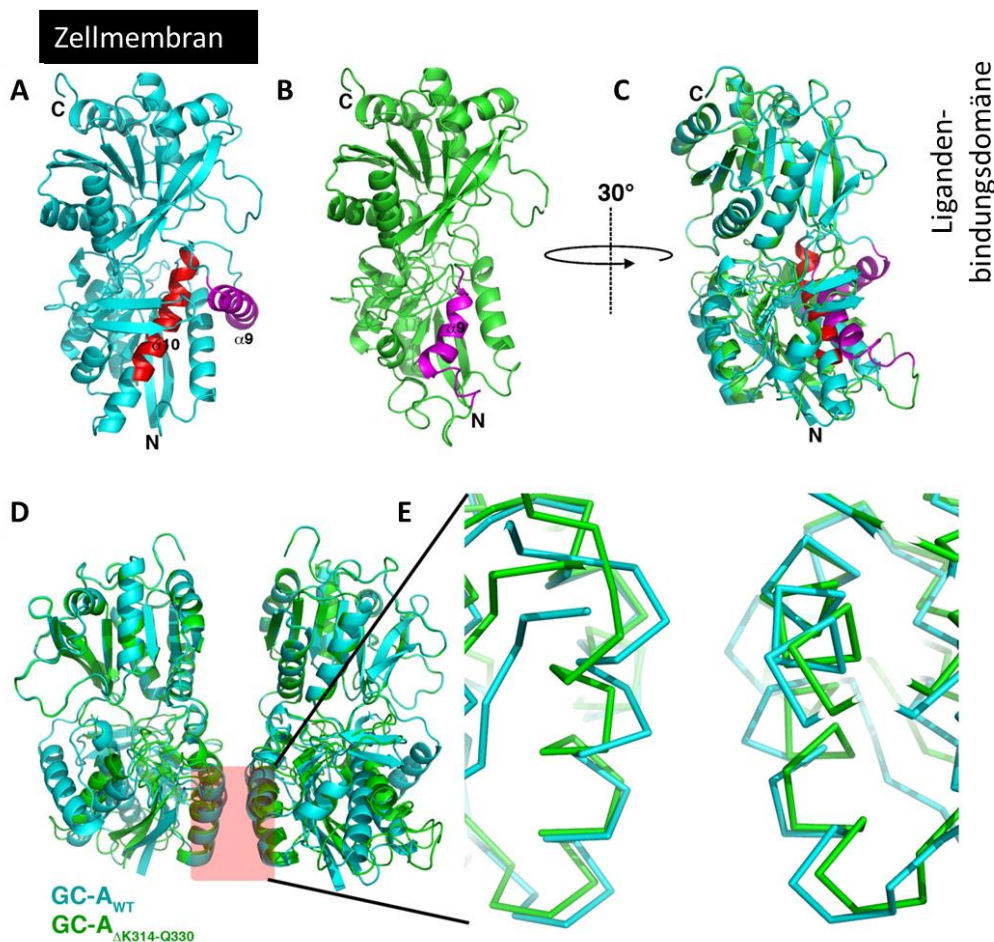


Abbildung 50: Molekulare Modellierung der extrazellulären Domäne von GC-A wt und $\text{GC-A}_{\Delta\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ (Hartmann 2008).

(A) Durch die Deletion von 17 Aminosäuren fehlt ein Großteil der Helix 10 (in rot). Die Helix 9, die in die Position der Helix 10 rückt, ist violett dargestellt. (B) Anhand der Struktur der wildtypischen GC-A ergibt sich die dargestellte finale Struktur der extrazellulären Domäne der Isoform $\text{GC-A}_{\Delta\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$. (C) Durch Überlagerung der Struktur der extrazellulären Domäne von GC-A wt und $\text{GC-A}_{\Delta\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ unter unterschiedlichen Betrachtungswinkeln (D) zeigt sich, dass die Veränderungen primär keinen direkten Einfluss auf die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors haben. Allerdings ist der membrannaher Teil betroffen, der für die Dimerisierung relevant ist (E). Diese Modellierungen wurden von Prof. Dr. Thomas Müller (Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg) durchgeführt.

Die molekulare Modellierung zeigte, dass die Deletion der Aminosäuren Lys³¹⁴ bis Gln³³⁰ Auswirkungen auf die Bildung einer α -Helix im membranahen Teil des GC-A-Rezeptors haben (Hartmann 2008). Ein direkter Einfluss auf die ANP-Bindungsfähigkeit der GC-A Isoform erschien daher als unwahrscheinlich, da sich die Bindungsregion für den Liganden ANP im membranabgewandten Bereich der extrazellulären Domäne befindet. Jedoch ist dieser Bereich der extrazellulären Domäne an der Bildung von Dimeren beteiligt und könnte den Signalweg auf diesem Wege beeinflussen (Akker 2000).

Die Experimente zur Charakterisierung dieser Isoform des GC-A-Rezeptors an transient transfizierten HEK 293-Zellen zeigten, dass die Mutante, ähnlich wie der wildtypische Rezeptor, an der Oberfläche transient transfizierter HEK 293-Zellen präsentiert wird (vgl. Abbildung 10, Seite 74 und Abbildung 11, Seite 76). Eine ANP-induzierte intrazelluläre Bildung von cGMP konnte jedoch nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 14, Seite 80; Abbildung 12, Seite 78 und Abbildung 13, Seite 79). Nachfolgend durchgeführte Experimente zur Bindungsfähigkeit zeigten, dass die Mutante GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ den Liganden ANP nicht binden kann (vgl. Abbildung 15, Seite 81) und lieferten somit die Erklärung für die zuvor gemachte Beobachtung der fehlenden ANP-vermittelten Aktivierung der Guanylatzyklase. Anhand von Koimmunpräzipitationsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Mutante Heterodimere mit dem wildtypischen GC-A-Rezeptor bilden kann (vgl. Abbildung 16, Seite 84). Der Einfluss dieser Heterodimerbildung auf die Aktivierbarkeit der GC-A mit dem Liganden ANP wurde nachfolgend an transient transfizierten HEK 293-Zellen untersucht. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Koexpression von wildtypischer GC-A und der Isoform zu einem deutlich geringeren ANP-induzierten, Anstieg des intrazellulär gebildeten cGMPs führt. Obwohl die Isoform des GC-A-Rezeptors selbst nicht in der Lage ist ANP zu binden, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$

möglicherweise eine regulierende Rolle einnimmt. Durch das Vorhandensein einer entsprechend großen Anzahl von Rezeptoren der Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass diese nicht funktionale Heterodimere mit dem wildtypischen Rezeptor bildet und somit den ANP/GC-A-Signalweg negativ reguliert.

Die Ergebnisse dieses Teils der Dissertationsarbeit sind konsistent mit Arbeiten anderer Gruppen, die auch für einige andere Mitglieder der Familie der Guanylatzyklasen alternatives Spleißen beschrieben haben. Beispielsweise werden in der Arbeit von Tamura und Garbers (Tamura 2003) zwei Isoformen des Rezeptors für das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), die membranständige Guanylatzyklase B (GC-B) beschrieben. Die grundlegende Struktur des GC-B-Rezeptors ist identisch mit dem von GC-A (Potter 2006), jedoch spielt der CNP/GC-B-Signalweg eine besonders wichtige Rolle für Wachstum und Entwicklung von Zellen (Tamura 2003). Wie Knockout-Studien für GC-B zeigen, führt die Deletion des GC-B-Rezeptors in Mäusen (GC-B KO) zu Kleinwuchs (Tamura 2004). Tamura und Garbers beschreiben in ihrer Arbeit ebenfalls, dass die mRNA für diese Isoformen in einer Vielzahl von murinen Geweben nachgewiesen wurde. Eine der Mutanten entsteht durch alternatives Spleißen des Exons 9 (Deletion von 75 Basenpaaren) und führt zu einer Isoform, der 25 Aminosäuren der intrazellulären kinasehomologen Domäne fehlen (GC-B2). Die andere Isoform besteht lediglich aus einem Großteil der extrazellulären Domäne und ist mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa nur halb so groß wie der wildtypische Rezeptor (~120 kDa).

Anders als im Rahmen des ersten Teils dieser Dissertationsarbeit für die Isoform GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ beschrieben, verfügt GC-B2 jedoch noch über die Fähigkeit seinen Liganden CNP zu binden. Auch ist die basal gemessene intrazelluläre cGMP-Konzentration vergleichbar mit dem des wildtypischen Rezeptors. Allerdings kann auch diese Isoform mit ihrem Liganden nicht zur Bildung von cGMP stimuliert werden. Die Autoren begründen dies damit,

dass durch die Deletion drei von sechs potentiellen Phosphorylierungsstellen sowie das vermutete ATP-Bindungsmotiv fehlen. Vergleichbar mit den Ergebnissen dieses Teils der Dissertationsarbeit ist die beschriebene Beobachtung, dass die Isoform GC-B2 mit dem wildtypischen GC-B-Rezeptor Heterodimere bildet und dadurch die Stimulierbarkeit des Rezeptors signifikant verringert (Tamura 2003).

Neben GC-B als Vertreter der partikulären Guanylatzyklen wurde alternatives Spleißen auch für die lösliche Guanylatzyklase (sGC) beschrieben (Behrends 1995, Sharina 2008). Die sGC liegt als zytosolisches Protein vor und wird durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert. Der NO/sGC/cGMP-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Vasodilatation und hat somit eine wichtige Funktion für die Blutdruckregulation (Gupta 1997). Anders als die membranständigen Guanylatzyklen GC-A und GC-B liegt die sGC nicht als Homodimer sondern als Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, vor. In der Literatur sind insgesamt vier Varianten dieser Untereinheiten beschrieben ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$). Lediglich die Heterodimere $\alpha 1/\beta 1$ und $\alpha 2/\beta 1$ werden durch NO aktiviert, wobei das $\alpha 1/\beta 1$ -Heterodimer am häufigsten vorkommt und ubiquitär verbreitet ist (Sharina 2008). In der Literatur wurden sowohl für die $\alpha 1$ -Untereinheit (Sharina 2008), als auch für $\alpha 2$ -Untereinheit (Behrends 1995) Isoformen beschrieben. Beide Isoformen bilden Heterodimere mit der $\beta 1$ -Untereinheit und wirken dabei als dominant negative Form. Dies führt zu einer reduzierten NO-induzierten cGMP-Bildung in vitro (Behrends 1995, Sharina 2008).

In Verbindung mit den, im Rahmen des ersten Teils dieser Dissertationsarbeit, vorgestellten Ergebnissen besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass alternatives Spleißen ein Mechanismus ist durch den, für die Familie der Guanylatzyklen dominant negative Isoformen hervorgebracht werden und die den entsprechenden Signalweg negativ regulieren.

Zahlreiche *in vitro* Studien zeigen, dass die Applikation chronisch hoher Dosen des Hormons Angiotensin II den ANP/GC-A-Signalweg hemmt (Smith 1987, Haneda 1991, Arise 2006). Beispielsweise führt Angiotensin II *in vitro* zu Dephosphorylierung des GC-A-Rezeptors und damit einhergehende Desensitisierung (Potter 1994, Schröter 2010). Um zu ergründen, ob das alternative Spleißen des GC-A-Rezeptors auch *in vivo* bei der negativen Regulierung des ANP/GC-A Signalweges durch Angiotensin II eine Rolle spielt, wurden Versuchstiere über osmotische Minipumpen mit Angiotensin II (300 ng/kg/min, 7 Tage) behandelt. Aus dem Lungengewebe der Angiotensin II-behandelten Tiere sowie der Kontrolltiere (Vehikel), wurden die Zellmembranen isoliert, mit ANP stimuliert und die Menge des gebildeten cGMPs im cGMP-RIA quantifiziert. Das Ergebnis dieser Stimulationsversuche zeigte eine deutlich reduzierte ANP-induzierte cGMP-Bildung im Lungengewebe Angiotensin II-behandelter Tiere (vgl. Abbildung 51, Seite 139).

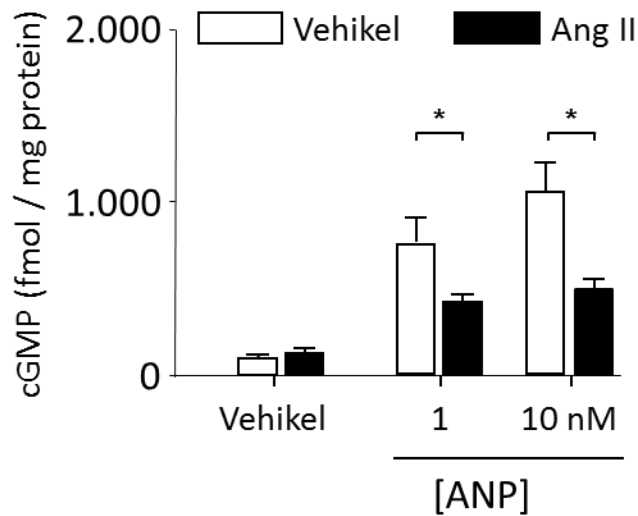


Abbildung 51: Auswirkung der chronischen Behandlung mit Angiotensin II auf die Stimulierbarkeit der Guanylatzyklase mit ANP in der Maus (Hartmann 2008).

Mäuse wurden mit Ang II (300 ng/kg/min, 7 Tage) über osmotische Minipumpen behandelt. Anschließend wurden aus den Lungen der Tiere die Zellmembranen isoliert und im Zyklastase Assay mit den angegebenen Konzentration an ANP stimuliert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des gebildeten cGMPs im cGMP-RIA. Das Ergebnis zeigt, dass die chronische Behandlung der Tiere mit Angiotensin II die Stimulierbarkeit der GC-A hemmt. Diese Versuche wurden von Prof. Dr. Michaela Kuhn (Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt.

Die Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen GC-A zeigten durch die Behandlung der Tiere mit Angiotensin II jedoch keine Unterschiede in der Expression der GC-A im Lungengewebe (vgl. Abbildung 52, Seite 140).

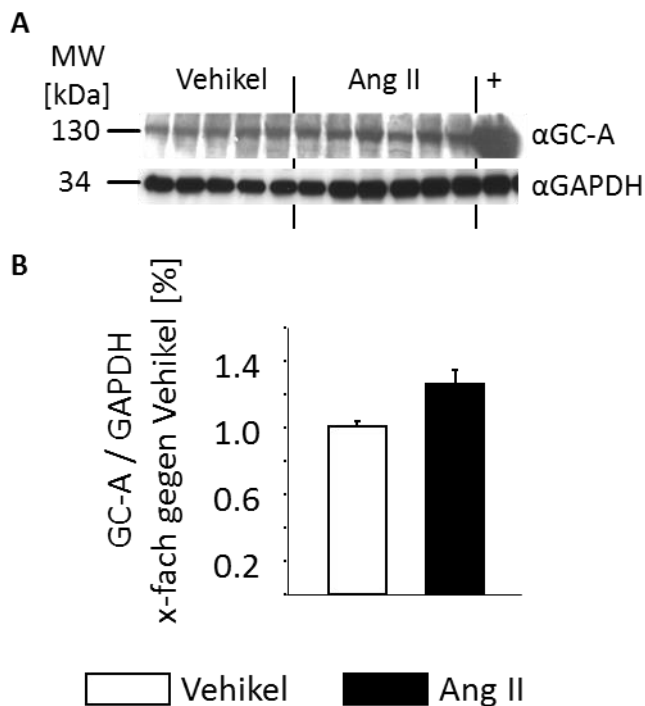


Abbildung 52: Auswirkung der chronischen Behandlung mit Angiotensin II auf die Expression der GC-A im Lungengewebe von Mäusen (Hartmann 2008).

(A) Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen GC-A sowie GAPDH an Lungengewebe von Mäusen zeigten, dass die Expression von GC-A durch die Behandlung mit Angiotensin II nicht verändert ist (B). Diese Versuche wurden von Prof. Dr. Michaela Kuhn (Insitut für Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt.

Aufgrund der geringen Unterschiede in der Molekularmasse von wildtypischer GC-A (~130 kDa) und der Isoform (~128 kDa) konnte auf Basis dieser Western Blot Analyse allerdings keine Aussage über das Verhältnis wildtypischer GC-A zur Isoform $GC-A_{\Delta_{Lys}^{314}-Gln}^{330}$ im untersuchten Lungengewebe getroffen werden. Daher wurde mittels quantitativer Real-Time RT-PCR die Menge an mRNA für GC-A wildtyp und die Isoform $GC-A_{\Delta_{Lys}^{314}-Gln}^{330}$ quantifiziert. Interessanterweise zeigte das Ergebnis dieser Analyse, dass das Verhältnis von mRNA der Isoform zu mRNA der wildtypischen GC-A im Lungengewebe Angiotensin II-behandelter Mäuse deutlich erhöht ist (vgl. Abbildung 18, Seite 87).

Da die vorangegangenen Versuche an HEK 293-Zellen gezeigt hatten, dass die Isoform $GC-A_{\Delta_{Lys}^{314}-Gln}^{330}$ als dominant negativer Regulator

fungiert, kann zusammengefasst gesagt werden, dass Angiotensin II-induziertes alternatives Spleißen des GC-A-Rezeptors einen neuen Mechanismus darstellt, der die Sensitivität des wildtypischen Rezeptors für den Liganden ANP reduziert (Hartmann 2008).

Basierend auf diesen Ergebnissen ergeben sich weitere Fragestellungen um die Bedeutung von alternativem Spleißen des GC-A-Rezeptors für die Entstehung von Bluthochdruck und Herzhypertrophie besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Studie wurde die mRNA aus homogenisiertem Lungengewebe verwendet um das Verhältnis von gespleißter zu wildtypischer GC-A zu ermitteln. Somit bleibt an dieser Stelle unklar in welchen Zelltypen das Angiotensin II-induzierte alternative Spleißen für den GC-A-Rezeptor möglicherweise primär auftritt. Da der GC-A-Rezeptor sehr dicht in den mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge exprimiert wird (Kuhn 2012), könnte in einem ersten Ansatz versucht werden diese Zellen näher zu untersuchen. Dabei wäre es erstrebenswert zu evaluieren, ob die im Rahmen dieses ersten Teils der Dissertationsarbeit charakterisierte Isoform des GC-A-Rezeptors in vivo als Protein nachgewiesen werden kann. Aufgrund der geringen Differenz von 17 Aminosäuren wäre ein erster möglicher Ansatz den GC-A-Rezeptor aus den Endothelzellen der Lunge mit dem in der AG Kuhn vorhandenen Antikörper gegen den C-Terminus der GC-A zu präzipitieren und anschließend die tryptischen Peptide mittels Massenspektrometrie zu analysieren. Basierend auf der putativen Aminosäuresequenz für die Mutante würde der Verdau mit Trypsin ein Peptid liefern das mittels Massenspektrometrie eindeutig der Isoform zuordenbar wäre. In einem zweiten Schritt könnte möglicherweise ein spezifischer Antikörper gegen die Mutante erzeugt werden. Parallel dazu wäre es für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen besonders relevant zu verifizieren, ob diese oder eine vergleichbare Isoform des GC-A-Rezeptors auch in humanem Gewebe identifiziert

werden kann. Basierend auf den vorliegenden Daten könnte die Analyse von humanem Lungengewebe ein erster Ansatz sein.

Im Weiteren wäre es ein lohnendes Ziel den Mechanismus aufzuklären, der für das beobachtete alternative Spleißen des GC-A-Rezeptors in vivo verantwortlich ist. Unklar ist zum aktuellen Zeitpunkt, ob die Angiotensin II-induzierte Erhöhung des systolischen Blutdrucks oder das Angiotensin II selbst alternatives Spleißen induziert. Arbeiten zum alternativen Spleißen der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (PKG I) in vivo zeigen bereits vier Tage nach Applikation von Angiotensin II über osmotische Minipumpen eine signifikante Zunahme der gespleißten Isoform der PKG I. Da die Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt noch keinen signifikant erhöhten Blutdruck aufwiesen folgerten die Autoren, dass Angiotensin II das alternative Spleißen auslöst (Gerzanich 2003). Auch die Arbeit von Gao und Kollegen zur Untersuchung von Isoformen kardialer Natriumkanäle (SCN5A) die durch alternatives Spleißen entstehen, zeigen vergleichbare Ergebnisse. Im Rahmen der Studie wurden von humanen embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass Angiotensin II oder Hypoxie alternatives Spleißen induzieren kann (Gao 2013 A). Die Ergebnisse dieser Studien können als Ausgangsbasis herangezogen werden um den Mechanismus des alternativen Spleißens für den GC-A-Rezeptor genauer zu ergründen.

Durch die Identifizierung und insbesondere die Charakterisierung dieser Isoform des GC-A-Rezeptors sowie seiner Bedeutung für die Regulierung des ANP/GC-A-Signalweges eröffnen sich somit insgesamt weitere Ansatzpunkte um alternatives Spleißen als Regulationsmechanismus bei der Entwicklung von Bluthochdruck und Herzhypertrophie zu erforschen.

4.2 Charakterisierung der FLAG-HA-TEV-GC-A in vitro

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein GC-A-Rezeptor generiert, der neben dem FLAG-Epitop zusätzlich über ein HA-Epitop sowie eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease verfügt. Die Expression der FLAG-HA-TEV-GC-A in HEK 293-Zellen wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen GC-A, das FLAG- sowie HA-Epitop im Western Blot erbracht (vgl. Abbildung 19, Seite 89). Die Funktionalität der TEV-Restriktionsstelle in der Epitopregion wurde durch IP-Experimente mit nachfolgender enzymatischer Abspaltung, in Anwesenheit von TEV-Protease, belegt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Elution auch in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren möglich ist. Die Anwesenheit dieser Inhibitoren spielt bei den Experimenten zur Charakterisierung des Rezeptors sowie möglicher Interaktionspartner eine wichtige Rolle, da Proteasen den Rezeptor oder dessen Interaktionspartner degradieren oder die Interaktion beenden könnten. Die innerhalb dieser Arbeit zum Test der Restriktionssequenz verwendeten Elutionsbedingungen waren noch unzureichend. Der Western Blot zeigte klar, dass noch sehr viel GC-A an den Agarosebeads verblieben war (vgl. Abbildung 20, Seite 92). Für zukünftige Experimente, bei denen die Elution über die TEV-Protease erfolgt, wäre es zielführend im Vorfeld eine genaue Ermittlung der zugegebenen Proteinmenge und darauf basierender Kalkulation der zu verwendenden Menge an TEV-Protease durchzuführen. Grundsätzlich konnte aber durch das erzielte Ergebnis davon ausgegangen werden, dass die Elution mittels TEV-Protease insbesondere in Anwesenheit der verwendeten Proteaseinhibitoren möglich ist.

Da sich die erweiterte Epitopregion N-terminal und somit nahe der Bindungsstelle für den Liganden ANP befindet, wurde die Funktionalität des Rezeptors durch Stimulationsexperimente überprüft. Hierzu wurde, die durch das Protein FLAG-HA-TEV-GC-A gebildete Menge an cGMP, mit der

durch GC-A wt und FLAG-GC-A verglichen (vgl. Abbildung 21, Seite 93). Nach Stimulation der Zellen über einen Zeitraum von 10 min konnte festgestellt werden, dass die Gesamtmenge detektierten cGMPs pro Versuchsansatz zwischen den analysierten GC-A-Rezeptoren ähnlich ist. Eine Aussage über die Bildungskinetik von cGMP konnte dabei aber nicht getroffen werden. Daher wurden ergänzend, in Zusammenarbeit mit Dr. Viacheslav Nikolaev, FRET-Experimente durchgeführt, um die Kinetik der cGMP-Bildung zu untersuchen. Die FRET-Messungen mit einem transient transfizierten, intrazellulär exprimierten Sensor für cGMP (Nikolaev 2006) erfolgte an einzelnen intakten HEK 293-Zellen. Aufgrund dieses Versuchsaufbaus kann durch eine intrazelluläre Antwort des exprimierten cGMP-Sensors auf die extrazelluläre Applikation von 10 nM ANP der Schluss zugelassen werden, dass der FLAG-HA-TEV-GC-A-Rezeptor membranständig präsentiert wird. Die betrachteten Rezeptoren GC-A wt und FLAG-HA-TEV-GC-A reagierten mit einem deutlichen und konstanten Anstieg intrazellulären cGMPs (vgl. Abbildung 22, Seite 94 und Abbildung 23, Seite 95). Es konnte zwischen den beiden Rezeptoren keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Änderung des YFP/CFP-Ratio oder der benötigten Zeit bis zum Erreichen der Plateauphase ermittelt werden. Die Plateauphase stellt sich ein sobald eine vollständige Sättigung des kotransfizierten cGMP-Sensors erreicht ist. Basierend auf diesen Ergebnissen für den generierten Rezeptor FLAG-HA-TEV-GC-A sowie den Arbeiten zur Charakterisierung der FLAG-GC-A innerhalb der AG Kuhn (Schröter 2010) wurde aus der cDNA für die beiden getaggen GC-A-Rezeptoren je ein Plasmid erzeugt, mit denen die Generierung transgener Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des jeweiligen Rezeptors möglich ist.

4.3 Charakterisierung der Mauslinien mit herzspezifischer Überexpression epitopgetaggtter GC-A

4.3.1 Nachweis der Überexpression des modifizierten GC-A-Rezeptors in Herzen transgener Mäuse

Die drei erhaltenen transgenen Founder der FLAG-GC-A-Kolonie brachten Nachkommen mit unterschiedlich starker Expression des GC-A-Rezeptors im Herzen hervor. Wir beschlossen eine Linie mit dem Founder 18 zu etablieren, da dessen Nachkommen die stärkste Überexpression (vgl. Abbildung 26, Seite 101) aufwies. Wir vermuteten, dass der protektive Effekt nach Induktion von Herzhypertrophie hier am deutlichsten zu identifizieren sein müsste. Die Arbeit von Kishimoto und Kollegen zeigte bereits, dass Tiere mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des GC-A-Rezeptors, verglichen mit ihren wildtypischen Geschwistertieren, signifikant kleinere Herzen und geringere Kardiomyozytendurchmesser aufweisen. Auswirkungen auf den arteriellen Blutdruck wurden durch die Überexpression nicht beobachtet (Kishimoto 2001). Tiere mit globaler Deletion des GC-A-Rezeptors (GC-A KO) hingegen sind spontan hypertensiv und entwickeln sehr früh eine Herzhypertrophie (Lopez 1995, Kishimoto 2009). Kishimoto und Kollegen verpaarten die transgenen Mäuse mit Tieren der GC-A KO Kolonie. Dies führte zu Nachkommen mit spontaner Hypertonie und einem unverändert hohem Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht (verglichen mit Geschwistertieren der GC-A KO Kolonie). Interessanterweise reduzierte sich durch die Expression des Transgens in Tieren der GC-A KO Kolonie der Kardiomyozytendurchmesser signifikant. Gleichzeitig zeigten in vitro Experimente an kultivierten Kardiomyozyten und Fibroblasten, dass ANP das Wachstum und die Proliferation unterdrückt (Ca0 1995, Calderone 1998). Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die kardiomyozytenspezifische Überexpression des GC-A-

Rezeptors die Tiere vor hypertonieinduzierter Herzhypertrophie und Fibrose schützt (Kishimoto 2001, Kishimoto 2009).

Die Erzeugung transgener Tiere für die FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie brachte zwei positive Founder hervor von denen nur einer der beiden in der Lage war das Transgen weiterzugeben. Die resultierende FLAG-GC-A- sowie die FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie wurden im Tierstall der AG Kuhn durch Verpaarung mit FVB/N wt gezüchtet und charakterisiert. Transgene und nicht transgene Tiere entwickelten sich unauffällig und wiesen äußerlich keine Unterschiede auf. Im Western Blot wurde an beiden Linien nachgewiesen, dass die Tiere die gewünschte herzspezifische Überexpression der GC-A aufwiesen (vgl. Abbildung 25, Seite 100 und Abbildung 28, Seite 103). Experimente an frisch isolierten Kardiomyozyten deren zytosolische und membranäre Proteine fraktioniert und im Western Blot analysiert wurden, zeigten eine deutliche Überexpression des GC-A-Rezeptors (vgl. Abbildung 34 A, Seite 111) in der Membranfraktion der Kardiomyozyten transgener Tiere.

Unerwarteterweise gelang der eindeutige und spezifische Nachweis des FLAG-Epitops mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen das FLAG-Epitop weder in der FLAG-GC-A- noch in der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie. Innerhalb des murinen Herzens wird offensichtlich ein Protein exprimiert für das die beiden getesteten Antikörper gegen das FLAG-Epitop eine hohe Bindungsaffinität aufwiesen. Eines der Proteine oder Proteinkomplexe liegt mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa exakt auf der Höhe des GC-A-Rezeptors. Somit war es auch nicht möglich durch starke Auftrennung zumindest den Nachweis des FLAG-Epitops zu erbringen (vgl. Abbildung 31, Seite 107). Arbeiten anderer Gruppen zeigen allerdings, dass es möglich ist Proteine mit FLAG-tag im Herzen zu exprimieren und nachfolgend im Western Blot zu detektieren (Ruggiero 2013, Yang 2013). Möglicherweise zeichneten sich die denaturierenden Bedingungen bei der Vorbereitung der Proben für die Beobachtung

verantwortlich. Aus diesen Gründen könnte versucht werden die Bedingungen der Probenvorbereitung oder die eingesetzten Antikörper zu ändern und damit eine IP gegen das FLAG-Epitop zu entwickeln. Im Gegensatz zum FLAG-Epitop konnte das HA-Epitop, im Herzen von transgenen Tieren der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie, mit Hilfe eines Antikörpers gegen das HA-Epitop sehr spezifisch nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 33, Seite 109). Es gelang mit Hilfe des HA-Epitops die HA-Epitop-getaggte GC-A aus der Membranfraktion von zuvor isolierten Kardiomyozyten mit einer Überexpression des HA-getaggen GC-A-Rezeptors anzureichern und aufzureinigen (vgl. Abbildung 35, Seite 113). Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde diese Methode jedoch nicht weiter verfeinert und für die Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern verwendet, da zunächst noch der Nachweis zu erbringen war, dass der überexprimierte Epitop-getaggte GC-A-Rezeptor funktionsfähig ist. Es gelang jedoch, zusammen mit Mitarbeitern der AG Kuhn, eine zuvor *in vitro* nachgewiesene Interaktion des GC-A-Rezeptors, mit rezeptoraktivierten Kationenkanälen *Transient Receptor Potential Canonical Type 3* und *Type 6* (TRPC3/TRPC6), mit Hilfe dieser Tiere auch *in vivo* (vgl. Abbildung 53) nachzuweisen (Klaiber 2011).

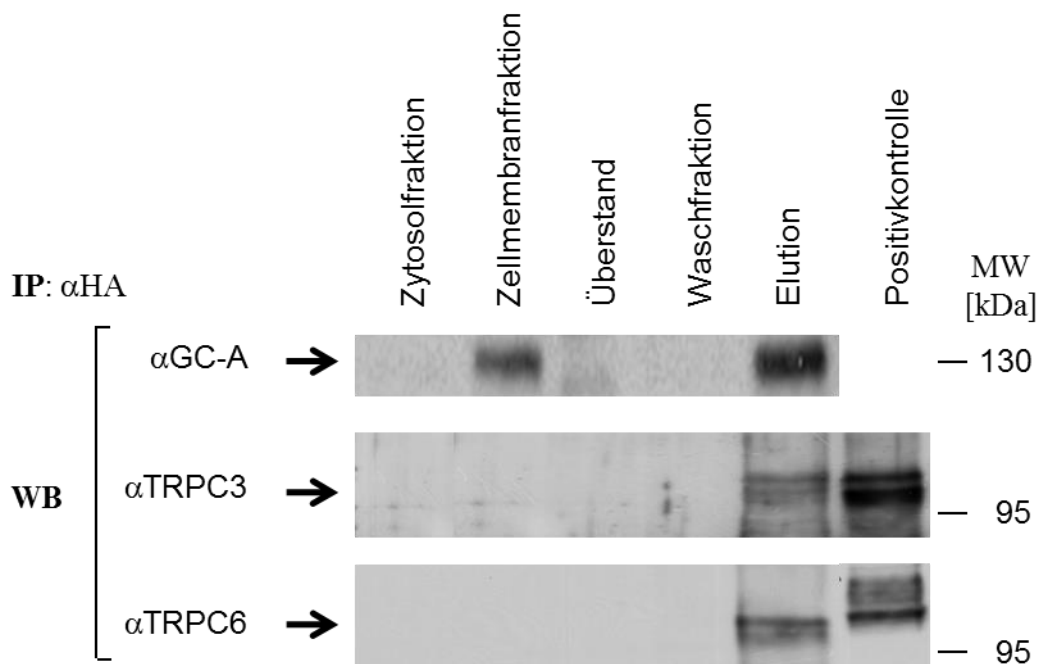


Abbildung 53: Koimmunpräzitationsversuche an Herzlysate von transgenen Tieren der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie zum Nachweis der Interaktion von TRPC3 und TRPC6 mit GC-A in vivo (Klaiber 2011).

Die FLAG-HA-getaggte GC-A wurde aus Herzlysate transgener Mäuse der FLAG-HA-TEV-GC-A-Kolonie mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop präzipitiert und im Western Blot mit Antikörpern gegen GC-A, TRPC3 und TRPC6 analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass die FLAG-HA-getaggte GC-A zusammen mit den beiden TRP-Kanälen präzipitiert werden kann. Diese Experimente wurden von Beatrice Dankworth (Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt.

Interessanterweise wurde durch Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen GC-A im Herzlysate transgener Tiere eine zweite, etwas kleinere Bande (~110 kDa) detektiert (vgl. Abbildung 25, Seite 100; Abbildung 27, Seite 102 und Abbildung 29, Seite 104). Die Intensität dieser Bande korrelierte in den verschiedenen untersuchten Gewebetypen von transgenen und wildtypischen Tieren mit dem Signal für GC-A in der erwarteten Höhe (~130 kDa). Auch in der Lunge von globalen GC-A KO Tieren wurde eine solche Bande mit dem Antikörper gegen GC-A bei etwa 110 kDa detektiert (vgl. Abbildung 29, Seite 104). Hierbei besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine truncierte Form des GC-A-Rezeptors handelt, die bei der Generierung der Knockoutlinie entstanden sein könnte. Anhand der Western Blot Analysen an Herzlysate von transgenen Tieren der

FLAG-HA-TEV-GC-A Kolonie mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop zeigte sich, dass diese zweite Bande ebenfalls mit dem Antikörper gegen das HA-Epitop detektiert wurde (vgl. Abbildung 33, Seite 109). Aufgrund der gezeigten hohen Spezifität des Antikörpers deutet dieses Experiment darauf hin, dass die zuvor bereits mit dem Antikörper gegen GC-A detektierte kleinere Bande tatsächlich GC-A ist. Die Zellfraktionierungsversuche an isolierten Kardiomyozyten unterstützen die Identifizierung der subzellulären Lokalisation dieses Proteins. Wie Abbildung 35 (vgl. Seite 113) zeigt, wurde die FLAG-HA-Epitop-getaggte GC-A (130 kDa) mit dem Antikörper gegen das HA-Epitop exklusiv in der Fraktion mit der Zellmembran nachgewiesen. Ein etwas kleineres Protein (~110 kDa) wurde in diesem Experiment nur im Zytosol detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es möglich, dass durch das Transgen ein Teil der Epitop-getaggen GC-A im Zytosol lokalisiert ist. Dies wäre in weiterführenden Versuchen zu verifizieren. Die Größenunterschiede lassen sich unter Umständen mit der Glykosilierung des GC-A-Rezeptors erklären (Miyagi 2000). Die Verifizierung dieser Hypothese könnte durch die Aufreinigung des Rezeptors über das HA-Epitop und nachfolgende Analyse mittels Massenspektrometrie erfolgen. Alternativ könnte ein Teil der präzipitierten GC-A auch mit Glukosidase behandelt werden. Sofern die Hypothese zutreffend ist, würde dies im SDS-Gel zu einer Verlagerung der größeren Bande nach unten („down-shift“) führen, da sich die Molekularmasse durch Abspaltung der Glykoside verringern würde. In der Folge wäre dann möglicherweise nur noch eine Bande erkennbar.

4.3.2 Auswirkung der Überexpression auf die Bildung von cGMP

Basierend auf den zuvor ermittelten Ergebnissen, die eine klare Überexpression und Lokalisation des modifizierten GC-A-Rezeptors in den Zellmembranen der Kardiomyozyten zeigten, wurde ermittelt, inwieweit diese Überexpression die intrazelluläre cGMP-Konzentration beeinflusst.

Hierzu wurden Kardiomyozyten von transgenen und wildtypischen Geschwistertieren frisch isoliert und der Gehalt an cGMP unter basalen Bedingungen, sowie nach Stimulation mit 10 nM bzw. 100 nM ANP quantifiziert. Die Ergebnisse (vgl. Abbildung 36, Seite 117) zeigten allerdings, dass, normiert auf die im Reaktionsansatz enthaltene Proteinmenge, keine signifikanten Unterschiede zwischen Proben wildtypischer und transgener Tiere ermittelt werden konnten. Weder die basale noch die durch Stimulation mit ANP gebildete Menge an cGMP unterschied sich zwischen wildtypischen und transgenen Tieren. Im Verhältnis zur Kontrolle bewirkte die Stimulation mit 10 nM ANP über 10 min weder bei wildtypischen noch bei transgenen Tieren einen signifikanten Anstieg des intrazellulär gebildeten cGMP. Durch Stimulation mit 100 nM ANP wurde in beiden Gruppen eine, im Vergleich zur Kontrolle, etwa 1,5-fach höhere Menge gebildeten cGMP hervorgerufen. Verglichen mit der Literatur (Kuhn 2004) wäre bereits bei wildtypischen Tieren durch Inkubation mit 10 nM ANP ein etwa 1,5-facher Anstieg erwartet worden. Durch die zuvor nachgewiesene Überexpression und membranständige Lokalisation des GC-A-Rezeptors in Kardiomyozyten transgener Tiere wäre zu erwarten gewesen, dass das Vorhandensein einer großen Anzahl an GC-A-Rezeptoren an der Zellmembran der Kardiomyozyten durch Stimulation mit ANP zu einem massiven Anstieg des detektierbaren cGMP führt. Die detektierte Menge hätte bei transgenen Tieren signifikant höher sein müssen als bei wildtypischen Geschwistertieren. Aufgrund der geringen Menge an vorhandenem Material war es nicht möglich zusätzlich noch einen Western Blot je Versuchstier anzusetzen und damit die Überexpression zu verifizieren. Es lagen lediglich die Ergebnisse der Genotypisierung vor. Daher kann letztendlich nicht mit absoluter Sicherheit festgehalten werden, dass tatsächlich Kardiomyozyten mit einer deutlichen Überexpression analysiert wurden. Da es jedoch bei keinem der insgesamt acht gemessenen Tiere eine cGMP-Antwort gab, die sich deutlich von den

anderen abhebt, kommen verschiedene Ursachen für das Ergebnis in Betracht. Möglicherweise war der Versuchsaufbau nicht optimal gewählt und die Zellen wurden durch einen der durchgeführten Schritte gestresst. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass ein Großteil nicht-funktionsfähiger, möglicherweise desensitisierten GC-A-Rezeptoren an der Zellmembran präsentiert wurde. Um das erhaltene Ergebnis zu validieren wäre es zielführend einen Zyklase Assay (Potter 1999 A, Schröter 2010) an Membranen zuvor isolierter Kardiomyozyten zu etablieren. Mit diesem Ansatz könnte, aufgrund der zuvor ermittelten Proteinmenge, die Genauigkeit der Ergebnisse verbessert werden. Sollte dieser Versuchsaufbau das Ergebnis bestätigen, könnte im nachfolgenden Schritt der Phosphorylierungszustand des Rezeptors nach Immunpräzipitation mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

Ein indirekter Hinweis für einen möglichen Einfluss der Überexpression und deren Auswirkung auf die intrazellulären cGMP-Spiegel lieferten die innerhalb der AG Kuhn generierten Ergebnisse, die im Herzen von transgenen Tieren eine signifikant geringere Expression von TRPC3 und TRPC6 nachgewiesen haben (Klaiber 2011). In der Literatur wurde beschrieben, dass erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentrationen nicht nur einen inhibierenden Einfluss auf TRPC6 haben, sondern auch deren Expression reduzieren (Koitabashi 2010). Unter der Annahme, dass die transgenen Tiere durch die Überexpression der GC-A unter basalen Bedingungen über höhere cGMP-Spiegel verfügen, wäre dies eine Erklärung für den beobachteten Effekt der geringeren Expression der Kationenkanäle. Basierend auf dieser Hypothese wäre die wahrscheinlichste Erklärung für das vorliegende Ergebnis, dass der Versuchsaufbau zur Ermittlung basal gebildeten cGMPs sowie Stimulation der GC-A an ganzen Zellen nicht optimal war.

4.3.3 Ergebnisse der Angiotensin II induzierten Herzhypertrophie

Es ist bekannt, dass Tiere mit einer globalen, systemischen Deletion des GC-A-Rezeptors (Lopez 1995) eine stabile arterielle Hypertonie mit nachfolgender Herzhypertrophie und interstitieller Fibrose (Holtwick 2002) entwickeln. Durch das in der AG Kuhn etablierte Mausmodell mit konditioneller kardiomyozytenspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors (Holtwick 2003) konnten die lokalen antihypertrophen Effekte des ANP/GC-A-Systems nachgewiesen werden. Die Tiere entwickeln, trotz einer leichten Hypotonie, eine spontane Herzhypertrophie. Die Induktion einer Herzhypertrophie durch transverse Aorten-Konstriktion (TAC) resultiert in diesen Tieren in einer signifikant höheren Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers, ohne dabei den Anteil interstitieller Fibrose zu erhöhen. Die Arbeiten von Kishimoto und Kollegen an Mäusen mit kardialer Überexpression der GC-A, unter Verwendung eines vergleichbaren Promoters, wie er auch in dieser Arbeit Anwendung fand, zeigen, dass die Überexpression der GC-A im Herzen zu einem signifikant geringeren Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht führt (Kishimoto 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Tiere wiesen diese Unterschiede allerdings nicht auf (vgl. Abbildung 39, Seite 122; Abbildung 40, Seite 123 und Abbildung 41, Seite 124). Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht war bei wildtypischen und transgenen Tieren unter basalen Bedingungen in etwa gleich. Auch das Verhältnis des Gewichtes von linkem Ventrikel zu Körpergewicht wies keine Unterschiede auf. Die Beobachtung von Kishimoto und Kollegen, dass der Kardiomyozytendurchmesser transgener Tiere mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression der GC-A signifikant geringer war (Kishimoto 2001), konnte bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht gemacht werden (vgl. Abbildung 42, Seite 126). Die Ergebnisse der Echokardiographie zeigten, dass zumindest basal die linksventrikulären systolischen und diastolischen Kammerdurchmesser signifikant geringer waren als die der

wildtypischen Geschwistertiere (vgl. Abbildung 46, Seite 130 und Abbildung 47, Seite 131). Anhand dieser Werte könnte möglicherweise auf kleinere Herzen geschlossen werden. Nach Behandlung mit Angiotensin II gab es allerdings keine signifikanten Unterschiede mehr für diese Parameter. Zwar wurde von Kishimoto und Kollegen ein anderer Mausstamm (C57BL/6) verwendet, in der Literatur konnte aber kein Hinweis darauf gefunden werden, dass der für diese Arbeit herangezogene Mausstamm (FVB/N) sich signifikant anders verhält. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede könnte die exprimierte Menge an GC-A sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Founder generiert, deren Nachkommen sich in der exprimierten Menge an GC-A im Herzen deutlich unterschieden. Möglich wäre, dass einer der beiden in der Gruppe um Kishimoto verwendeten Founder über eine deutlich höhere Menge an GC-A im Herzen verfügte als bei den hier generierten Tiere vorgefunden wurde. Da in der Arbeit von Kishimoto und Kollegen nur ein Northern Blot gezeigt wurde (Kishimoto 2001), kann daher kein Rückschluss auf die Proteinmenge und somit Vergleich zu den hier charakterisierten Tieren gezogen werden. Wie auch bei Kishimoto und Kollegen gibt es bei den hier charakterisierten Tieren basal keine Unterschiede zwischen systolischem Blutdruck von transgenen und wildtypischen Geschwistertieren (vgl. Abbildung 37, Seite 119).

Aufgrund der zahlreichen Beobachtungen in der Literatur, welche die Bedeutung des ANP/GC-A-Systems für das Herz zeigen (Pandey 2011), wurde für diese Arbeit postuliert, dass die Überexpression des GC-A-Rezeptors in den Membranen der Kardiomyozyten einen verstärkten, lokalen kardioprotektiven Effekt ausübt. Um diese These zu überprüfen wurden transgene und wildtypische Geschwistertiere über osmotische Minipumpen mit Angiotensin II über einen Zeitraum von 14 Tagen hinweg behandelt. Zahlreiche im Rahmen der vorliegenden Arbeit benannten Studien zeigten, dass die Gabe von Angiotensin II über osmotische

Minipumpen in den hier verwendeten Dosen von 300 ng/kg/min bzw. 1.000 ng/kg/min zu einer signifikanten Erhöhung des Blutdrucks und dadurch induzierte Herzhypertrophie, insbesondere des linken Ventrikels, führt (Kilić 2007). Insbesondere das ANP/GC-A-System spielt bei der Induktion der Herzhypertrophie mit Angiotensin II eine bedeutende, protektive Rolle (Klaiber 2010). Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen zeigen, dass sowohl wildtypische als auch transgene Tiere gleichermaßen mit einem signifikanten Anstieg des arteriellen systolischen (vgl. Abbildung 37, Seite 119) und diastolischen (vgl. Abbildung 38, Seite 120) Blutdrucks auf Behandlung mit Angiotensin II reagieren. Die Auswertung der Herzgewichte (vgl. Abbildung 39, Seite 122 und Abbildung 40, Seite 123) und Kardiomyozytendurchmesser (vgl. Abbildung 42, Seite 126) zeigten nach Abschluss der Versuchsreihen, dass beide Gruppen gleichermaßen eine linksventrikuläre Herzhypertrophie entwickelten. Signifikante Unterschiede gab es zwischen den beiden Gruppen allerdings nicht. Im rechten Ventrikel gab es keine Anpassungen (vgl. Abbildung 41, Seite 124). Auch die Auswertung der Echokardiographie (vgl. 3.4.1.5, Seite 127) zeigten keine schlüssigen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Zusammengefasst reagierten die transgenen Tiere auf die Behandlung mit Angiotensin II wie die wildtypischen Geschwister Tiere und zeigten in Bezug auf morphologische Anpassungen des Herzens, als Antwort auf die Druckbelastung, keine Vorteile durch die Überexpression von GC-A, obwohl dies zu erwarten gewesen wäre (Kishimoto 2001, Li 2002, Li 2009). Mögliche Gründe für die erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert. Die zugrundeliegende Hypothese setzt voraus, dass durch die Gabe von Angiotensin II und damit einhergehende Erhöhung des Blutdrucks die Sekretion von ANP und BNP aus den Atria und den Ventrikeln erhöht wird. In der Literatur finden sich entsprechende Bestätigungen, dass es unter Angiotensin II zu einer Hochregulierung des Gens für ANP im Herzen kommt (Wang 2005 B). Auch gibt es

entsprechende Arbeiten die zeigen, dass insbesondere Angiotensin II über den Angiotensin II Typ 2 Rezeptor die Sekretion von ANP stimuliert (Cha 2013, Gao 2013 B, Park 2013). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Tiere in den hier beschriebenen Versuchsreihen gleichermaßen über erhöhte Plasmakonzentrationen von ANP und auch BNP verfügten. Um dies zu verifizieren könnte der Gehalt an mRNA für ANP und BNP in den aservierten Proben der Ventrikel quantifiziert und die Plasmaspiegel für ANP und BNP im Blut der behandelten Tiere ermittelt werden. Unter der Annahme, dass die Tiere über eine erhöhte Menge an zirkulierendem ANP verfügen, wäre zu erwarten gewesen, dass die nachgewiesene, membranständige Überexpression von GC-A in den Kardiomyozyten einen protektiven Effekt hat. Dieser sollte zu signifikanten Unterschieden zwischen wildtypischen und transgenen Tieren bei Induktion einer Herzhypertrophie führen. Dies setzt allerdings voraus, dass der überexprimierte GC-A-Rezeptor funktionsfähig ist. Da transgene Tiere zumindest basal über eine reduzierte Expression von TRPC3 und TRPC6 verfügen (Klaiber 2011), könnte unter diesen Bedingungen vom Vorliegen einer erhöhten Anzahl (im Vergleich zum Wildtyp) funktionsfähiger Rezeptoren ausgegangen werden. Möglicherweise ist aber auch das Angiotensin II selbst der Grund dafür, warum in den durchgeführten Versuchsreihen kein protektiver Effekt durch die Überexpression festgestellt werden kann. Zahlreiche Studien zeigen zumindest in vitro, dass GC-A nicht nur homolog durch ANP, sondern auch heterolog beispielsweise durch Angiotensin II desensibilisiert werden kann (Potter 2006). Möglicherweise führte die chronische Behandlung der Tiere mit einer Dosis von 300 ng/kg/min bzw. 1.000 ng/kg/min Angiotensin II über einen Zeitraum von 14 Tagen zur Desensibilisierung eines Großteils der vorhandenen Rezeptoren. Dies würde eine Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse liefern. Dies könnte bedeuten, dass die Überexpression nicht vor Angiotensin II induzierter Hypertrophie schützt, da die erhöhten

Angiotensin II-Plasmaspiegel zu heterologer Desensibilisierung der GC-A führen. In diesem Fall wäre das Angiotensin II-Modell nicht das geeignetste für die Überprüfung der protektiven Effekte. Diese Vermutung steht allerdings im Widerspruch zu den bisherigen Studien beispielsweise an Tieren einer Mauslinie mit kardiomyozytenspezifischer Deletion (CM GC-A KO) des GC-A-Rezeptors (Klaiber 2010) die zeigen, dass Tiere ohne den GC-A-Rezeptor unter Angiotensin II mehr Hypertrophie entwickeln. Möglicherweise liegt aber auch ein Großteil der GC-A-Rezeptoren durch die Überexpression im inaktiven Zustand an der Zellmembran vor. Die Analyse des Phosphorylierungszustandes wäre ein möglicher weiterer Schritt, um die erhaltenen Ergebnisse besser interpretieren zu können.

Ein sicherer Nachweis zur Überprüfung, ob die überexprimierten Epitop-getaggten GC-A-Rezeptoren funktionsfähig sind, wäre die Durchführung von Zykase Assays an Membranen isolierter Kardiomyozyten von transgenen und wildtypischen Tieren. Würde sich hier zeigen, dass die Stimulation der isolierten Zellmembranen von transgenen Tieren mit ANP zu einer deutlich größeren Menge an cGMP führt, kann von einer Funktionsfähigkeit ausgegangen werden. Weiter besteht die Möglichkeit die transgenen Tiere in die GC-A KO Kolonie der AG Kuhn einzukreuzen und analog zur Arbeit von Kishimoto und Kollegen Blutdruck und Herzhypertrophie zu analysieren. Um mögliche Effekte der Anwendung von Angiotensin II auszuschließen, würde die Möglichkeit bestehen die Tiere einer, mittels transverse Aorten-Konstriktion (TAC) induzierten, Druckbelastung auszusetzen und die Ergebnisse der Entwicklung einer Herzhypertrophie mit denen der wildtypischen Tieren zu vergleichen.

4.4 Ausblick

Im Rahmen des ersten Teils der vorliegenden Arbeit wurde eine Isoform des GC-A-Rezeptors ($\text{GC-A}\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$) charakterisiert. Die *in vitro* Ergebnisse zeigten, dass diese Isoform aufgrund des Fehlens von 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne die Fähigkeit zur Bindung des Liganden ANP und somit der ANP-vermittelten Bildung von intrazellulärem cGMP verloren hat. Allerdings konnte ebenso gezeigt werden, dass diese Isoform Heterodimere mit dem wildtypischen Rezeptor bilden und dabei als dominant negativer Regulator des ANP/GC-A-Systems fungieren kann. Die Ergebnisse der *in vivo* Studien mit Angiotensin II lassen den Schluss zu, dass das alternative Spleißen am Sensitivitätsverlust des GC-A-Rezeptors, möglicherweise über den Mechanismus der Bildung von Heterodimeren, beteiligt ist. Daher bieten die gewonnenen Erkenntnisse eine gute Möglichkeit, diese Mechanismen weiter zu untersuchen und die Bedeutung von alternativem Spleißen des GC-A-Rezeptors für die Entstehung von Bluthochdruck und Herzhypertrophie im Menschen weiter zu ergründen.

Im Rahmen des zweiten Teils der Arbeit wurde ein funktionsfähiger GC-A-Rezeptor mit einer Epitopregion generiert, durch die der Rezeptor angereichert und, insbesondere durch enzymatische Abspaltung mit TEV-Protease, aufgereinigt werden kann. Dies bietet die Möglichkeit Modifikationen und mögliche Interaktionspartner des Rezeptors beispielsweise durch die Anwendung von 2D-Gelelektrophorese sowie massenspektrometrischer Analysen, wie sie in der AG Kuhn etabliert wurden, zu identifizieren. Basierend auf dem generierten GC-A-Rezeptor mit FLAG-HA-TEV-Epitopregion, sowie des bereits in der AG Kuhn vorhandenen GC-A-Rezeptors mit einem FLAG-Epitop (Schröter 2010), wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Plasmide erzeugt, bei denen die beiden Epitop-getaggten GC-A-Rezeptoren unter der Kontrolle des αMHC -Promoters stehen. Mit Hilfe dieser Plasmide konnten und können

auch weiterhin transgene Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression der GC-A erzeugt werden. Obwohl die Studien mit Angiotensin II die protektiven Effekte der Überexpression von GC-A in diesem Tiermodell nicht zeigen konnten, ergeben sich durch diese Tierlinien vielfältige Möglichkeiten die Interaktion mit anderen Proteinen *in vivo* zu analysieren. So konnte mit diesem genetischen Mausmodell einmalig gezeigt werden, dass GC-A einen stabilen Proteinkomplex mit den Ionenkanälen TRPC3 und TRPC6 (englisch *transient receptor potential channels*) bildet und dass ANP die Aktivität dieser Kanäle moduliert. Wie die Ergebnisse der Western Blot Analysen (vgl. Abbildung 25, Seite 100 und Abbildung 28, Seite 103) gezeigt haben, schwanken die Expressionslevel der GC-A im Herzen der mittels Oozyteninjektion erzeugten transgenen Tiere (Founder). Die Überexpression sollte daher vor einer Zucht und in jedem Versuchstier auf Proteinebene analysiert werden. Es empfiehlt sich weitere Experimente an diesem Tiermodell durchzuführen, um ein besseres Verständnis über die posttranslationalen Modifikationen des GC-A-Rezeptors zu erhalten und mögliche weitere Interaktionspartner zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) wird infolge einer Zunahme des atrialen Drucks aus den Myozyten des Atriums sezerniert. Es spielt lokal eine bedeutende, protektive Rolle und wirkt der Entstehung von Herzhypertrophie und Fibrose entgegen. Darüber hinaus kommt ANP vor allem eine wichtige Rolle als endokrines Hormon zu, das den arteriellen Blutdruck und das Blutvolumen regelt. Diese physiologischen Effekte vermittelt das Herzhormon durch seinen Rezeptor, das Transmembranprotein Guanylatzyklase A (GC-A). Durch Bindung von ANP an die extrazelluläre Domäne der GC-A wird intrazellulär, durch die katalytische Domäne des Rezeptors, der sekundäre Botenstoff cGMP gebildet. Patienten mit einer, durch Bluthochdruck verursachten Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz weisen erhöhte ANP-Konzentrationen im Plasma auf. Die durch ANP vermittelten, protektiven Effekte sind allerdings vermindert. Zahlreiche Studien haben in vitro gezeigt, dass die chronische Inkubation der GC-A mit ihrem Liganden, sowie die Behandlung von GC-A exprimierenden Zellen mit Hormonen wie Angiotensin II, zur Desensibilisierung des Rezeptors führen. Der Verlust der Funktionsfähigkeit geht einher mit der Dephosphorylierung des Rezeptors an spezifischen, intrazellulär lokalisierten Aminosäuren. Durch die Erforschung dieses Mechanismus und Identifizierung möglicher Interaktionspartner in vivo könnte der Grundstein für neue oder verbesserte Therapieformen gelegt werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine kürzlich identifizierte Isoform des GC-A-Rezeptors identifiziert, die durch alternatives Spleißen des Exons 4 entsteht und in einer Vielzahl untersuchter Gewebe der Maus vorkommt. Die Deletion umfasst 51 Basenpaare und resultiert in einem um 17 Aminosäuren verkürzten GC-A-Rezeptor (GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$). Molekulare Modellierungen der extrazellulären Domänen des wildtypischen GC-A-

Rezeptors und der Isoform zeigten, dass sich die Deletion im membranahen Bereich der extrazellulären Domäne und damit deutlich entfernt von der ANP-Bindungsdomäne befindet. Oberflächenbiotinylierungs- und Zellfraktionierungsversuche zeigten, dass die Isoform des GC-A-Rezeptors an der Oberfläche von Zellmembranen transient transfizierter HEK 293-Zellen präsentiert wird. Jedoch zeigten die ANP-Stimulationsexperimente unter Anwendung von cGMP-Radioimmunassay (cGMP-RIA) und Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Messungen, dass die Isoform nicht zur ANP-vermittelten intrazellulären cGMP-Bildung stimuliert werden kann. Im Rahmen von ANP-Bindungsstudien mit ^{125}I -ANP wurde gezeigt, dass $\text{GC-A}\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ die Fähigkeit zur Bindung des Liganden ANP verloren hat. Jedoch zeigten die Koimmunpräzipitationsversuche, dass die Isoform des GC-A-Rezeptors Heterodimere mit dem wildtypischen GC-A-Rezeptor bilden und dadurch die ligandeninduzierte Bildung von cGMP reduzieren kann. In vivo konnte gezeigt werden, dass unter Angiotensin II-induzierter Hypertonie die mRNA-Expression für $\text{GC-A}\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ in der Lunge gesteigert, und gleichzeitig die ANP-vermittelte cGMP-Bildung deutlich reduziert ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das alternative Spleißen ein regulierender Mechanismus ist, der auf den ANP/GC-A-Signalweg Einfluss nimmt. Angiotensin II-induziertes alternatives Spleißen des GC-A-Gens kann daher einen neuen Mechanismus für die Verringerung der Sensitivität des GC-A-Rezeptors gegenüber ANP darstellen.

Zitat:

Hartmann M*, Skryabin BV*, Müller T, Gazinski A, Schröter J, Gassner B, Nikolaev VO, Bünemann M, Kuhn M. (2008) Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *The Journal of biological chemistry* 283(42):28313-28320.

* Die genannten Autoren haben zu der jeweiligen Arbeit gleichermaßen beigetragen

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden transgene Tiere mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression eines Epitop-getaggten GC-A-Rezeptors generiert. Durch dieses Modell sollte es ermöglicht werden, den Rezeptor aus murinem Gewebe anreichern und aufreinigen zu können um danach Analysen zu posttranslationalen Veränderungen und möglichen Interaktionspartnern durchzuführen. Zunächst wurde in eine FLAG-Epitop-getaggte GC-A zusätzlich ein HA-tag, sowie eine Erkennungssequenz für die Protease des *tobacco etch virus* (TEV) eingefügt. Die Expression und Funktionsfähigkeit des modifizierten Rezeptors wurde durch ANP-Stimulationsexperimente unter Anwendung von cGMP-RIA und FRET-Messungen verifiziert. Die Funktionsfähigkeit der TEV-Erkennungssequenz wurde durch die Elution mittels TEV-Protease nach Immunpräzipitation (IP) nachgewiesen. In vivo wurde an Mäusen die Expression und Lokalisation der GC-A auf Proteinebene, unter Anwendung von Zellfraktionierungsexperimenten und Immunpräzipitationen, überprüft. Die entstandenen transgenen Tiere zeigten eine deutliche, in den Zellmembranen von Kardiomyozyten lokalisierte, Überexpression des Rezeptors. Dieser konnte über das HA-tag angereichert und aufgereinigt werden. Um die Funktionsfähigkeit des modifizierten Rezeptors in vivo nachzuweisen, wurde in zwei Versuchsreihen kardiale Hypertrophie durch chronische Applikation von Angiotensin II induziert. Es wurde postuliert, dass die Überexpression funktionsfähiger GC-A im Herzen die Tiere vor Herzhypertrophie schützt. Die Ergebnisse der Studien zeigen allerdings, dass die generierten transgene Tiere trotz kardiomyozytenspezifischer Überexpression des Rezeptors nicht den erwarteten Schutz vor Herzhypertrophie aufwiesen, sondern ähnlich wie ihre wildtypischen Geschwistertiere reagieren. Jedoch gelang es mit Hilfe des Überexpressionsmodells zusammen mit anderen Mitarbeitern der AG Kuhn eine zuvor in vitro beschriebene Interaktion des GC-A-Rezeptors mit den Kationenkanälen TRPC3 und TRPC6 in vivo nachzuweisen. Somit besteht

die Möglichkeit die Epitope und das murine Überexpressionsmodell auch zukünftig zu nutzen, um Interaktionspartner der GC-A zu identifizieren.

Zitate:

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, **Hartmann M**, Nikolaev VO, Yang RB, Völker K, Gassner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. (2011) A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(45):18500-18505.

* Die genannten Autoren haben zu der jeweiligen Arbeit gleichermaßen beigetragen

Schröter J, Zahedi RP, **Hartmann M**, Gaßner B, Gazinski A, Waschke J, Sickmann A, Kuhn M. (2010) Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *The FEBS journal* 277(11):2440-2453.

6 Abstract

Atrial natriuretic peptide (ANP) is released from cardiac atrial and less ventricular myocytes in response to increased volume or pressure load. It has crucial local functions preventing pathological cardiac hypertrophy and fibrosis. Besides this ANP has a critical endocrine role in the maintenance of arterial blood pressure and blood volume. The physiological actions of this cardiac hormone are mediated through the transmembrane receptor guanylyl cyclase A (GC-A). Upon binding of ANP to the extracellular domain of the receptor the intracellular catalytic domain produces the second messenger cGMP. Patients with hypertensive cardiac hypertrophy and congestive heart failure show markedly increased levels of ANP but the protective, GC-A mediated effects are markedly blunted. Several in vitro studies have shown that chronic treatment of GC-A expressing cells with its ligand or growth hormones, i.e. Angiotensin II, lead to desensitization of the receptor by dephosphorylation of specific intracellular amino acids. Understanding the mechanisms of these posttranslational modifications and possible involved proteins in vivo may help to design new therapeutic approaches restoring GC-A activity in heart failure patients.

In the first part of this study a novel isoform of GC-A (GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$) was characterized. This isoform was found ubiquitously within the murine organism and is the result of differential splicing of exon 4. The resulting deletion of a 51-bp sequence is predicted to delete 17 amino acids in the membrane-distal part of the extracellular domain. Molecular modelling of the extracellular domain of GC-A wt and the isoform suggested that the deletion does not directly alter the ligand binding domain of the receptor. Cell biotinylation assays and cell fractionation of transiently transfected HEK 293 cells showed, that the isoform is predominantly expressed and localized within the membrane of these cells. However functional studies in transfected HEK 293 cells using FRET and cGMP-RIA to measure

intracellular cGMP formation demonstrated that ANP-induced cGMP formation was totally abolished for GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$. Binding studies with ^{125}I -ANP revealed that the isoform does not bind ANP. Co-immunoprecipitation experiments showed the ability of the isoform to form heterodimers with the wild type receptor, thereby inhibiting the ANP-induced intracellular cGMP formation. In vivo studies with Angiotensin II resulted in enhanced mRNA expression of GC-A $\Delta_{\text{Lys}^{314}\text{-Gln}^{330}}$ in the lungs of Angiotensin II treated mice. Notably the ANP-mediated formation of cGMP by isolated membranes of the lung was significantly reduced. Therefore it can be assumed that alternative splicing of GC-A might be a regulatory mechanism inhibiting the ANP/GC-A signaling pathway. Angiotensin II-induced alternative splicing of the GC-A gene may thus represent a novel mechanism for reducing the sensitivity of GC-A for its ligand.

Reference:

Hartmann M*, Skryabin BV*, Müller T, Gazinski A, Schröter J, Gassner B, Nikolaev VO, Bünemann M, Kuhn M. (2008) Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *The Journal of biological chemistry* 283(42):28313-28320. (*Equally contributed)

In the second part of this study transgenic mice with a cardiomyocyte specific overexpression of an epitope tagged GC-A were generated to enable enrichment and purification of the receptor from the heart for biochemical analyses. First a FLAG-tagged GC-A receptor was modified by inserting an additional HA-tag and a restriction site for the protease of *tobacco etch virus* (TEV). The expression and function of the modified receptor was verified using whole cell stimulation and FRET to determine cGMP formation and IP experiments to test the elution with the protease of TEV. The expression levels and localization of GC-A in cardiomyocytes were analyzed using cell fractionation and immunoprecipitation experiments

which showed a clear overexpression within the membranes of cardiomyocytes. It was possible to enrich and purify the GC-A from isolated cardiomyocytes using the HA-tag. Two cardiac hypertrophy studies using chronic administration of Angiotensin II were performed to verify the overexpression of a functional GC-A receptor. Based on the literature it was postulated that transgenic mice are potentially protected from hypertension induced cardiac hypertrophy. Despite verified overexpression of GC-A within the cardiomyocytes of transgenic animals no differences, compared to their littermates, could be found for the relevant hypertrophy parameters. However by using the mice with overexpression of the HA-tagged GC-A we could verify an interaction of GC-A with the cation channels TRPC3 and TRPC6 in vivo. Therefore this model might be a useful tool to identify more interaction partners and posttranslational modifications of the GC-A receptor.

References:

Klaiber M*, Dankworth B*, Kruse M*, **Hartmann M**, Nikolaev VO, Yang RB, Völker K, Gassner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M. (2011) A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(45):18500-18505. (*Equally contributed)

Schröter J, Zahedi RP, **Hartmann M**, Gaßner B, Gazinski A, Waschke J, Sickmann A, Kuhn M. (2010) Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *The FEBS journal* 277(11):2440-2453.

7 Literaturverzeichnis

Abbey SE & Potter LR (2002) Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *The Journal of biological chemistry* 277(45):42423-42430.

Adachi M, Sekiya M, Isobe M, Kumura Y, Ogita Z, Hinoda Y, Imai K, & Yachi A (1992) Molecular cloning and chromosomal mapping of a human protein-tyrosine phosphatase LC-PTP. *Biochemical and biophysical research communications* 186(3):1607-1615.

Akker, van den F, Zhang X, Miyagi M, Huo X, Misono KS, Yee VC (2000) Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature* 406(6791):101-104.

Ambrosi P, Oddoze C, & Habib G (2002) Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 106(15):e70.

Angela A (2002) Gel loading dye, 6X, AfCS Solution Protocol PS00000077, Version: 01, Date: 03/19/02, http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PS00000077.pdf?pid=PS00000077, abgerufen am 22.01.2014

Angela A (2001) Tris-borate electrophoresis buffer, 10X, AfCS Solution Protocol PS00000079, Version: 01, Date: 12/06/01, http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PS00000079.pdf?pid=PS00000079, abgerufen am 22.01.2014

Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade HA, Mauad H, Ramalho MJ, Reis LC, Silva-Netto CR, Favaretto AL, Gutkowska J, & McCann SM (1992) Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(15):6828-6831.

Arise KK & Pandey KN (2006) Inhibition and down-regulation of gene transcription and guanylyl cyclase activity of NPRA by angiotensin II involving protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349(1):131-135.

Artega E (2002) SDS-PAGE running buffer, 10X, AfCS Solution Protocol PS00000054, Version: 01, Date: 01/16/02, http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PS00000054.pdf?pid=PS00000054, abgerufen am 22.01.2014

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, & Struhl K eds (2002) *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons Inc).

Ballermann BJ, Bloch KD, Seidman JG, & Brenner BM (1986) Atrial natriuretic peptide transcription, secretion, and glomerular receptor activity during mineralocorticoid escape in the rat. *The Journal of clinical investigation* 78(3):840-843.

Behrends S, Harteneck C, Schultz G & Koesling D (1995) A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *The Journal of biological chemistry* 270(36):21109-21113.

Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B, & Pacher R (2002) B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* 105(20):2392-2397.

Bold AJ (1985) Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science (New York, N.Y.)* 230(4727):767-770.

Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, & Sonnenberg H (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life sciences* 28(1):89-94.

Bryan PM & Potter LR (2002) The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases. *The Journal of biological chemistry* 277(18):16041-16047.

Cao L & Gardner DG (1995) Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 25(2):227-234.

Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, & Colucci WS (1998) Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *The Journal of clinical investigation* 101(4):812-818.

Cappuccio FP, Markandu ND, Buckley MG, Sagnella GA, Shore AC, & MacGregor GA (1987) Changes in the plasma levels of atrial natriuretic peptides during mineralocorticoid escape in man. *Clinical science (London, England: 1979)* 72(5):531-539.

Cha SA, Park BM, Gao S, & Kim SH (2013) Stimulation of ANP by angiotensin-(1-9) via the angiotensin type 2 receptor. *Life sciences* 93(24):934-940.

Chan JCY, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, & Wu Q (2005) Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(3):785-790.

Chen AA, Wood MJ, Krauser DG, Baggish AL, Tung R, Anwaruddin S, Picard MH, & Januzzi JL (2006) NT-proBNP levels, echocardiographic findings, and outcomes in breathless patients: results from the ProBNP Investigation of Dyspnoea in the Emergency Department (PRIDE) echocardiographic substudy. *European heart journal* 27(7):839-845.

Chinkers M & Wilson EM (1992) Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *The Journal of biological chemistry* 267(26):18589-18597.

Chinkers M, Singh S, & Garbers DL (1991) Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *The Journal of biological chemistry* 266(7):4088-4093.

Chinkers M & Garbers DL (1989) The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science (New York, N.Y.)* 245(4924):1392-1394.

Cho A, Haruyama N & Kulkarni AB (2009) Generation of Transgenic Mice. *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 19: Unit 19.11.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, & Roccella EJ (2003 A) Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42(6):1206-1252.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, & Roccella EJ (2003 B) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 289(19):2560-2572.

Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, Shaknovich A, Pondolfino K, Clark M, & Camargo MJ (1986) Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *The Journal of clinical investigation* 78(5):1362-1374.

Dickey DM, Dries DL, Margulies KB, & Potter LR (2012) Guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B activities in ventricles and cardiomyocytes from failed and non-failed human hearts: GC-A is inactive in the failed cardiomyocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology* 52(3):727-732.

Dietz JR (2005) Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovascular Research* 68(1):8-17.

Dougherty WG, Cary SM, & Parks TD (1989) Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology* 171(2):356-364.

Duda T, Yadav P, & Sharma RK (2011) Allosteric modification, the primary ATP activation mechanism of atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Biochemistry* 50(7):1213-1225.

Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, & Burnett JC (1988) Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circulation research* 62(2):191-195.

Egan BM, Zhao Y, & Axon RN (2010) US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 303(20):2043-2050.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, & Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12):7059-7064.

Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, & Nicholls MG (1995) Natriuretic hormones. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 24(3):481-509.

Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ, & Potter LR (2005) Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Molecular pharmacology* 67(1):174-183.

Focaccio A, Volpe M, Ambrosio G, Lembo G, Pannain S, Rubattu S, Enea I, Pignatola S & Chiariello M. (1993) Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts. *Circulation* 87(1):192-198.

Frantz S, Klaiber M, Baba HA, Oberwinkler H, Völker K, Gaßner B, Bayer B, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, & Kuhn M (2013) Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *European heart journal* 34(16):1233-1244.

Frantz S, Hu K, Widder J, Bayer B, Witzel CC, Schmidt I, Galuppo P, Strotmann J, Ertl G, & Bauersachs J (2004) Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction. *British journal of pharmacology* 141(1):9-14.

Gao G & Dudley SC Jr. (2013 A) RBM25/LUC7L3 function in cardiac sodium channel splicing regulation of human heart failure. *Trends in Cardiovascular Medicine* 23(1):5-8.

Gao S, Park BM, Cha SA, Park WH, Park BH, & Kim SH (2013 B) Angiotensin AT(2) receptor agonist stimulates high stretch induced- ANP secretion via PI3K/NO/sGC/PKG/pathway. *Peptides* 47:36-44.

Garcia R, Cantin M, & Thibault G (1987) Role of right and left atria in natriuresis and atrial natriuretic factor release during blood volume changes in the conscious rat. *Circulation research* 61(1):99-106.

Gerzanich V, Ivanov A, Ivanova S, Yang JB, Zhou H, Dong Y & Simard JM (2003) Alternative splicing of cGMP-dependent protein kinase I in angiotensin-hypertension: novel mechanism for nitrate tolerance in vascular smooth muscle. *Circulation research* 93(9):805-812.

Globits S, Frank H, Pacher B, Huelsmann M, Ogris E, & Pacher R (1998) Atrial natriuretic peptide release is more dependent on atrial filling volume than on filling pressure in chronic congestive heart failure. *American heart journal* 135(4):592-597.

Grau ed (2009) *Ultraschall in der Anästhesie und Intensivmedizin: Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik* (Deutscher Ärzte-Verlag).

Grossoehme J (2001) Phosphate buffered saline, pH 7.4, 10X, AfCS Solution Protocol PS00000041, Version: 01, Date: 12/06/01, http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PS00000041.pdf?pid=PS00000041, abgerufen am 22.01.2014

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, & Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *The Journal of biological chemistry* 266(14):9180-9185.

Gupta G, Azam M, Yang L, Danziger RS (1997) The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. *The Journal of clinical investigation* 100(6):1488-1492.

Gutkowska J, Nemer M, Sole MJ, Drouin J, & Sirois P (1989) Lung is an important source of atrial natriuretic factor in experimental cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* 83(5):1500-1504.

Haneda M, Kikkawa R, Maeda S, Togawa M, Koya D, Horide N, Kajiwara N, & Shigeta Y (1991) Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney international* 40(2):188-194.

Hartmann M, Skryabin BV, Müller T, Gazinski A, Schröter J, Gassner B, Nikolaev VO, Bünemann M, & Kuhn M (2008) Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *The Journal of biological chemistry* 283(42):28313-28320.

Henry JP, Gauer OH, & Reeves JL (1956) Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circulation research* 4(1):85-90.

Herzig S & Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiological reviews* 80(1):173-210.

Hogan B, Costantini F, & Lacy E (1986) *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) p 332 p.

Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, & Kuhn M (2003) Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *The Journal of clinical investigation* 111(9):1399-1407.

Holtwick R, Baba HA, Ehler E, Risse D, Vobeta M, Gehrman J, Pierkes M, & Kuhn M (2002) Left but not right cardiac hypertrophy in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice is prevented by angiotensin type 1 receptor antagonist losartan. *Journal of cardiovascular pharmacology* 40(5):725-734.

Homcy C, Gaivin R, Zisfein J, & Graham RM (1985) Snack-induced release of atrial natriuretic factor. *The New England journal of medicine* 313(23):1484.

Huo X, Abe T, & Misono KS (1999) Ligand binding-dependent limited proteolysis of the atrial natriuretic peptide receptor: juxtamembrane hinge structure essential for transmembrane signal transduction. *Biochemistry* 38(51):16941-16951.

Jackson R, Lawes CMM, Bennett DA, Milne RJ, & Rodgers A (2005) Treatment with drugs to lower blood pressure and blood cholesterol based on an individual's absolute cardiovascular risk. *Lancet* 365(9457):434-441.

Jaiswal RK (1992) Endothelin inhibits the atrial natriuretic factor stimulated cGMP production by activating the protein kinase C in rat aortic smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 182(1):395-402.

Jalink K & Moolenaar WH (2010) G protein-coupled receptors: the inside story. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 32(1):13-16.

Jewett JR, Koller KJ, Goeddel DV, & Lowe DG (1993) Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *The EMBO journal* 12(2):769-777.

John SW, Krege JH, Oliver PM, Hagan JR, Hodgins JB, Pang SC, Flynn TG, & Smithies O (1995) Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science (New York, N.Y.)* 267(5198):679-681.

Joubert S, Labrecque J, & Lévesque A (2001) Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry* 40(37):11096-11105.

Kachura M (2002) Myocyte stopping buffer 2 (MC stop 2), AfCS Solution Protocol PS00000450, Version: 01, Date: 10/30/02, http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PS00000450.pdf?pid=PS00000450, abgerufen am 22.01.2014

Katoh Y, Kurosawa T, Takeda S, Kurokawa S, Sakamoto H, Marumo F, Kikawada R, Singer DJ, Shore A, Markandu N, Buckley M, & Macgregor G (1986) Atrial natriuretic peptide levels in treated congestive heart failure. *Lancet* 327(8485):851.

Khanam T, Rozhdestvensky TS, Bundman M, Galiveti CR, Handel S, Sukonina V, Jordan U, Brosius J, & Skryabin BV (2007) Two primate-specific small non-protein-coding RNAs in transgenic mice: neuronal expression, subcellular localization and binding partners. *Nucleic acids research* 35(2):529-539.

Kilić A, Bubikat A, Gassner B, Baba HA, & Kuhn M (2007) Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling. *Endocrinology* 148(9):4162-4169.

Kirchhefer U, Baba HA, Bokník P, Breeden KM, Mavila N, Brüchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, Depaoli-Roach AA & Neumann J (2005) Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Research* 68(1):98-108.

Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K, & Kangawa K (2009) Natriuretic Peptide Signaling via Guanylyl Cyclase (GC)-A: An Endogenous Protective Mechanism of the Heart. *Current cardiology reviews* 5(1):45-51.

Kishimoto I, Rossi K, & Garbers DL (2001) A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(5):2703-2706.

Klaiber M, Dankworth B, Kruse M, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang R-B, Völker K, Gassner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, & Kuhn M (2011) A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(45):18500-18505.

Klaiber M, Kruse M, Völker K, Schröter J, Feil R, Freichel M, Gerling A, Feil S, Dietrich A, Londoño JE, Baba HA, Abramowitz J, Birnbaumer L, Penninger JM, Pongs O & Kuhn M. (2010) Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Research in Cardiology* 105(5):583-95.

Klinke, Silbernagl, & Pape eds (2005) *Physiologie: Ideal für die neue AO* (Thieme).

Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagan JR, Fox JE, Smithies O, Rockman HA, & Maeda N (2001) Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 107(8):975-984.

Koh GY, Nussenzweig DR, Okolicany J, Price DA, & Maack T (1992) Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *The Journal of biological chemistry* 267(17):11987-11994.

Koitabashi N, Aiba T, Hesketh GG, Rowell J, Zhang M, Takimoto E, Tomaselli GF, & Kass DA (2010) Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48(4):713-724.

Koller KJ, Lipari MT, & Goeddel DV (1993) Proper glycosylation and phosphorylation of the type A natriuretic peptide receptor are required for hormone-stimulated guanylyl cyclase activity. *The Journal of biological chemistry* 268(8):5997-6003.

Koller KJ, Sauvage FJ, Lowe DG, & Goeddel DV (1992) Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Molecular and cellular biology* 12(6):2581-2590.

Kuhn M (2012) Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides. *British journal of pharmacology* 166(2):522-531.

Kuhn M, Voss M, Mitko D, Stypmann J, Schmid C, Kawaguchi N, Grabellus F, & Baba HA (2004) Left ventricular assist device support reverses altered cardiac expression and function of natriuretic peptides and receptors in end-stage heart failure. *Cardiovascular research* 64(2):308-314.

Kuhn M (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research* 93(8):700-709.

Kurose H, Inagami T, & Ui M (1987) Participation of adenosine 5'-triphosphate in the activation of membrane-bound guanylate cyclase by the atrial natriuretic factor. *FEBS letters* 219(2):375-379.

Levy-Nissenbaum O, Sagi-Assif O, Kapon D, Hantisteanu S, Burg T, Raanani P, Avigdor A, Ben-Bassat I, & Witz IP (2003) Dual-specificity phosphatase Pyst2-L is constitutively highly expressed in myeloid leukemia and other malignant cells. *Oncogene* 22(48):7649-7660.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, & Collins R (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360(9349):1903-1913.

Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada M, Adachi Y, Nakanishi M, Kinoshita H, Horiuchi M, Murray M, & Nakao K (2009) Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 2 receptor-mediated pro-hypertrophic signaling in the heart. *Endocrinology* 150(8):3759-3765.

Li Y, Kishimoto I, Saito Y, Harada M, Kuwahara K, Izumi T, Takahashi N, Kawakami R, Tanimoto K, Nakagawa Y, Nakanishi M, Adachi Y, Garbers DL, Fukamizu A, & Nakao K (2002) Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A receptor-mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart. *Circulation* 106(13):1722-1728.

Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, & Beuve A (1995) Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378(6552):65-68.

Lorell BH & Carabello BA (2000) Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102(4):470-479.

Lowe DG (1992) Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry* 31(43):10421-10425.

Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, & Goeddel DV (1989) Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *The EMBO journal* 8(5):1377-1384.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, & Waldman SA (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews* 52(3):375-414.

Maisel A (2002) B-type natriuretic peptide levels: diagnostic and prognostic in congestive heart failure: what's next? *Circulation* 105(20):2328-2331.

Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, & Lefkowitz RJ (1994) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science (New York, N.Y.)* 264(5158):582-586.

Miller WL, Phelps MA, Wood CM, Schellenberger U, Van Le A, Perichon R & Jaffe AS (2011) Comparison of mass spectrometry and clinical assay measurements of circulating fragments of B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *Circulation: Heart Failure* 4(3):355-360.

Misono KS, Grammer RT, Fukumi H, & Inagami T (1984) Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 123(2):444-451.

Miyagi M, Zhang X & Misono KS (2000) Glycosylation sites in the atrial natriuretic peptide receptor: oligosaccharide structures are not required for hormone binding. *European Journal of Biochemistry* 267(18):5758-5768.

Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, & Fujita T (1997) Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 15(11):1235-1243.

Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A, & Robbins J (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circulation research* 68(6):1742-1750.

Nikolaev VO, Gambaryan S, & Lohse MJ (2006) Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nature methods* 3(1):23-25.

Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A & Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *The Journal of biological chemistry*; 279(36):37215-37218

O'Connell T & Ni Y (2002) Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from 1 Heart, AfCS Procedure Protocol PP00000125, Version 1, 11/05/02, http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PP00000125.pdf?pid=PP00000125, abgerufen am 22.01.2014

Ogawa H, Qiu Y, Huang L, Tam-Chang SW, Young HS & Misono KS (2009) Structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain in the unbound and hormone-bound states by single-particle electron microscopy. *FEBS Journal*; 276(5):1347-1355

Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM & Misono KS (2004) Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*; 279(27):28625-28631

Oikawa S, Imai M, Ueno A, Tanaka S, Noguchi T, Nakazato H, Kangawa K, Fukuda A, & Matsuo H (1984) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature* 309(5970):724-726.

Palermo J, Gulick J, Colbert M, Fewell J, & Robbins J (1996) Transgenic remodeling of the contractile apparatus in the mammalian heart. *Circulation research* 78(3):504-509.

Pandey KN (2011) Guanylyl cyclase / atrial natriuretic peptide receptor-A: role in the pathophysiology of cardiovascular regulation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 89(8):557-573.

Pandey KN, Kumar R, Li M, & Nguyen H (2000) Functional domains and expression of truncated atrial natriuretic peptide receptor-A: the carboxyl-terminal regions direct the receptor internalization and sequestration in COS-7 cells. *Molecular pharmacology* 57(2):259-267.

Pandey KN (1993) Stoichiometric analysis of internalization, recycling, and redistribution of photoaffinity-labeled guanylate cyclase/atrial natriuretic factor receptors in cultured murine Leydig tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 268(6):4382-4390.

Pandey KN (1992) Kinetic analysis of internalization, recycling and redistribution of atrial natriuretic factor-receptor complex in cultured vascular smooth-muscle cells. Ligand-dependent receptor down-regulation. *The Biochemical journal* 288 (Pt 1):55-61.

Pandey KN, Inagami T, & Misono KS (1986) Atrial natriuretic factor receptor on cultured Leydig tumor cells: ligand binding and photoaffinity labeling. *Biochemistry* 25(26):8467-8472.

Park BM, Oh Y-B, Gao S, Cha SA, Kang KP, & Kim SH (2013) Angiotensin III stimulates high stretch-induced ANP secretion via angiotensin type 2 receptor. *Peptides* 42:131-137.

Parks TD, Leuther KK, Howard ED, Johnston SA, & Dougherty WG (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Analytical biochemistry* 216(2):413-417.

Potthast R, Ehler E, Scheving LA, Sindic A, Schlatter E & Kuhn M (2001) High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology* 142(7), 3087–3097.

Potter LR, Abbey-Hosch S, & Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine reviews* 27(1):47-72.

Potter LR & Hunter T (2001) Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *The Journal of biological chemistry* 276(9):6057-6060.

Potter LR & Hunter T (2000) Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *The Journal of biological chemistry* 275(40):31099-31106.

Potter LR & Hunter T (1999 A) A constitutively "phosphorylated" guanylyl cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization. *Molecular biology of the cell* 10(6):1811-1820.

Potter LR & Hunter T (1999 B) Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B. *Methods* 19(4):506-520.

Potter LR & Hunter T (1998) Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Molecular and cellular biology* 18(4):2164-2172.

Potter LR & Garbers DL (1994) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 269(20):14636-14642.

Potter LR & Garbers DL (1992) Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *The Journal of biological chemistry* 267(21):14531-14534.

Raine AE, Erne P, Bürgisser E, Müller FB, Bolli P, Burkart F, & Bühler FR (1986) Atrial natriuretic peptide and atrial pressure in patients with congestive heart failure. *The New England journal of medicine* 315(9):533-537.

Rathinavelu A & Isom GE (1991) Differential internalization and processing of atrial-natriuretic-factor B and C receptor in PC12 cells. *The Biochemical journal* 276 (Pt 2):493-497.

Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, Macmahon S, Ikram H, Sharpe N, Espiner EA, Frampton C, & Yandle TG (1999) Neurohumoral prediction of benefit from carvedilol in ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *Circulation* 99(6):786-792.

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, & Séraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17(10):1030-1032.

Robbins J (2000) Remodeling the cardiac sarcomere using transgenesis. *Annual review of physiology* 62:261-287.

Robinson JW & Potter LR (2012) Guanylyl cyclases A and B are asymmetric dimers that are allosterically activated by ATP binding to the catalytic domain. *Science signaling* 5(240):ra65.

Ruggiero A, Chen SN, Lombardi R, Rodriguez G, & Marian AJ (2013) Pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy caused by myozenin 2 mutations is independent of calcineurin activity. *Cardiovascular research* 97(1):44-54.

Sabrane K, Kruse MN, Fabritz L, Zetsche B, Mitko D, Skryabin BV, Zwiener M, Baba HA, Yanagisawa M, & Kuhn M (2005) Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation* 115(6):1666-1674.

Sabrane K, Gambaryan S, Brandes RP, Holtwick R, Voss M, Kuhn M. (2003) Increased sensitivity to endothelial nitric oxide (NO) contributes to arterial normotension in mice with vascular smooth muscle-selective deletion of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor. *The Journal of biological chemistry* 278(20):17963-17968.

Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, & Yamada T (1989) Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *The Journal of clinical investigation* 83(1):298-305.

Saxenhofer H, Gnädinger MP, Weidmann P, Shaw S, Schohn D, Hess C, Uehlinger DE, & Jahn H (1987) Plasma levels and dialysance of atrial natriuretic peptide in terminal renal failure. *Kidney international* 32(4):554-561.

Schmidt & Lang eds (2007) *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie* (Springer Berlin).

Smith JB & Lincoln TM (1987) Angiotensin decreases cyclic GMP accumulation produced by atrial natriuretic factor. *American Journal of Physiology* 253: C147-C150.

Schou M, Gustafsson F, Corell P, Kistorp CN, Kjaer A, & Hildebrandt PR (2007) The relationship between N-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk for hospitalization and mortality is curvilinear in patients with chronic heart failure. *American heart journal* 154(1):123-129.

Schröter J, Zahedi RP, Hartmann M, Gassner B, Gazinski A, Waschke J, Sickmann A, & Kuhn M (2010) Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *The FEBS journal* 277(11):2440-2453.

Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, & Garbers DL (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58(6):1155-1162.

Sharina IG, Jelen F, Bogatenkova EP, Thomas A, Martin E & Murad F (2008) Alpha1 soluble guanylyl cyclase (sGC) splice forms as potential regulators of human sGC activity. *The Journal of biological chemistry* 30;283(22):15104-15113.

Sheppeck JE, Gauss CM, & Chamberlin AR (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorganic & medicinal chemistry* 5(9):1739-1750.

Somanna NK, Pandey AC, Arise KK, Nguyen V, & Pandey KN (2013) Functional silencing of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A by microRNA interference: analysis of receptor endocytosis. *International journal of biochemistry and molecular biology* 4(1):41-53.

Soualmia H, Barthélemy C, Masson F, Maistre G, Eurin J & Carayon A. (1997) Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 29(5):605-611.

Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JJ, Sprang SR, Garbers DL, & Gilman AG (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *The Journal of biological chemistry* 273(26):16332-16338.

Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, & Hansen CT (1991) FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(6):2065-2069.

Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA & Garbers DL (2004) Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:17300–17305

Tamura N & Garbers DL (2003) Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* 278:48880–48889

Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, & Ross J (1996) Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation* 94(5):1109-1117.

Tsai EJ & Kass DA (2009) Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* 122(3):216-238.

Tucker CL, Hurley JH, Miller TR, & Hurley JB (1998) Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11):5993-5997.

Vakili BA, Okin PM, & Devereux RB (2001) Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *American heart journal* 141(3):334-341.

Vasan RS, Benjamin EJ, Larson MG, Leip EP, Wang TJ, Wilson PWF, & Levy D (2002) Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham heart study. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 288(10):1252-1259.

Vieira MA, Gao M, Nikonova LN, & Maack T (2001) Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase a receptors. *The Journal of biological chemistry* 276(39):36438-36445.

Wang TJ & Vasan RS (2005 A) Epidemiology of uncontrolled hypertension in the United States. *Circulation* 112(11):1651-1662.

Wang Y-X, da Cunha V, Martin-McNulty B, Vincelette J, Li W, Choy DF, Halks-Miller M, Mahmoudi M, Schroeder M, Johns A, Light DR, & Dole WP (2005 B) Inhibition of Rho-kinase by fasudil attenuated angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in apolipoprotein E deficient mice. *European journal of pharmacology* 512(2-3):215-222.

Wilson EM & Chinkers M. (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry*. 1995 Apr 11;34(14):4696-701.

Wong SK, Ma CP, Foster DC, Chen AY, & Garbers DL (1995) The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in the absence of other proteins. *The Journal of biological chemistry* 270(51):30818-30822.

Wright JD, Hughes JP, Ostchega Y, Yoon SS, & Nwankwo T (2011) Mean systolic and diastolic blood pressure in adults aged 18 and over in the United States, 2001-2008. *National health statistics reports* (35):1-22, 24.

Yan W, Wu F, Morser J, & Wu Q (2000) 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* 97(15):8525-8529.

Yang L, Katchman A, Samad T, Morrow JP, Weinberg RL, & Marx SO (2013) β -adrenergic regulation of the L-type Ca^{2+} channel does not require phosphorylation of $\alpha 1\text{C}$ Ser1700. *Circulation research* 113(7):871-880.

Yang L, Ukil L, Osmani A, Nahm F, Davies J, Souza CPC, Dou X, Perez-Balaguer A, & Osmani SA (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell* 3(5):1359-1362.

Yang RB & Garbers DL. (1997) Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. *The Journal of biological chemistry* 272(21):13738-13742.

Yasue H, Obata K, Okumura K, Kurose M, Ogawa H, Matsuyama K, Jougasaki M, Saito Y, Nakao K, & Imura H (1989) Increased secretion of atrial natriuretic polypeptide from the left ventricle in patients with dilated cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* 83(1):46-51.

Zanke B, Suzuki H, Kishihara K, Mizzen L, Minden M, Pawson A, & Mak TW (1992) Cloning and expression of an inducible lymphoid-specific, protein tyrosine phosphatase (HePTPase). *European journal of immunology* 22(1):235-239.

Zhang L, Hernan R, & Brizzard B (2001) Multiple tandem epitope tagging for enhanced detection of protein expressed in mammalian cells. *Molecular biotechnology* 19(3):313-321.

8 Danksagung

Mein besonderer und herzlichster Dank gilt Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn für die Möglichkeit die Dissertation am Physiologischen Institut I der Universität Würzburg anfertigen zu dürfen und die dabei erhaltene großzügige Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich die schnelle, unkomplizierte und unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung und Kommentierung der Arbeit. Mein herzlichster Dank an dieser Stelle an Sie, liebe Frau Kuhn!

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Tautz möchte ich mich ganz herzlich für die unkomplizierte Vertretung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bedanken.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der Physiologie für das inspirierende und gute Arbeitsklima danken. Mein ganz besonderer Dank gilt allen voran Birgit Gaßner, Katharina Völker und Alexandra Gazinski für ihre Unterstützung in der Zellkultur, bei der Arbeit im Tierstall, den cGMP-RIAs, Blutdruckmessungen, Präparation von Kardiomyozyten, Tier-OPs, Organentnahmen, Morphometrie, eine helfende Hand, ein offenes Ohr, gute Ratschläge und das immer alles da war wenn man arbeiten wollte. Nicht minder danke ich Dr. Juliane Börner, Dr. Michael Klaiber und Dr. Beatrice Dankworth für die stetige Hilfe und Diskussion zur Optimierung von Versuchen und Unterstützung wenn mal schnell Hilfe gebraucht wurde.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Boris Skryabin (Institut für Experimentelle Pathologie, Universität Münster) für die Durchführung der Oozyteninjektion, die anregenden Diskussionen und die äußerst angenehme Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Isoform der GC-A.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Dr. Viacheslav Nikolaev (Abteilung für Kardiologie und Pneumologie, Universität Göttingen) für die Unterstützung bei den FRET-Experimenten und für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Frau Barbara Bayer (AG Prof. Dr. S. Frantz, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universität Würzburg) danke ich ganz herzlich für die großartige Unterstützung bei der Anfertigung der Herzechos.

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

Prof. Dr. Kai Schuh danke ich für die inspirierenden Diskussionen und Ratschläge zur Planung und Durchführung von Klonierungsstrategien.

Weiterhin danke ich allen bisher nicht genannten Kollegen der Arbeitsgruppen Kuhn und Schuh für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Der größte Dank gebührt meiner Frau Giana für ihre Geduld während der Laborarbeit, dass Du nachsichtig warst, wenn es mal wieder spät und das Essen kalt wurde oder eine halbe Nacht und ein Wochenende im Labor verbracht wurde. Weil Du mich immer unterstützt und an mich geglaubt hast. Mich wieder aufgebaut hast, wenn es galt ein schiefgelaufenes Experiment zu verkräften und mir jeden Freiraum gegeben hast damit ich diese Dissertation anfertigen und abschließen konnte. Dafür und sicherlich noch aus eintausend weiteren Gründen widme ich Dir diese Arbeit!

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung inaktivierender posttranslationaler Modifikationen des GC-A-Rezeptors für das atriale natriuretische Peptid (ANP)“

eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Zudem versichere ich an Eides statt, dass die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt wurde und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet wurde, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertation sucht.

Ich erkläre, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass die Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Ferner erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich nicht bereits früher akademische Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Heidelberg, April 2014

Michael Hartmann