

**Die kardiale Bedeutung des Hormons C-Typ natriuretisches Peptid
(CNP) und dessen Guanylylcyclase B (GC-B) Rezeptor**



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

vorgelegt von

Konstanze Michel
geboren in Oelsnitz

Würzburg, 2019

Eingereicht am: 30.09.2019

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Prof. Dr. Michaela Kuhn

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums: 05.02.2020

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, die immer für mich da ist und vor allem meinem liebsten Tobi.

Eidesstattliche Erklärung:

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

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Die Rolle des kardialen Hormons C-Type natriuretisches Peptid (CNP) und dessen Guanylylcyclase B (GC-B) Rezeptor“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt habe.

Ich versichere auch an Eides statt, dass die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt wurde und insbesondere keine Person oder Organisation eingeschaltet wurde, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

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

Zudem erkläre ich ehrenwörtlich, dass diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde und dass ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht hatte.

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

Lohr am Main, 23.09.2019



Konstanze Michel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	- 1 -
1.1	Einblick in das kardiovaskuläre System	- 1 -
1.2	Mechanismus der Kontraktion von Herzmuskelzellen.....	- 3 -
1.3	Elektromechanische Kopplung	- 4 -
1.4	Kontraktionszyklus des Herzens	- 5 -
1.5	Regulation und Entwicklung der kardialen Hypertrophie	- 6 -
1.6	Bedeutung und Funktion der Natriuretischen Peptide	- 8 -
1.6.1	Physiologische Bedeutung des ANP/GC-A-Signalwegs.....	- 9 -
1.6.2	Entdeckung und Bildung des C-Typ natriuretischen Peptid (CNP).....	- 10 -
1.6.3	Struktur und Aktivierung des GC-B Rezeptors	- 11 -
1.6.4	Physiologische Bedeutung des CNP/GC-B-Systems.....	- 12 -
1.6.4.1	Bedeutung des CNP/GC-B-Systems für das Knochenwachstum	- 13 -
1.6.4.2	Die Rolle des CNP/GC-B Systems im Herzen	- 14 -
1.6.4.3	Bedeutung des CNP/GC-B Signalwegs für das Gefäßsystem.....	- 16 -
1.7	Zielsetzungen der Arbeit	- 18 -
2	Material und Methoden	- 20 -
2.1	Messungen des arteriellen Blutdrucks (tail cuff)	- 20 -
2.2	Euthanasie und Organentnahme (Nekropsie).....	- 20 -
2.3	Histologische und morphometrische Untersuchungen an Herzschnitten	- 21 -
2.4	Western Blot Analysen	- 22 -
2.4.1	Proteinextraktionen aus linksventrikulärem Gewebe und isolierten Kardiomyozyten	- 22 -
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	- 23 -
2.4.3	SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese.....	- 23 -
2.4.4	Zielproteine und verwendete Antikörper	- 25 -
2.5	Quantitative RT-PCR Analysen	- 26 -
2.5.1	Extraktion und Bestimmung der Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen	- 26 -
2.5.2	Reverse-Transkription	- 26 -

2.5.3	Untersuchung der kardialen Expression verschiedener Zielgene mittels qRT-PCR.....	- 27 -
2.6	Experimentelles Modell der hypertensiven Herzerkrankung	- 31 -
2.6.1	Modell der transversalen Aortenkonstriktion an der Maus.....	- 31 -
2.6.2	Implantation osmotischer Minipumpen	- 31 -
2.6.3	Durchführung der transversen Aortenkonstriktion (TAC).....	- 32 -
2.7	Etablierung und Haltung eines neuen genetischen Mausmodells mit Kardiomyozyten- spezifischer Deletion des GC-B-Rezeptors (CM GC-B KO)	- 33 -
2.7.1	Generierung des CM GC-B KO Mausmodells	- 33 -
2.7.2	Genotypisierung des CM GC-B KO Mausmodells.....	- 33 -
2.7.3	Versuchstierhaltung	- 35 -
2.8	Isolierung und Kultivierung von murinen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten	- 36 -
2.8.1	Isolierung von murinen Kardiomyozyten mittels Langendorff-Perfusion.....	- 36 -
2.8.2	Kultivierung von murinen kardialen Fibroblasten	- 38 -
2.9	Versuche zu den Effekten von CNP auf den intrazellulären cGMP-Gehalt von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten.....	- 38 -
2.9.1	Inkubation der kultivierten Kardiomyozyten für Untersuchungen des CNP/cGMP-Signalwegs	- 38 -
2.9.2	Inkubation der kultivierten kardialen Fibroblasten für Untersuchungen des CNP/cGMP- Signalwegs	- 39 -
2.9.3	Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung des intrazellulären cGMP-Gehalts...	- 39 -
2.10	Versuche zu den Effekten von CNP auf die Phosphorylierung von Phospholamban und Titin in kultivierten murinen Kardiomyozyten	- 40 -
2.11	Datenanalyse und Statistik.....	- 41 -
3	Ergebnisse.....	- 43 -
3.1	Effekte von synthetischem CNP bei experimentell induzierter hypertensiver Herzinsuffizienz.	- 43 -
3.1.1	Effekte von CNP auf den systemischen arteriellen Blutdruck	- 43 -
3.1.2	Effekte von CNP auf die durch TAC-induzierte Erhöhung der Nachlast des linken Ventrikels...	- 44 -

3.1.3	Effekte von CNP auf die hypertensive Herzhypertrophie.....	- 44 -
3.1.4	Effekte von CNP auf die linksventrikuläre interstitielle Fibrose nach TAC.....	- 46 -
3.1.5	Effekte von CNP auf die linksventrikuläre Pumpfunktion	- 48 -
3.1.6	Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von Phospholamban und Titin im linken Ventrikel	- 50 -
3.2	Generierung und Validierung eines neuen genetischen Mausmodells mit Kardiomyozyten-spezifischer Deletion des GC-B Rezeptors (CM GC-B KO)	- 52 -
3.2.1	Generierung der CM GC-B KO Mäuse	- 52 -
3.2.2	Effekte von CNP auf den intrazellulären cGMP-Gehalt von kultivierten Kardiomyozyten und Fibroblasten.....	- 53 -
3.2.3	Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von Phospholamban und Titin in kultivierten Kardiomyozyten	- 54 -
3.2.4	Basaler Phänotyp der CM GC-B KO Mäuse	- 56 -
3.2.4.1	Untersuchungen an weiblichen Mäusen.....	- 56 -
3.2.4.2	Untersuchungen in männlichen Mäusen	- 61 -
3.2.4.3	Genotyp-abhängiger Effekt auf die linksventrikuläre Herzfunktion im Alter.....	- 64 -
3.3	Morphologische und funktionelle kardiale Veränderungen in den CM GC-B KO Mäusen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC)	- 65 -
3.3.1	Erhöhung der Nachlast nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC	- 65 -
3.3.2	Makroskopische Herzhypertrophie nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC.....	- 66 -
3.3.3	Linksventrikuläre interstitielle Fibrose nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC.....	- 70 -
3.3.4	Linksventrikuläre Pumpfunktion nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC	- 72 -
3.3.5	Linksventrikuläre Phosphorylierung von Phospholamban und Titin nach 3-tägiger TAC ..	- 75 -
3.3.6	mRNA Expression von inflammatorischen Proteinen im linken Ventrikel nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC	- 76 -
3.3.7	Linksventrikuläre Expression der NADPH Oxidase 4 (NOX4).....	- 77 -
3.3.8	Linksventrikuläre Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3).....	- 79 -
4	Diskussion.....	- 80 -
4.1	Induktion der kardialen CNP mRNA-Expression bei akuter Druckbelastung des Herzens durch transverser Aortenkonstriktion (TAC)	- 80 -

4.2	CM GC-B KO Mäuse haben eine effiziente und spezifische Deletion des GC-B Rezeptors in Kardiomyozyten.....	- 81 -
4.3	Unter physiologischen, basalen Bedingungen hat das CNP/GC-B System keine Bedeutung für die Morphologie und Funktion der Kardiomyozyten	- 82 -
4.4	Im Alter zeigen weibliche CM GC-B KO Mäuse eine dilatative Kardiomyopathie.....	- 83 -
4.5	Endogenes, lokales CNP schützt vor pathologischer Herzhypertrophie, aber nicht vor interstitieller Fibrose des Herzens.....	- 84 -
4.6	Der CNP/GC-B/PKG Signalweg in Kardiomyozyten moduliert die Titin-Phosphorylierung und schützt vor dilatativer Kardiomyopathie.....	- 85 -
4.7	Der CNP/GC-B/PKG Signalweg hemmt in Kardiomyozyten die Stress-abhängige Induktion von Zytokinen/Myokinen wie Interleukin 6, dies schützt möglicherweise vor Inflammation und Apoptose	- 87 -
4.8	Limitationen der Studie	- 88 -
5	Zusammenfassung.....	- 89 -
6	Abstract	- 91 -
7	Anhang.....	- 93 -
7.1	verwendete Chemikalien.....	- 93 -
7.1.1	verwendete Enzyme	- 94 -
7.1.2	verwendete Kits (gebrauchsfertige Lösungen)	- 94 -
7.2	technische Laborgeräte	- 95 -
7.3	verwendete Verbrauchsmaterialien.....	- 96 -
7.4	Puffer und Lösungen	- 96 -
7.4.1	verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot.....	- 96 -
7.4.2	verwendete Puffer und Lösungen für Genotypisierungen	- 97 -
7.4.3	verwendete Puffer und Lösungen für Zellkultur	- 98 -
7.4.4	verwendete Puffer und Lösungen für Radioimmunoassay (RIA)	- 98 -
7.5	verwendete Medien	- 98 -
7.6	verwendete rekombinante Proteine.....	- 99 -
7.7	verwendete Primer.....	- 99 -
7.7.1	Primer für qRT-PCR	- 99 -

7.7.2	Primer für Genotypisierung	- 100 -
8	Abkürzungsverzeichnis	- 101 -
9	Danksagung	- 105 -
10	Literaturverzeichnis	- 107 -
11	Abbildungsverzeichnis	- 120 -

1 Einleitung

1.1 Einblick in das kardiovaskuläre System

Die Hauptaufgabe des Herz-Kreislauf-Systems besteht in der Versorgung des Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen, dem Abtransport von CO₂ und Stoffwechselendprodukten, der Regulation der Körpertemperatur und der Aufrechterhaltung des physiologischen Blut-pH-Werts. Das Transportmedium Blut erreicht seine Zielstrukturen über das Gefäßsystem des Körpers. Dabei ist der Blutkreislauf aus zwei hintereinander geschalteten Kreisläufen, in der das Herz als autonome Pumpe fungiert, aufgebaut. Im Körperkreislauf wird sauerstoffreiches Blut aus dem linken Ventrikel über die Aorta bis hin zu den Kapillaren verteilt. In den Kapillaren, welche das Bindeglied zwischen Arterien und Venen darstellen, erfolgt der Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselendprodukten. Nach erfolgter Sauerstoffübertragung fließt das sauerstoffarme Blut über die Venen zum Herzen zurück. Aus dem rechten Ventrikel gelangt das Blut zur Sauerstoffanreicherung in den Lungenkreislauf und anschließend über die Lungenvenen wieder in den linken Vorhof.

Anatomisch betrachtet ist das Herz ein Hohlorgan, welches aus 4 Kammern aufgebaut ist. Aus dem rechten Vorhof (Atrium) und einer rechten Kammer (Ventrikel), sowie einem linken Atrium und einem linken Ventrikel. Diese werden jeweils durch Vorhofseptum und Kammerseptum voneinander getrennt. Die Vorhöfe und Kammern werden durch atrioventrikuläre Klappen (rechtes Herz: Trikuspidalklappe, linkes Herz: Mitralklappe) voneinander getrennt (Opie 2012, Schmidt 2007).

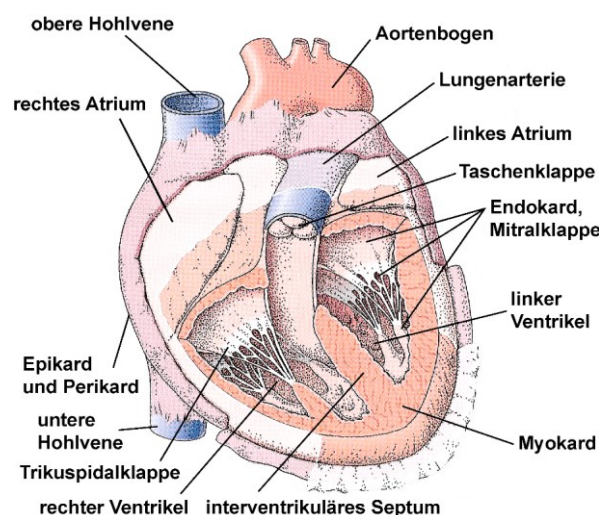


Abb. 1 Längsschnitt des Herzens (Schäffler 2000). Darstellung des rechten und linken Herzens mit den jeweiligen Segelklappen, sowie der Bezeichnung der einzelnen Strukturen der Herzwand, welche aus Endo-, Myo- und Epikard besteht.

Das Myokard, welches sich zwischen dem Epikard (äußere Schicht der Herzwand) und dem Endokard (innerste Schicht der Herzwand) befindet, bildet den größten Teil der Herzwand. Der Herzmuskel (Myokard) ist im Bereich der Vorhöfe dünner als in den Ventrikeln, sowie im linken Herzen stärker ausgebildet als im rechten. Obwohl Kardiomyozyten den größten Anteil des Myokards ausmachen, sind ungefähr 70 % andere Zelltypen, wie glatte Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und kardiiale Fibroblasten (Katz 2011). Menschliche Kardiomyozyten des Vorhofs (Durchmesser: 5 - 6 μm , Länge: 20 μm) sind wesentlich kleiner als die des Ventrikels (Durchmesser: 17 - 25 μm , Länge: 60 - 140 μm) (Schmidt 2007). Die Querstreifung der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten kommt durch die Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente in den Sarkomeren zustande. Im mittleren Teil jedes Sarkomers liegen die dicken Filamente (Myosin) und interagieren auf beiden Seiten mit den dünnen Filamenten (Aktin). Die dünnen Filamente sind, wie auch ein drittes Filamentsystem (Titinstränge) im Sarkomer, an den Z-Scheiben verankert. Die riesigen Titinmoleküle (3000 – 3800 kDa) erstrecken sich über die Distanz eines Halbsarkomers von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Mitte des Sarkomers). Die gesamte Aminosäuresequenz von Titin wird von einem einzigen Gen kodiert. Durch alternatives Spleißen der Titin prä-mRNA entstehen mehrere Isoformen. Im Herzmuskel werden die N2B- und N2BA-Isoformen ko-exprimiert. Das Verhältnis der beiden Isoformen, sowie die Phosphorylierung des Titin-Moleküls an der N2B-Isoform, bestimmen letztendlich die elastischen Eigenschaften der Kardiomyozyten. Titin kann an mehreren Stellen durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden. (Hudson 2011, Kotter 2016). Zudem wird Titin auch als Gerüst- und Stützprotein beschrieben, welches für die Positionierung der Myosinfilamente im Zentrum des Sarkomers verantwortlich ist (Schmidt 2007).

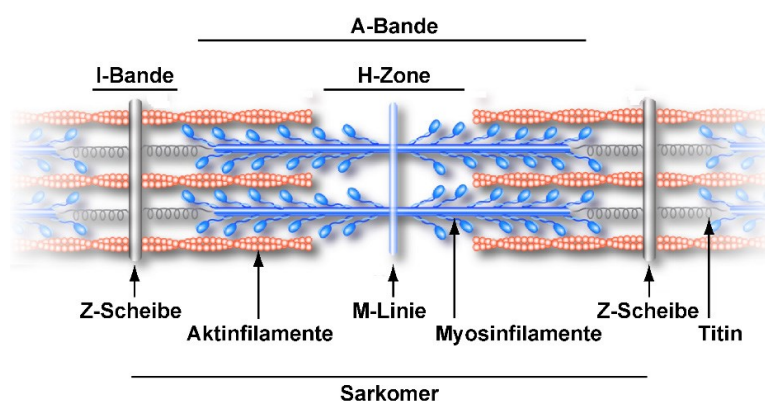


Abb. 2 Darstellung einer Sarkomerstruktur (Davidson 1996)(Günther 2007). Als Sarkomer wird der zwischen zwei benachbarten Z-Scheiben liegende Bereich einer Muskelfibrille bezeichnet.

1.2 Mechanismus der Kontraktion von Herzmuskelzellen

Die Kontraktion des Herzmuskels kommt wie beim Skelettmuskel dadurch zustande, dass Aktin- und Myosinfilamente aneinander entlanggleiten. Sobald innerhalb des kontraktiles Apparates Ca^{2+} an Troponin C (TnC) bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung im Troponinkomplex - bestehend aus Troponin C, Troponin I (TnI) und Troponin T (TnT). Dadurch kann Tropomyosin die Position zum Aktinfilament verändern und die Bindungsstellen für die Myosinköpfchen werden freigelegt. Das Myosinköpfchen bindet an die spezifischen freien Stellen am Tropomyosinfilament, klappt in Kontraktionsrichtung um und bewegt das Aktinfilament in Richtung Mitte des Sarkomers. Durch das Kippen des Köpfchens in Richtung des Myosinhalses wird über die Myosin-ATPase Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat gespalten und die Muskelkontraktion initiiert. Dadurch verkürzt sich das Sarkomer und der Muskel spannt sich an. TnI verhindert als inhibitorische Einheit die Konformationsänderung des Tropomyosin, bis erneut Ca^{2+} an TnC bindet (Collinson 2001).

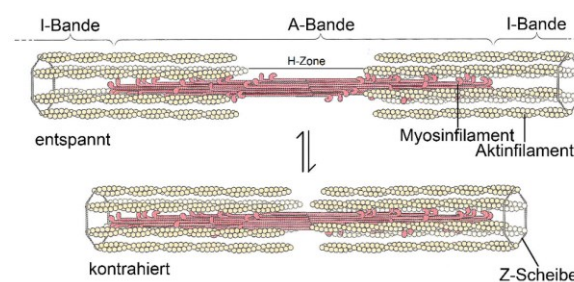


Abb. 3 Die Kontraktion führt zur Verkürzung des Sarkomers (Nelson 2005). Im entspannten Zustand befinden sich im Bereich der H-Zone nur Myosinfilamente. Während der Muskelkontraktion gleiten die dicken an den dünnen Filamenten entlang und bewegen dadurch die Z-Scheiben aufeinander zu. Das Sarkomer wird verkürzt und die H-Zone ist nicht mehr vorhanden.

Nach der einseitigen Bewegungsrichtung des Myosinköpfchens lagert sich wieder ATP an und der Aktin/Myosin-Komplex wird gelöst und ein Querbrückenzyklus ist beendet (Schmidt 2007, Seidman 2001).

1.3 Elektromechanische Kopplung

Die wichtigsten Signalstoffe der elektromechanischen Kopplung sind Ca^{2+} -Ionen. In ruhenden Zellen beträgt die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol nur ein Zehntausendstel der extrazellulären Konzentration. Während der Plateauphase des Aktionspotentials werden in der Herzmuskelzelle des Arbeitsmyokards spannungsgesteuerte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in der Membran der T-Tubuli geöffnet. Es kommt zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol. Durch diesen initialen Ca^{2+} -Einstrom werden Ryanodinrezeptoren in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) aktiviert. Über diese spezifischen Kanäle gelangen Ca^{2+} -Ionen aus dem SR in das Zytosol. Dadurch steigt die zytosolische freie Ca^{2+} -Konzentration circa von 10^{-7} mol/l auf 10^{-5} mol/l an. Die Bindung von Ca^{2+} an das myofibrilläre Regulatorprotein Troponin C aktiviert den kontraktilen Apparat.

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kann auch durch Sympathikus-Aktivierung erhöht werden. Auf der Zellmembran von Herzmuskelzellen befinden sich β_1 -Adrenorezeptoren. Diese Rezeptoren können durch Botenstoffe des Sympathikus (Noradrenalin aus sympathischen Nervenendungen, Adrenalin aus dem Nebennierenmark) stimuliert werden. Die Stimulation der β_1 -Adrenorezeptoren aktiviert über Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine das Enzym Adenylylcyclase. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP. Das cyclische AMP ist ein allosterischer Aktivator der Proteinkinase A (PKA). Über die PKA können verschiedene Zielproteine durch Phosphorylierung, wie die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, moduliert werden. Werden diese durch die PKA phosphoryliert, erhöht sich der Ca^{2+} -Einstrom während der Plateauphase und damit auch die getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Die kardiale Stimulation von β_1 -Adrenorezeptoren führt zu einem stärkeren Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als bei normaler Erregung. Diese gesteigerte Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels bezeichnet man als positive Inotropie. Für die Relaxation der Herzmuskelzelle müssen die Ca^{2+} -Ionen wieder in den Extrazellulärraum und in das SR zurück gepumpt werden. Dieser Vorgang wird über eine Ca^{2+} -Pumpe-die sarplasmatische Retikulums Ca^{2+} -ATPase (SERCA), welche in der Membran des SR lokalisiert ist, gesteuert. Das zuvor eingeströmte Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum wird hauptsächlich über den Natrium-Calcium-Austauscher hinaus transportiert.

Die Aktivität der SERCA wird durch das inhibitorische Regulatorprotein Phospholamban (PLB) gesteuert. Wird PLB an Serin 16 über die Proteinkinase A nach β_1 -adrenerger-Stimulation (Sympathikus) phosphoryliert, entfällt die Hemmung der SERCA. So können vermehrt Ca^{2+} -Ionen in das SR aufgenommen werden und die Herzmuskelzelle kann schneller relaxieren (Knollmann 2008, Schmidt 2007).

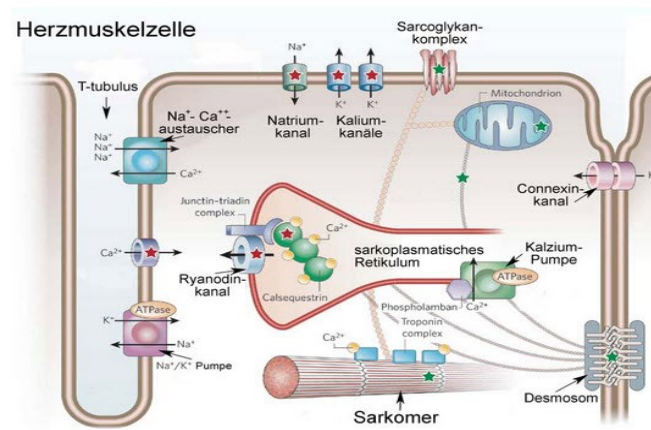


Abb. 4 Schema der elektromechanischen Kopplung (Knollmann 2008). Dargestellt sind an der elektromechanischen Kopplung beteiligte Protein-Komplexe und intrazelluläre Organellen. Initiiert wird der kardiale Zyklus durch Depolarisation der Membran. Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgt durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum und durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Durch die Aktivität der SERCA sinkt die zytosolische Konzentration und die Relaxation der Herzmuskelzelle wird eingeleitet. Zusätzlich werden auch über den $3 \text{ Na}^+ / 1 \text{ Ca}^{2+}$ -Austauscher Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle transportiert.

1.4 Kontraktionszyklus des Herzens

Die quantitativ wichtigste Aufgabe des Herzens besteht in der Druck-Volumen-Arbeit. Während der Systole entwickelt das Herz Druck und wirft Blut aus. In der Diastole entspannt sich das Herz und wird mit Blut gefüllt. Dies sind die Voraussetzungen für eine effiziente Pumpleistung des Herzens. Während der Kammer systole steigt zuerst der Druck im linken Ventrikel soweit an, bis der Druck in der Aorta erreicht ist. Das Blutvolumen ändert sich dabei nicht, da alle Herzklappen geschlossen sind (isovolumetrische Anspannungsphase). Sobald der Druck im linken Ventrikel den Druck in der Aorta überschreitet, öffnet sich die Aortenklappe. In dieser Austreibungsphase steigt der Druck weiter an und es wird ungefähr ein Schlagvolumen von 70 ml Blut ausgeworfen. Die Anspannungs- und Austreibungsphase bilden zusammen die Systole des Herzens. In der anschließenden Kammerdiastole entspannt sich das Myokard, der Druck im linken Ventrikel fällt wieder ab und die Aortenklappe schließt sich (Entspannungsphase). So wird ein Zurückfließen des Blutes aus der Aorta in den Ventrikel verhindert. Sobald der Druck des linken Ventrikels den Druck des linken Vorhofs unterschreitet, öffnet sich die Mitralklappe und der linke Ventrikel füllt sich mit Blut (Füllungsphase). Die endgültige Ventrikelfüllung wird durch die Kontraktion des Vorhofs bewirkt. Entspannungs- und Füllungsphase bezeichnet man zusammen als Diastole des Herzens (Lederhuber 2010, Schäffler 2000, Schmidt 2007). Zudem ist bekannt, dass das Herzkreislaufsystem dynamisch reguliert ist, um kurzfristigen und langfristigen Anforderungen gerecht zu werden. Normalerweise wird die Pumpfunktion des Herzens so gesteuert, dass das pro Zeiteinheit über die Aorta ausgeworfene Blutvolumen, das Herzzeitvolumen (HZV), zu jedem Zeitpunkt exakt die Bedürfnisse der zu versorgenden Gewebe abdeckt. Die

dynamische Anpassung des HZV an die wechselnden Bedürfnisse des Körpers kann über die Änderung des Herzschlagvolumens (HSV) und/oder der Herzfrequenz reguliert werden. Das Herzschlagvolumen, welches die Blutmenge beschreibt, die während eines Herzschlages aus dem linken Ventrikel ausgeworfen wird, kann über den Frank-Starling-Mechanismus und den Sympathikustonus gesteigert werden. Über den Frank-Starling-Mechanismus ist das Herz in der Lage, das HZV während steigenden Aortendrucks konstant zu halten. Bei der Sympathikus-bedingten Steigerung des HZV kommt neben der positiv inotropen (Steigerung der Kontraktionskraft), besonders der positiv chronotropen Wirkung (Steigerung der Herzfrequenz) eine wichtige Bedeutung zu. Im Unterschied zum Frank-Starling-Mechanismus ist die positive inotrope Wirkung unabhängig von der Vordehnung. Der sympathische Überträgerstoff Noradrenalin steigert die Herzkraft ebenfalls bei unveränderter Vordehnung. Diese Anpassungsmechanismen stehen dem Herzen akut, d.h. von einem zum anderen Herzschlag, zur Verfügung. Wird das Herz aber einer längerfristigen Arbeitsbelastung ausgesetzt, kommt es zu strukturellen Veränderungen des Herzmuskels. Eine langfristig gesteigerte Herzarbeit wie Muskeltraining kann zu einer Adaption in Form von Muskelwachstum (Hypertrophie) führen (Opie 2012, Piper 2010).

1.5 Regulation und Entwicklung der kardialen Hypertrophie

Die Hypertrophie des Herzens stellt einen Anpassungsmechanismus des Myokards an erhöhte Belastung dar. Es gibt verschiedene Erscheinungsbilder, welche sich sowohl ätiologisch als auch morphologisch unterscheiden. Unter Hypertrophie versteht man allgemein eine Vergrößerung der einzelnen Zellen infolge vermehrter Beanspruchung. Dies führt zu einer Größenzunahme eines Organs oder eines Gewebes. Das normale Herzgewicht eines gesunden Erwachsenen beträgt ca. 300 g. Bei Sportlern kann das Herzgewicht durchschnittlich bis zu 425 g betragen. Bei dieser physiologischen Herzhypertrophie verdicken sich die Wände des linken und des rechten Ventrikels gleichmäßig. Während Erkrankungen, wie arterielle Hypertonie (Bluthochdruck), zu einer anhaltenden einseitigen Druckbelastung führen und unbehandelt eine Herzhypertrophie verursachen.

Je nachdem, ob der systemische oder pulmonale Druck erhöht ist, entwickelt sich eine Linksherz- oder Rechtsherzhypertrophie. Dieser Zustand der erhöhten Druckbelastung kann durch das Herz zunächst über einen langen Zeitraum gut kompensiert werden, indem funktionelle und strukturelle Veränderungen des Herzens vorgenommen werden. Beispielsweise verdicken sich die Herzmuskelfasern, d.h. Volumen und Querschnittsfläche der Myozyten nehmen zu, was zu einer erhöhten Pumpkraft führt. Diese Kompensationsmaßnahmen des Herzens können langfristig gesehen, uneffektiv und schädlich auf das Herz selbst wirken. Nimmt die Hypertrophie weiter zu und wird damit das kritische Herzgewicht von 500 g überschritten, kann es zu einer Dekompensation kommen. Das

bedeutet den Verlust der Fähigkeit des Herzens, trotz aller Anpassungsmechanismen, die Herzschwäche auszugleichen. Die Dekompensation des Herzens geht meist mit einer Dilatation (Ausdehnung) einher. Dies führt dazu, dass der Herzmuskel die Fähigkeit des Wiederzusammenziehens verliert und dadurch die Kontraktion schlechter wird. Hinzu kommt, dass die Vergrößerung der Herzkammern undichte Herzklappen zur Folge haben und somit Blut aus dem linken Vorhof in die Lunge zurückfließt und Wasseransammlungen (Ödeme) entstehen können (Lederhuber 2010, Schmidt 2007).

Stellt man sich das Herz als einen kugelförmigen Hohlkörper vor, mit einem bestimmten Innenradius r (Gefäßradius), einer Wanddicke d und dem transmuralen Druck P (ein Druck, welcher auf die Wand eines Hohlorgans einwirkt) der normalerweise dem Innendruck entspricht, so gilt: Die Wandspannung K nimmt proportional mit dem Innendruck und dem Radius zu. So gilt auch, je dicker die Wand, desto geringer ist bei gleichem Innenradius die Wandspannung.

Laplace Gleichung: $K = P * r/2d$ bzw. $P = K * 2d/r$

Überträgt man diese Beziehung auf das Herz, lassen sich verschiedene Phänomene der Herzfunktion erklären. Bei einer exzentrischen Herzhypertrophie kommt es durch chronische Volumenbelastung, wie z.B. bei einer Aorteninsuffizienz, zu einem vergrößerten Ventrikelvolumen wodurch das Kammermyokard hypertrophiert und der Ventrikel dilatiert. Das bedeutet, die diastolische Wandspannung nimmt proportional mit dem steigenden Radius zu. Ist das Herz einer chronischen Druckbelastung ausgesetzt, führt dies zu einer konzentrischen Herzhypertrophie. Hier kommt es zu einer Zunahme der systolischen Wandspannung, welche gleichzeitig den Hypertrophieprozess auslöst. Dabei verdicken sich die linksventrikulären Herzwände, jedoch bei einem gleichbleibenden Ventrikelradius (Ventrikelvolumen). Auslöser einer konzentrischen Hypertrophie sind am häufigsten eine Aortenklappenstenose oder eine arterielle Hypertonie (Klinke 2009).

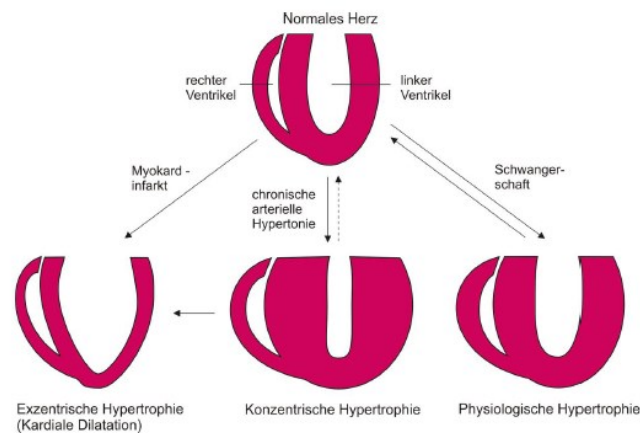


Abb. 5 Formen kardialer Hypertrophie (Heineke 2006). Hypertrophie wird über Ventrikelwachstum und Kardiomyozytenwachstum definiert. Gleichmäßiges Wachstum der Kardiomyozyten in Länge und Querschnitt wird als physiologisch angesehen (Sportlerherz oder Schwangerschaft). Die stärkere Zunahme der Länge der Myozyten im Verhältnis zum Durchmesser wird als exzentrische Hypertrophie bezeichnet. Hingegen wird eine Zunahme des Kardiomyozytenquerschnitts im Verhältnis zur Länge, als konzentrische Hypertrophie bezeichnet. Beide letzten genannten Hypertrophieformen gelten als pathologisch.

1.6 Bedeutung und Funktion der Natriuretischen Peptide

Natriuretische Peptide (NP) sind Peptidhormone, die von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden. Zu der Familie der Natriuretischen Peptide gehören das atriale natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP). Die strukturell sehr ähnlichen, relativ kleinen Natriuretischen Peptide (22-32 Aminosäuren) werden von verschiedenen Genen kodiert. Das ANP-Gen (*NPPA*), BNP-Gen (*NPPB*) sowie das CNP-Gen (*NPPC*) kodieren jeweils für das Prä-Pro-Natriuretische Peptid. Das zunächst gebildete Prä-Pro-NP, wird erst nach Abspalten der N-terminalen Signalsequenz in das Pro-NP umgewandelt. Das Pro-NP wird dann durch ein spezifisches Enzym proteolytisch in das biologisch aktive NP gespalten. Pro-ANP wird durch die membranständige Serinprotease Corin in das 28-Aminosäure umfassende Peptid ANP gespalten (Yan 2000). Das atriale natriuretische Peptid (ANP), sowie auch BNP, spielen eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Blutdrucks und des Blutvolumens (Kuhn 2012). ANP wird vorrangig von den Kardiomyozyten des Vorhofs und BNP von den Myozyten des Ventrikels nach akuter oder chronischer Dehnung der Zellen, in das zirkulierende Blutsystem sezerniert. Die erhöhte Vorhof- oder Kammerdehnung kann infolge einer erhöhten Vor- oder Nachlast des Herzens (also bei Volumen- oder Druckbelastungen) bei einer Herzhypertrophie oder einer entwickelten Herzinsuffizienz auftreten (Yasue 1989).

Alle NP enthalten einen Peptidring aus 17 Aminosäuren, der für ihre Hormonwirkung essentiell ist (Wang 2007). Über diesen Peptidring binden die NP spezifisch an bestimmte membrangebundene

Zellrezeptoren. Die Rezeptoren bestehen aus unterschiedlichen Domänen, unter anderem aus einer Guanylylcyclase-Domäne. ANP und BNP binden beide mit einer hohen Affinität an den Guanylylcyclase-A (GC-A) Rezeptor, obwohl ANP mit einer vierfach höheren Affinität an den Rezeptor bindet (Bennett 1991). Durch die Bindung der Liganden (ANP, BNP und CNP) an den jeweiligen spezifischen Rezeptor wird die Enzymaktivität der Guanylylcyclase aktiviert und die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in 3'-5'-cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes katalysiert (Chrisman 1975, Kimura 1974). cGMP als second messenger aktiviert wiederum die cGMP-abhängigen Proteinkinasen G I und II (PKG I und PKG II), sowie die cGMP-regulierenden Phosphodiesterasen (PDEs) 2 und 3 (Feil 2005, Hofmann 2013, Vaandrager 2005). Selbst kleinste Veränderungen des cGMP-Pegels können einen signifikanten Einfluss auf die cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Spiegel in der Zelle hervorrufen, da die cAMP-Spiegel über die Aktivität der spezifischen PDEs 2 und 3 moduliert werden. Die PDE 2 kann über cGMP aktiviert werden und somit die Hydrolyse von cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) induzieren, wohingegen die PDE 3 durch cGMP gehemmt und somit der Abbau von cAMP zu AMP verhindert wird (Maurice 2014).

1.6.1 Physiologische Bedeutung des ANP/GC-A-Signalwegs

Die Expression des GC-A Rezeptors wurde in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe nachgewiesen. Der Rezeptor wird vorwiegend in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, den Nieren, dem zentralen Nervensystem und im Herzen exprimiert (Brenner 1990, Kuhn 2003). Durch die Aktivierung des GC-A Rezeptors können je nach Zielgewebe verschiedene physiologische Effekte ausgelöst werden (Potter 2006).

Die Peptidhormone ANP und BNP sind unter anderem an der Regulation des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes beteiligt und stellen somit den wichtigsten Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) dar. Durch die Reduktion des Plasmavolumens und der Senkung des Blutdrucks ist ANP in der Lage, das Herz vor einer übermäßigen Volumen- und Druckbelastung zu schützen. Ausgelöst werden diese Effekte durch eine in der Niere erhöhte Ausscheidung von Natrium und Chlorid. Dabei agiert das ANP/GC-A-System sozusagen als Aldosteron-Agonist und kann so das RAAS-System inhibieren und die Natrium-/Wasser- bzw. Harnausscheidung fördern. Die so angeregte Natriuresis/Diuresis bewirkt eine rasche Reduktion des Plasmavolumens und der Blutdruck sinkt.

Ein weiterer Effekt des ANP/GC-A-Systems ist die Entspannung glatter Gefäßmuskelzellen über ein Absinken der Reninkonzentration. ANP hemmt die Ausschüttung des in der Niere gebildeten Enzyms Renin und unterbindet so die Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I (Gambaryan 1998, Kurtz 1986). Angiotensin I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE), welches in

Endothelzellen gebildet wird, zu Angiotensin II überführt und bewirkt eine Vasokonstriktion, sowie eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron (von Lueder 2013).

Beide Peptidhormone (ANP und BNP) weisen somit Herz-schützende Funktionen auf und werden in der Klinik unter anderem als Verlaufskontrolle für Herzinsuffizienz Patienten eingesetzt.

1.6.2 Entdeckung und Bildung des C-Typ natriuretischen Peptid (CNP)

Nach ANP und BNP, wurde 1990 das dritte Mitglied der kleinen Familie der Natriuretischen Peptide, das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), entdeckt (Koller 1991). Das aus dem Schweinehirn isolierte CNP zeigt, wie bereits erwähnt, strukturelle Ähnlichkeiten zu den beiden anderen NP (Sudoh 1988, Sudoh 1990). Der gemeinsame Peptidring, der bei allen NP aus 17 Aminosäuren (AS) besteht, wird auch bei CNP durch eine kovalente Bindung der Schwefelatome zweier Cystein-Moleküle (Disulfidbrücke) gebildet. Humanes CNP liegt zunächst als ein Prä-Pro-CNP-Peptid mit 126 AS vor, bestehend aus einer kurzen Signalpeptid-Sequenz, dem Pro-Peptid 1-50 und CNP-53. Nachdem durch eine Signalpeptidase das kurze Signalpeptid entfernt wurde, spaltet die Endoprotease Furin das übrig gebliebene Stück an der Peptidbindung R50 und D51 in das Pro-Peptid 1-50 und CNP-53. Beide Formen können von Zellen sezerniert werden. CNP-53 wird dann durch ein noch unbekanntes extrazelluläres Enzym an der Peptidbindung K81 und G82 aufgespalten, so dass CNP-22 entsteht. Beide Formen, CNP-53 und CNP-22, scheinen funktionell ähnlich zu sein. Die funktionelle Bedeutung der weiteren Konvertierung von CNP-53 zu CNP-22 ist noch nicht vollständig geklärt (Wu 2003). Allerdings scheinen beide Peptide eine vergleichbare Affinität gegenüber deren spezifischen Guanylylcyclase-B (GC-B) Rezeptor zu besitzen (Kuhn 2016).

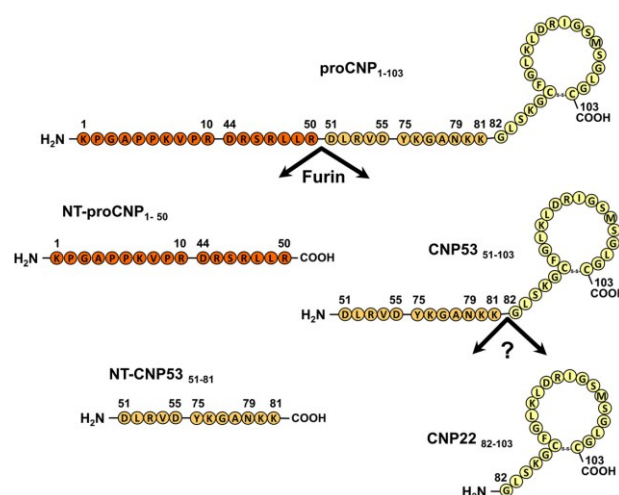


Abb. 6 Biosynthese und Prozessierung des biologisch aktiven CNP (Zakeri 2013).

Die kurze Form, CNP-22, ist unter physiologischen Bedingungen im Blutplasma lediglich im Femtomol pro Milliliter Bereich nachweisbar (Stingo 1992), steigt aber in Patienten mit Herzinsuffizienz an. Die Patienten zeigten im Koronarsinus (also in der Zirkulation des Herzens) einen um 60 % höheren CNP-Anstieg, als in der Zirkulation anderer Organe (Kalra 2003, Palmer 2009).

Das Peptid CNP wird in vielen verschiedenen Organen wie Gehirn, Knochen, Herz, Lunge, Gefäßen, Nieren, Uterus, Eierstöcken und Hoden exprimiert. CNP agiert als ein autokrin/parakrin wirkender Regulator und kann somit als Hormon, Funktionen auf benachbarte Zellen, oder auf die sezernierende Zelle selbst (autokrine Wirkung) ausüben (Schulz 1989). Obwohl CNP in den Nieren exprimiert wird, weist das Peptid nur vernachlässigbare bis gar keine natriuretischen Effekte auf und hat somit nicht die gleiche Wirkung wie ANP auf den Blutdruck (Canaan-Kuhl 1992, Igaki 1998, Mattingly 1994, Stingo 1992, Suzuki 1993). Im Gefäßsystem wird CNP hauptsächlich von vaskulären Endothelzellen exprimiert und moduliert dort den Gefäßtonus (Suga 1998).

Die Sekretion von CNP aus glatten Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten, Makrophagen und Leukozyten kann durch Schubspannung, Hypoxie und verschiedenen Zytokinen stimuliert werden. Zu diesen Zytokinen gehören unter anderem der transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF- β), der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Lipopolysaccharide (LPS), sowie Faktoren, die bei kardialem Remodeling oder Entzündungsprozessen produziert werden (Chun 1997, Del Ry 2013, Horio 2003, Suga 1992, Suga 1992, Suga 1993).

CNP zeigt neben der hohen Affinität zu dem GC-B Rezeptor, ebenso eine erhöhte Interaktion zu dem natriuretischen Peptid Rezeptor-Typ C (NPR-C) (Matsukawa 1999). Diesem Rezeptor fehlt die intrazelluläre katalytische Domäne und ist somit möglicherweise für die Internalisierung und für den lysosomalen Abbau der Natriuretischen Peptide verantwortlich (Calvieri 2012, Lumsden 2010).

1.6.3 Struktur und Aktivierung des GC-B Rezeptors

Bei dem GC-B Rezeptor handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa. Der Rezeptor selbst besteht aus mehreren Domänen mit unterschiedlicher Funktion. Einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer kurzen hydrophoben Transmembranregion und einer intrazellulären Domäne. Die intrazelluläre Domäne setzt sich aus einer kinasehomologen Domäne (KHD), einer Dimerisierungsdomäne und einer Region mit Guanylylcyclase-Aktivität zusammen (Potter 2001). Die kinasehomologe Domäne ist verantwortlich für die Transduktion des Signals der extrazellulären Liganden-Bindungsaktivität zur katalytischen Domäne. Rezeptoren, denen die KHD fehlt, zeigen eine erhöhte Cyclase-Aktivität. Dies deutet daraufhin, dass die kinasehomologe Domäne die Cyclase-Aktivität in Abwesenheit des Liganden unterdrückt (Chinkers 1989, Deshmane 1997, Koller 1992). Die Dimerisierungsdomäne fungiert als ein Verbindungsstück

zwischen der KHD und der Guanylylcyclase-Domäne. Zudem ist diese Domäne an der Dimerisierung und Aktivierung der katalytischen Cyclase-Domäne beteiligt. In Abwesenheit des Liganden CNP liegt der GC-B Rezeptor als Homodimer vor. Sobald CNP an den Rezeptor bindet, wird durch die intrazelluläre Konfirmationsänderung der Cyclase-Domäne, diese aktiviert und die Synthese von cGMP aus GTP ermöglicht (Ogawa 2004, Potter 2006).

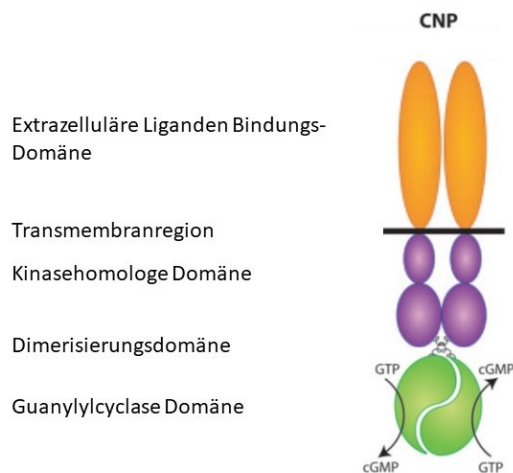


Abb. 7 Struktur des GC-B Rezeptor (Potter 2006).

Die Phosphorylierung des GC-B Rezeptors an der KHD erfolgt über 4 Serin- und 2 Threonin-Phosphorylierungsstellen und ist erforderlich für die Aktivierung des GC-B Rezeptors (Potter 1998, Yoder 2010). In Abwesenheit des Liganden ist der GC-B Rezeptor maximal phosphoryliert. In vitro Studien belegten, dass eine chronische Inkubation mit dem Liganden CNP zu einer Dephosphorylierung des Rezeptors führt und somit zu einer reduzierten Guanylylcyclase-Aktivität (Potter 1992). Der exakte Prozess, durch den der dephosphorylierte und somit inaktive Rezeptor, wieder Re-phosphoryliert und über den Liganden CNP aktivierbar wird, ist noch nicht vollständig geklärt.

Eine weitere Bedeutung für die Aktivierung des GC-B Rezeptors hat ATP (Chinkers 1991). Das Nukleotid ATP ist in der Lage, die Guanylylcyclase-Aktivität zu modulieren, indem es die Bindungsaffinität von CNP an den GC-B Rezeptor beeinflusst (Yamazaki 2003).

1.6.4 Physiologische Bedeutung des CNP/GC-B-Systems

Die Expression des GC-B Rezeptors wurde ebenso wie GC-A in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen. Neben Organen wie Gehirn, Lunge, Knochen und Herz, findet sich mRNA für den GC-B Rezeptor auch in den Nieren, in Ovarien, in Fibroblasten und in glatten Gefäßmuskelzellen (Chrisman

1993, Dickey 2007, Schulz 1989). Durch die Aktivierung des GC-B Rezeptors können je nach Expressionsort verschiedene Wirkungsweisen ausgelöst werden. Diese Signalkaskaden werden durch die nach CNP-induzierter Stimulation des GC-B Rezeptors, über die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG I und II) und die Phosphodiesterasen (PDE) vermittelt.

1.6.4.1 Bedeutung des CNP/GC-B-Systems für das Knochenwachstum

Die wohl bekannteste Funktion des CNP/GC-B-Systems ist die Stimulierung der enchondralen Ossifikation (Yasoda 1998). Bereits im Jahr 1994 konnte gezeigt werden, dass kultivierte Rattenknorpelzellen eine hohe Expressionsrate von CNP und GC-B aufweisen (Hagiwara 1994). Die meisten Knochen in Säugetieren, einschließlich Wirbel und Röhrenknochen, werden durch enchondrale Ossifikation gebildet. Bei dieser Form der Knochenentwicklung wird der Knochen nicht direkt aus dem Mesenchym (embryonales Bindegewebe) gebildet, sondern zunächst aus einer Zwischenstufe, dem hyalinen Knorpel. Während diese Knochenmatrix von innen heraus verknöchert und wächst, differenzieren sich die Mesenchymzellen zu Chondroklasten (Hata 2017). Die Chondroklasten bauen den Knorpel kontinuierlich ab und mit Hilfe von rekrutierten Chondroblasten wird die verkalkte Knorpelmatrix durch Knochen ersetzt. Dieser Prozess wird durch endokrine, auto- und parakrine Faktoren reguliert. Die Tatsache, dass CNP bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielt, wurde erstmals von Nakao und Garbers beschrieben. Sie konnten zeigen, dass eine systemische, globale Deletion von CNP oder GC-B das Skelettwachstum der Mäuse verlangsamte und zu einem ausgeprägten Zwergwuchs führte (Chusho 2001, Tamura 2004). Dieses eingeschränkte Knochenwachstums zeigte sich auch bei Mäusen, denen CNP oder GC-B ausschließlich in den Knorpelzellen fehlte (Chusho 2001, Kondo 2012, Nakao 2015, Tamura 2004, Tsuji 2008). Im Gegensatz dazu, zeigten Mäuse mit einer Knorpelzell-spezifischen Überexpression von CNP ein übermäßiges Knochenwachstum (Yasoda 2004).

Im Menschen führt eine homozygote Funktionsverlustmutation des GC-B Gens zu der seltenen Akromesomele Dysplasie Typ Maroteaux (AMDM). AMDM ist eine autosomal-rezessiv vererbte Skelett-Dysplasie und wurde erstmals 1971 von Maroteaux beschrieben. Charakteristische Symptome der AMDM sind ein besonders starker Kleinwuchs mit Verkürzung der mittleren und distalen Extremitäten (Bartels 2004). Später wurde beschrieben, dass bereits eine heterozygote Mutation des GC-B Gens genügt, um dieses Krankheitsbild zu verursachen (Olney 2006). Neuste Studien zeigen, dass eine heterozygote Funktionsverlustmutation des humanen CNP-Gens ebenfalls zu einem ausgeprägten Kleinwuchs führt (Hisado-Oliva 2018). All diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der CNP/GC-B-

Signalweg ein entscheidender Stimulator für das enchondrale Knochenwachstum bei Mäusen sowie bei Menschen darstellt (Fujii 2018).

1.6.4.2 Die Rolle des CNP/GC-B Systems im Herzen

Erstmals wurde im Jahr 1993 mittels Immunhistochemie das Vorkommen von CNP im Herzmuskel nachgewiesen (Wei 1993). Daraufhin wurde postuliert, dass CNP wichtige autokrine und parakrine Funktionen im Herzen vermittelt (D'Souza 2004). Über diese Eigenschaften ist CNP in der Lage, zelluläre Umbauprozesse des Herzens und der Blutgefäße, sowie die kardiale Kontraktion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu modulieren.

Um weitere Eigenschaften von CNP zu identifizieren, wurde eine Vielzahl von pharmakologischen Studien mit exogenem, synthetischem CNP durchgeführt. Zum Beispiel führte die Behandlung von murinen adulten Kardiomyozyten mit synthetischem CNP (100 nM) zu einem signifikant erhöhten cGMP-Spiegel. Unter basalen Bedingungen sind die cGMP-Spiegel in Myozyten nur sehr niedrig. Der cGMP-Konzentrationsanstieg nach CNP-Gabe, konnte auch in murinen primär-kultivierten kardialen Fibroblasten gezeigt werden. Zudem ist die cGMP-Antwort von Kardiomyozyten sowie von kardialen Fibroblasten nach Behandlung mit CNP signifikant höher als nach der Behandlung mit ANP (Gotz 2014). Es konnte auch gezeigt werden, dass synthetisches CNP über cGMP die Proliferation und Kollagen-Bildung von kultivierten Ratten-Herzfibroblasten unterdrückt (Horio 2003, Tokudome 2004). Ebenso führte die Applikation von synthetischem CNP (50 ng/kg/min über subkutane osmotische Minipumpen) nach einer Angiotensin II-induzierten Herzhypertrophie zu verminderten kardialen Umbauprozessen. (Izumiya 2012, Obata 2007, Soeki 2005). Auch die hochregulierte Expression und Aktivität der Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) Oxidase 4 (NOX4) konnte durch CNP-Gabe signifikant gehemmt werden (Izumiya 2012). NADPH Oxidasen sind Enzyme, die aus Sauerstoffionen, Superoxid-Anionen (sog. freie Sauerstoff-Radikale O_2^-) bilden. Die hochreaktiven Superoxid-Anionen können für Zellen toxisch sein (Kuroda 2010, Kuroda 2010). NOX4 spielt eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Pathophysiologie (Izumiya 2012).

Der durch die Angiotensin II-Behandlung erhöhte Blutdruck konnte jedoch durch synthetisches CNP nicht beeinflusst werden (Izumiya 2012). Dagegen zeigten transgene Ratten, mit einer systemischen Überexpression einer dominant-negativen GC-B-Rezeptormutante (der Rezeptor ist nicht in der Lage, ein Homodimer zu bilden-da bei einem Monomer die intrazelluläre Domäne fehlt, somit bleibt der Rezeptor inaktiv) eine verringerte cGMP Produktion, sowie einen daraus resultierenden Zwergwuchs und eine progressive, Blutdruck-unabhängige Herzhypertrophie, jedoch ohne Fibrose. Darüber hinaus führte eine chronische Volumenüberlastung bei diesen Ratten zu einer kongestiven Herzinsuffizienz (Langenickel 2006). Diese und weitere experimentelle pharmakologische Studien deuten darauf hin,

dass das lokale, auto-/parakrine CNP/GC-B/cGMP-System pathologischen myokardialen Umbauprozessen und kontraktiler Dysfunktion entgegenwirkt.

Um die Rolle des endogenen, kardialen CNP/GC-B-Systems zu untersuchen, wurden naheliegenderweise Mäuse mit einer systemischen Deletion von CNP oder GC-B generiert. Allerdings wurden diese Studien durch die Tatsache behindert, dass die globale Deletion zu schwerem Zwergwuchs und vorzeitigem Tod führte (Fujii 2018). Daraufhin wurden Nagetiermodelle mit einer Zell-spezifischen Deletion oder Überexpression eines bestimmten Zielgens generiert. Unter anderem wurde der Einfluss eines experimentell induzierten Myokardinfarkts an genetisch veränderten Mäusen mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Überexpression von CNP untersucht. Anhand dieses Mausmodells, konnte ein vermindertes kardiales Remodeling nach MI gezeigt werden, sowie, dass der CNP/GC-B-Signalweg entscheidend an der Verhinderung einer Herzhypertrophie beteiligt ist (Wang 2007). Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion der PKG I hingegen, zeigten unter basalen Bedingungen eine unveränderte Herzmorphologie und Herzfunktion. Die akute Gabe von Angiotensin II (Ang II) oder die Anwendung einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) führte bei den Kardiomyozyten-spezifischen PKG I-defizienten Mäusen zu einer dilatativen Kardiomyopathie mit Verschlechterung der Herzfunktion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass lokale Herz-schützende Effekte von natriuretischen Peptiden, besonders von CNP, über die PKG I unter pathologischen Stressbedingungen vermittelt werden (Frantz 2013). Zusätzlich dazu gibt es Studien, die zeigen, dass die kardialen anti-fibrotischen Effekte des Hormons ebenfalls über die PKG I vermittelt werden (Li 2008). Denn durch die Phosphorylierung von Smad3 über die PKG I, kann die TGF- β -induzierte Translokation von pSmad3 in den Zellkern verhindert und somit die Proliferation von Fibroblasten und deren Dedifferenzierung zu sekretorischen Myofibroblasten gehemmt werden (Li 2008). Widersprüchlich dazu, zeigten andere Studien mit kultivierten Fibroblasten, dass CNP bzw. cGMP zwar die TGF- β -induzierte Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten-Protein (MAP) Kinasen-Extracellular-signal Regulated Kinases 1 und 2 (ERK 1 und 2) verhindert, aber nicht die Translokation von Smad3 in den Zellkern (Beyer 2015, Li 2015, Li 2015). Diese und weitere Studien deuten auf anti-hypertrophe und anti-proliferative bzw. anti-fibrotische Eigenschaften des C-Typ natriuretischen Peptids unter pathophysiologischen Bedingungen hin.

Die Tatsache, dass die Aktivierung der GC-A und GC-B Signalwege im Allgemeinen für Patienten mit Herz Kreislauferkrankungen eine positive Auswirkung hat, ist unumstritten. Klinische Untersuchungen bestätigten dies, indem gezeigt wurde, dass die Hemmung von Nephilysin, eine Peptidase, welche die Inaktivierung natriuretischer Peptide induziert, das Risiko des Todes bei Herzinsuffizienz (HF) Patienten stark reduziert (von Lueder 2013). Ein anderer Versuchsansatz für therapeutische Perspektiven zur Behandlung von Herzerkrankungen ist die Entwicklung und letztlich auch die Anwendung von synthetisch "designten" natriuretischen Peptiden (Zakeri 2011). CD-NP (Cenderitide)

ist ein chimäres natriuretisches Peptid, welches in der Lage ist, GC-A und GC-B zu aktivieren (Costello-Boerrigter 2011). In CD-NP wurde das menschliche CNP mit dem C-Terminus (Carboxylgruppe) von *Dendroaspis* natriuretic peptide (DNP), einem spezifischen GC-A Aktivator-welcher aus dem Gift der grünen Mamba isoliert wurde, fusioniert (Dickey 2008, Dickey 2011). Dickey et al. postulierte weiterhin, dass CD-NP eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Abbau durch neutraler Endopeptidasen zeigt als ANP, BNP oder CNP. Bezogen auf die Hemmung der Kollagenbildung in humanen Herzfibroblasten zeigte CD-NP ebenfalls eine höhere Wirksamkeit als BNP oder CNP (Ichiki 2018). Nach diesen vielversprechenden Präklinischen Studien, wurde CD-NP erstmals an Herzinsuffizienz Patienten im Rahmen einer Phase-II-Studie eingesetzt. Die Untersuchungen zeigten, dass CD-NP im Vergleich zu einem Placebo, zu erhöhten cGMP-Spiegeln im Plasma und im Urin führte. Somit wurde gezeigt, dass CD-NP fähig war, humane Guanylylcyclasen zu aktivieren. Mit diesem technologischen Fortschritt (Peptid-Engineering-Strategien) und den bereits gesammelten Erfahrungen in der Anwendung Natriuretischer Peptide, in Bezug auf Wirksamkeit und Limitationen, lassen sich weitere neuartige Therapieansätze für Herz-Kreislauf-Erkrankungen entwickeln (Ichiki 2018).

1.6.4.3 Bedeutung des CNP/GC-B Signalwegs für das Gefäßsystem

Das Endothel spielt eine fundamentale Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase, indem es Gefäß-relaxierende Mediatoren sezerniert. Diese Mediatoren regulieren nicht nur den Gefäßtonus und das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen, sondern auch die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten (Moncada 1993, Vane 1990). Die wichtigsten vom Endothel sezernierten parakrinen Faktoren sind Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) (Ignarro 1987, Palmer 1987, Vane 1990). NO aktiviert im Zytosol die löslichen Guanylylcyclasen (sGC) und vermittelt so eine gefäßerweiternde Wirkung durch die Absenkung der intrazellulären Calcium-Konzentration. PGI₂ wird in Endothelzellen mit Hilfe der Prostacyclinsynthase aus Prostaglandin (PGH₂) gebildet und bindet an den G-Protein-gekoppelten Prostacyclin-Rezeptor (IP-Rezeptor). Zu den dadurch vermittelten Wirkungen von PGI₂ gehören unter anderem Vasodilatation, eine Erhöhung der Schmerzempfindlichkeit und die Hemmung der Thrombozytenaggregation (Schmidt 2007). Diese lokalen vom Endothel produzierten Mediatoren regulieren zusammen mit denen vom Herzen sezernierten Natriuretischen Peptide ANP und BNP den Elektrolythaushalt, das Blutvolumen und die kardiovaskuläre Homöostase (de Bold 1985, Levin 1998). Aber auch CNP stellt eine wichtige Komponente in der Aufrechthaltung der kardiovaskulären Homöostase dar. Denn fehlt CNP in Endothelzellen, führt dies zu Gefäßdysfunktionen, Bluthochdruck und Arteriosklerose (Moyes 2014). Moyes et al. konnte dies in einem Endothelzell-spezifischen Knockout Modell (ec CNP KO) nachweisen (Moyes 2014). Diese Studien zeigten, dass lokales CNP in der Lage ist, homöostatische Effekte zu

modulieren. Durch das Fehlen von CNP in Endothelzellen war die Thrombozytenaggregation erhöht und somit die Entstehung von Arteriosklerose begünstigt. Diese Art von pathologischem vaskulärem Remodeling wurde bei Mäusen, denen ANP oder GC-A in den Endothelzellen fehlt, nicht beobachtet. Weiterhin postulierten Moyes et al., dass ein Fehlen des NPR-C Rezeptors (Clearance-Rezeptor) in Endothelzellen, zu ähnlichen endothelialen Dysfunktionen und Bluthochdruck führt, wie die Ablation von CNP. Dieser Zusammenhang lässt vermuten, dass NPR-C im Rahmen einer Gefäßerkrankung die vasoprotektiven Effekte von CNP vermitteln kann. Somit kann NPR-C sowohl als Clearance-Rezeptor und als Signalrezeptor für endotheliales CNP fungieren (Moyes 2014). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das vom Endothel-freigesetzte CNP zusätzlich auch eine wichtige Rolle in der Regulierung des Blutdrucks zu haben scheint. Nakao et al. konnte mit einem transgenen Mausmodell zeigen, dass Mäuse mit einer glatten Gefäßmuskelzell (VSMC)-spezifischen Deletion des GC-B Rezeptors, einen ähnlichen Blutdruck wie die Kontrollmäuse hatten. Das könnte bedeuten, dass das vom Endothel-freigesetzte CNP den Blutdruck unabhängig von dem GC-B Rezeptor, welcher von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird, reguliert (Nakao 2017). Die CNP-vermittelte Vasodilatation, wird allerdings hauptsächlich über den von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und in kapillären Perizyten exprimierten GC-B Rezeptor induziert (Kalra 2001, Spiranec 2018). Somit könnte eine mögliche Ursache für den erhöhten Blutdruck in den ec CNP KO Mäusen, die verminderte Fähigkeit zur Vasodilatation sein. Diese gewonnenen Erkenntnisse, deuten auf eine wichtige Bedeutung des CNP/GC-B bzw. CNP/NPR-C-Signalwegs für das vaskuläre System hin (Nakao 2017).

Andere Studien, die sich mit Entzündungsprozessen innerhalb des Gefäßsystems (z.B. Atherosklerose) beschäftigten, konnten nachweisen, dass endotheliales CNP anscheinend auch eine entzündungshemmende Wirkung aufweist (Schachner 2004). Naruko et al. konnte zeigen, dass in Patienten mit atherosklerotischen Läsionen die CNP-Expression hochreguliert war (Naruko 1996). Hobbs et al. identifizierte CNP als ein vom Endothel-freigesetzten hyperpolarisierenden Faktor (EDHF), welcher die vasodilatierenden Effekte von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin unterstützt (Chauhan 2003). Nachfolgende in vitro und in vivo Studien zeigten, dass endotheliales CNP in Folge von Gefäßverletzungen-die durch Schubstress-induzierte Thrombenbildung und die Expression pro-inflammatorischer Faktoren, reduzieren kann (Qian 2002, Scotland 2005). Auch in neuesten Studien von Day et al. wurde gezeigt, dass CNP eine Interferon-induzierte hochregulierte Genexpression pro-inflammatorischer Faktoren in humanen Endothelzellen über cGMP hemmen konnte (Day 2018). Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem Interleukin-6 (IL-6), der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und das Zytokin C X C ligand-1 (Cxcl-1) (Chun 1997, Bukulmez 2014). Diese Zytokine sind an Entzündungsprozessen in diversen Zellen und Organen beteiligt. IL-6 kann von Kardiomyozyten sezerniert werden und über das Glykoprotein 130 (gp130) einen Signalweg aktivieren, der zur Entstehung einer Herzhypertrophie in Mäusen beiträgt (Hirota

1995). Es wurde auch gezeigt, dass eine IL-6 Infusion in Ratten zu einer konzentrischen Herzhypertrophie und einem erhöhten Blutdruck führte (Melendez 2010). In der Studie von Zhao et al. wurden Mäuse mit einer globalen Deletion von IL-6 einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) unterzogen. Die IL-6 defizienten Mäuse zeigten eine verringerte linksventrikuläre Herzhypertrophie, weniger Fibrose und Apoptose im Vergleich zum Wildtyp-Tier. Zudem war die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) an Tyrosin 705 in den IL-6 Knockout-Mäusen signifikant im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verringert (Zhao 2016). Da die Phosphorylierung von STAT3 eng mit der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) verbunden ist, aufgrund nachgeschalteter Apoptose-Signalwege, wäre dies eine mögliche Erklärung für die protektive Wirkung einer IL-6 Deletion. Allerdings gibt es andere Studien, die den IL-6 Signalweg nicht als ausschlaggebend für die Entstehung einer kardialen Hypertrophie ansehen (Kaminski 2007). Auch die Bedeutung der STAT3-Phosphorylierung wird kontrovers diskutiert. Stephanou et al. postuliert, dass der STAT3-Signalweg protektive Effekte nach Ischämie-Reperfusion im Herzen zeigt. STAT3 kann über die Janus Kinasen (JAK's) an verschiedene Phosphorylierungsstellen phosphoryliert und damit aktiviert werden. Mäuse mit einer systemischen Deletion von STAT3 reagieren anfälliger gegenüber der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und zeigen eine erhöhte Apoptoserate gegenüber Kardiomyozyten (Hilfiker-Kleiner 2004, Jacoby 2003). Diese Studien deuten darauf hin, dass STAT3 als anti-apoptotischer Signalfaktor schützende Eigenschaften auf das Herz-Remodeling haben könnte (Mao 2008, Stephanou 2004).

Die hier gezeigten Studien deuten auf eine schützende Rolle von CNP bei vaskulären Entzündungsprozessen und Herzhypertrophie hin. All diese Erkenntnisse lassen jedoch keine eindeutige Interpretation der GC-B/cGMP-vermittelten Wirkung von CNP auf Herzhypertrophie, Fibrose oder Entzündung zu. Die kardialen Effekte einer exogenen CNP-Gabe könnten auch durch systemische, extrakardiale Effekte des Peptids hervorgerufen werden. Auch ließ sich in diesen Studien nicht unterscheiden, welcher Rezeptor (GC-B oder NPR-C) die Effekte vermittelt. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit ein neues genetisches Mausmodell mit einer Zell-spezifischen Deletion von GC-B in Kardiomyozyten generiert, um die (patho) physiologische Bedeutung des CNP/GC-B-Systems im Herzen näher zu untersuchen.

1.7 Zielsetzungen der Arbeit

Die bisher zitierten Studien mit synthetischem CNP zeigten, dass das CNP/GC-B-System nicht nur eine wichtige Komponente in der Knochenbildung darstellt, sondern sogar in der Lage ist, über den GC-B Rezeptor protektive kardiovaskuläre und anti-fibrotische Effekte zu vermitteln. Allerdings wurden in

einigen der beschriebenen Studien CNP-Dosierungen und Konzentrationen verwendet, die weit über den Konzentrationen von endogenem CNP im Blutplasma lagen. Um die Bedeutung des CNP/GC-B-Systems *in vivo*, also im Gesamtorganismus besser verstehen zu können, wäre eine gezielte Deletion des kodierenden Gens in Mäusen eine mögliche Herangehensweise. Jedoch zeigen Mäuse mit einer globalen Deletion von CNP oder dem GC-B Rezeptor, wie zuvor beschrieben, einen ausgeprägten Zwergwuchs und eine hohe Mortalität, so dass Untersuchungen zu der kardiovaskulären Bedeutung von CNP in diesen Tieren nicht möglich sind. Um die kardialen Effekte von CNP dennoch weiter zu charakterisieren, sollen in dieser Dissertationsarbeit zwei übergeordnete Fragen beantwortet werden:

- 1) Wie wirkt exogenes, synthetisches CNP bei einer durch experimentell induzierten hypertensiven Herzerkrankung? Für diese Fragestellung erhielten *C57Bl/6* Mäuse CNP über osmotische Minipumpen. Als tier-experimentelles Modell einer hypertensiven Herzerkrankung wurde das weltweit anerkannte Modell der transversen Aortenkonstriktion (TAC) für 2 Wochen angewandt.

- 2) Welche physiologische Bedeutung hat das endogene Hormon CNP im Herzen? Der Fokus liegt hier auf den Effekten von lokal gebildetem CNP, die durch das CNP/GC-B/cGMP-System in Kardiomyozyten vermittelt werden. Dazu wurde ein neues genetisches Mausmodell mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion der Guanylylcyclase B (GC-B) generiert (CM GC-B KO Mäuse). Um den Phänotyp der Tiere (CM GC-B KO) unter basalen, physiologischen Bedingungen und nach experimentell induzierter Herzhypertrophie charakterisieren zu können, wurden Altersstudien bis zu 1 Jahr und das Modell der TAC für 3 und 14 Tage angewandt.

2 Material und Methoden

2.1 Messungen des arteriellen Blutdrucks (tail cuff)

Der arterielle Blutdruck wurde mittels nicht invasiver Schwanzplethysmographie (tail cuff) bestimmt. Die Versuchstiere wurden vor Beginn der Messung an die Apparatur gewöhnt. Die Versuchsanordnung bestand aus einer Röhre und einer dazugehörigen Wärmevorrichtung, in der das Versuchstier bei konstanter Temperatur fixiert werden konnte. Anschließend wurde die Blutdruckmanschette um den Schwanz der Maus gelegt und der Blutdruck an fünf aufeinanderfolgenden Tagen für maximal 15 min jeweils zur gleichen Tageszeit gemessen. Die Versuchsdurchführung und die Dokumentation erfolgte mit dem Softron Indirect Blood Pressure Meter BP-98A (Softron Co. Ltd.). Aufgezeichnet wurden der systolische, der mittlere und diastolische Blutdruck, sowie die Herzfrequenz.

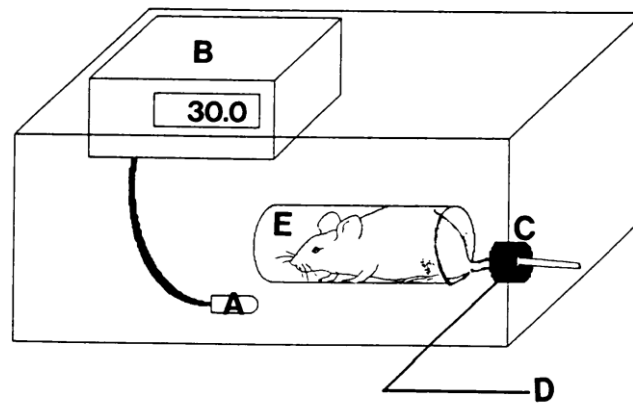


Abb. 8 Versuchsaufbau zur arteriellen Blutdruckmessung an wachen Mäusen (Kuwahara et al. 1991)
 (A)Temperatursensor (B) Heizelement (C) Schwanzmanschette (D) Kabelverbindung zu Computer (E) Stofftasche

2.2 Euthanasie und Organentnahme (Nekropsie)

Nach Beendigung des jeweiligen Behandlungsintervalls (Transverse Aortenkonstriktion über 3 und 14 Tage) erfolgte für alle Untersuchungsgruppen eine Nekropsie mit Organentnahme. Vor der Inhalationsnarkose wurde von jedem Tier das Körpergewicht (KGW) bestimmt. Anschließend wurden die Mäuse mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (4 %) betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Die entnommenen Organe wurden auf einer Feinwaage (TE214S, Sartorius) gewogen und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Herzgewebe wurde in rechten und linken Ventrikel geteilt und jeweils ein kleines Stückchen für histologische Folgeuntersuchungen für 24 h in 4 %iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Die Normalisierung von Herz und linkem Ventrikel, wie auch von allen anderen Organen auf das Körpergewicht lieferte vergleichbare Daten.

2.3 Histologische und morphometrische Untersuchungen an Herzschnitten

Zur Erfassung der Durchmesser sowie der Gesamtflächen von Kardiomyozyten wurden Herzbiopsien des linken und rechten Ventrikels in Formalin (4 %) fixiert. Die anschließenden Paraffineinbettungen, Schnitte und Färbungen wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hideo Baba (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt. Für die Erfassung der Kardiomyozytendurchmesser sowie der Gesamtflächen wurden die Gewebeschnitte mit der Periodic Acid-Schiff Reaktion (PAS) gefärbt. Das Färbeergebnis umfasst eine Magenta-rote bis pinke Färbung neutraler Mucopolysaccharide (Zellmembranen) und blauviolette Färbung der Zellkerne. Mithilfe eines Farbkameraaufsatzes (SC30 Olympus) und eines Lichtmikroskops (Olympus CK X41) wurden von den Gewebeschnitten bei zwanzigfacher Vergrößerung Bilder aufgenommen und der Durchmesser von ungefähr 50 Zellen pro linkem Ventrikel auf der Höhe des Zellkerns bestimmt. Der rechte Ventrikel wurde nicht analysiert. Die Fläche von etwa 50 Kardiomyozyten wurde mithilfe eines Markierungs-Tools der Software CellSens Entry 1.12 (Olympus Corporation) bestimmt, wobei hierfür die Kardiomyozyten mit dem Markierungs-Tool umrandet wurden und der errechnete Wert die Fläche in μm^2 angibt.

Um die Länge der Kardiomyozyten zu bestimmen, wurden Herzgewebeschnitte mit dem Antikörper Pan-Cadherin (Cell Signaling, #4068) inkubiert. Diese immunhistochemische Färbemethode erlaubt es anhand der Z-Scheiben (werden hier bräunlich angefärbt) die Länge der einzelnen Kardiomyozyten mit Hilfe eines Markierungs-Tools der Software CellSens Entry 1.12 (Olympus Corporation) zu bestimmen. Dies wurde dankenswerterweise von Frau Lisa Krebs (technische Assistentin, AG Kuhn, Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt.

Um den prozentualen Anteil der Kollagenfaser-Bildung zu ermitteln, wurden Piko-Siriusrot gefärbte Schnitte morphometriert. Piko-Siriusrot ist eine histologische Färbung, bei der die Muskelgewebe und das Zytoplasma gelb und die Kollagenfasern in Rot dargestellt werden. Die Bestimmung des Kollagenanteils der Siriusrot-gefärbten Herzgewebeschnitte erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Vogel 2015). Dafür wurde die Eigenfluoreszenz des Kollagens und lebender Zellen genutzt. Das rötlich gefärbte Kollagen der Gewebeschnitte zeigt eine rote Fluoreszenz, und lebende Zellen zeigen eine grüne Autofluoreszenz. Beide Emissionsmuster können mit Standardfiltern und einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Um die relative Fläche des Gehalts an reinem Kollagen im Herzgewebe zu bestimmen, wurden hier digitale Bildaddition und -subtraktion angewandt. Für die Bestimmung der Gesamtfläche wurden die beiden Emissionssignale der Kollagenfläche (rot) und der Fläche von lebenden Zellen (grün) addiert. Anschließend wurde mittels Subtraktion der reine Kollagenanteil festgelegt, indem die Fläche von lebenden Zellen von der Kollagenfläche abgezogen wurde. Der Quotient aus reinem Kollagen und der Gesamtfläche wurde mit 100 multipliziert und so der prozentuale Anteil von reinem Kollagen pro Bild ermittelt.

2.4 Western Blot Analysen

2.4.1 Proteinextraktionen aus linksventrikulärem Gewebe und isolierten Kardiomyozyten

Für die Expressionsanalyse von Proteinen aus Herzmuskelzellen wurden die Organe den Mäusen unter tiefer Vollnarkose (Urethan) entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe des linken Ventrikels wurde anschließend mittels einer Metallkugel und 200 µl Lysis-Puffer (10 mM NaHCO₃, 20 % SDS, komplettiert mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren (cOmplete Phosphatase und Protease Hemmstoffe, Roche Diagnostics GmbH) in vorgekühlten (-196 °C) Teflongefäßen für 1 min im Mikro-Dismembrator U (Sartorius GmbH, Göttingen) bei 1800 rpm homogenisiert. Das so entstandene Homogenat wurde aus den Teflon-Gefäßen geschabt und in einem vorgekühlten Eppendorf-Cup (4 °C) überführt, nochmals mit 100 µl Homogenisierungspuffer versetzt und kurz gevortext. Die Lysate wurden anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Homogenat alle 5 min durch Vortexen gemischt. Schlecht gelöste Gewebe wurden außerdem mehrmals durch eine Spritzenkanüle geschert. Nach der Zentrifugation (13.000 g, 15 min, Raumtemperatur (RT)) wurde der Überstand (= Herzlysat) abgenommen, à 25 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Proteinextraktion aus isolierten kultivierten Kardiomyozyten (die Isolierung wird in Abschnitt 2.7.1 beschrieben) wurden diese zunächst in Kulturmedium (10,78 g/l MEM/HANKS, 0,88 g/l NaHCO₃, 50 ml/l fetales Kälberserum (FCS), 20 ml/l 2,3-Butanedione monoxime (BDM), 10 ml/l Penicillin/Streptomycin) aufgenommen, in 3,5 cm Zellkulturschalen ausplattiert und für 4 h bei 37 °C inkubiert. BDM als nicht-kompetitiver Myosin Inhibitor wurde dem Kulturmedium zugegeben um weiteres Kontrahieren der Kardiomyozyten zu vermeiden (Biermann 1998). Zum besseren Anhaften der Kardiomyozyten wurden die Zellkulturschalen vorher für mindestens eine Stunde bei 37 °C mit Laminin (50 µg/ml, Roche) beschichtet. Bevor die in Kulturmedium aufgenommen Kardiomyozyten in die Zellkulturschalen ausplattiert werden, wurde das Laminin abgesaugt, die Schalen 2 x mit sterilem 1 x PBS gewaschen und die Kardiomyozyten verteilt. Die Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte mit synthetischem C-Typ natriuretischen Peptid (CNP, Bachem) für 15 min bei 37 °C in einer Konzentration von 10, 100 und 1000 nM. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 80 µl Lysis-Puffer (siehe oben) versetzt. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, in ein Eppendorf-Cup überführt und für 20 min bei Raumtemperatur lysiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Homogenat alle 5 min durch Vortexen gemischt. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (13.000 g, 3 min, RT), der Überstand (= Lysat) in neue Eppendorf-Cups überführt und bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Gewebe- und Zelllysaten erfolgte mittels des Bicinchoninsäure-Assays. Diese Methode beruht darauf, dass Proteine im alkalischen Medium zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduzieren (Biuret-Methode). Die Reduktion wurde mit einem violetten Farbumschlag angezeigt und dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch (Wallac Victor² Multi-Label Counter) gemessen. Dafür wurden die Proben, sowie Standards in Doppelbestimmungen mit dem BCA Reagenz A (Interchim Montlucon FR) und einer 4 %igen Kupfersulfat-Lösung im Verhältnis 50:1 versetzt. Die Standardreihe aus bekannter BSA-Lösung wurde bei jeder Messung mitgeführt, sowie Wasser und der verwendete Lysispuffer als Leerwert. Die anschließende 20-minütige Inkubation erfolgte bei 37 °C. Der Proteingehalt der Proben wurde auf Basis einer Eichkurve anhand der verwendeten Proteinstandards ermittelt.

2.4.3 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse in einem elektrischen Feld erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dafür wurde ein 15 %iges Trenngel zwischen zwei Glasplatten einer Elektrophorese-Apparatur (PerfectBlue® Doppel-Gelsystem Twin L, Peqlab Biotechnologie GmbH) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde der Isopropanol dekantiert und anschließend ein 4 %iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Zur Ausformung der Probenladetaschen wurde vor Beginn der Polymerisation ein Kunststoffkamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach dem vollständigen Polymerisieren wurde der Probenkamm entfernt und die ausgebildeten Taschen mit Puffer (25 mM Trizma® base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) gespült.

Tabelle 1 Zusammensetzung des Trenngels für die SDS-PAGE

Trenngel	10 %	15 %
Zielproteine	pSTAT3, tSTAT3, NOX4	pPLB, tPLB
1,5 M Trizma® base (pH 8,8)	4,4 ml	4,4 ml
30 % Acrylamid	5,8 ml	8,75 ml
Aqua dest.	6,9 ml	4,03 ml
10 % SDS	0,175 ml	0,175 ml
TEMED	0,007 ml	0,007 ml
10 % APS	0,175 ml	0,175 ml

Tabelle 2 Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE

Sammelgel	4 %
1,0 M Trizma® base (pH 6,8)	1,25 ml
30 % Acrylamid	1,7 ml
Aqua dest.	6,8 ml
10 % SDS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml
10 % APS	0,1 ml

Zum Aufbrechen der Disulfidbrücken wurden die Herzgewebelysate mit 3 x Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C für NADPH Oxidase 4 (NOX4), phosphoryliertes signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) und totales signal transducer and activator of transcription 3 (tSTAT3) inkubiert. Für phosphoryliertes Phospholamban (pPLB) und totales Phospholamban (tPLB) wurden die Proben für 15 min bei 37 °C erwärmt.

Tabelle 3 Zusammensetzung des 3 x Laemmli-Puffers in 100 ml Bidest.

Puffer-Komponente	Menge	Konzentration
Tris-HCl (pH 6,8)	2,4 g	200 mM
SDS	6 g	6 % (w/v)
Glycerol	15 ml	15 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 ml	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 g	0,01 % (w/v)

Anschließend wurden ca. 15 - 30 µg Protein der Herzgewebelysate in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde bei jedem Gel ein Protein Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher) verwendet.

Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte in Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 100 Volt für 20 min und anschließend bei 130 Volt für eine weitere Stunde.

Direkt im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine im Semi-dry Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran bei 238 mA für 60 min (2 mA/cm²) geblottet (Transferpuffer: 25 mM Trizma® base, 20 % (v/v) Methanol, 192 mM Glycin, Blotkammer: Fastblot B44, Whatman Biometra). Zur qualitativen Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau-S-Reagenz (0,2 % (w/v) Ponceau S, 10 % (v/v) Trichloressigsäure) für 2 min gefärbt, visuell begutachtet und anschließend mit 1 x TBS-T Puffer (0,1 % TWEEN® 20 (v/v) in TBS) gewaschen. Zur Sättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde in einer 5 %igen Magermilchpulverlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-T) oder in einer 5 %igen BSA-Lösung (5 % (w/v) BSA in 1 x TBS-T) bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper wurde anschließend in entsprechender Verdünnung in 5 %iger Milchpulver- bzw. BSA-Lösung bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Am

darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1 x TBS-T bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers (Verdünnung 1:10 000 in 5 %iger Milchpulver- bzw. BSA-Lösung) für 1 h bei RT und leichtem Schwenken inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 10 min mit 1 x TBS-T erfolgte die Detektion. Hierfür wurde die Membran für 2 min in ECL-Lösung (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher) inkubiert und anschließend die resultierende Chemilumineszenz mit Hilfe einer Kamera in einer lichtisolierten Kammer (FluorChem SP Chemilumineszenz Detektion-System von Alpha Innotech) aufgenommen. Zur Auswertung wurde die Software des Detektionssystems verwendet.

2.4.4 Zielproteine und verwendete Antikörper

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Primärantikörper sowie die korrespondierenden Sekundärantikörper in der angegebenen Verdünnung eingesetzt.

Tabelle 4 Verwendete Primärantikörper

Zielprotein	Antikörper Bezeichnung	Firma Produktnr.	Wirts-Spezies	Verdünnung in TBS-T
GAPDH	anti-GAPDH	Cell Signaling #2118	Kaninchen, monoklonal	1:10 000 in 5 % BSA
NADPH Oxidase 4 (NOX4)	anti-NOX4	abcam ab133303	Kaninchen, monoklonal	1:2000 in 5 % Milch
Ser16-phosphoryliertes Phospholamban (Ser16-PLB)	anti-PLB p-Ser16	Badrilla #010-12	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5 % Milch
Total-Phospholamban (tPLB)	anti-PLB	Badrilla #010-14	Maus, monoklonal	1:5000 in 5 % BSA
Tyr705-hosphoryliertes STAT3 (pSTAT3)	anti-STAT3 p-Tyr705	Cell Signaling #9145	Kaninchen, monoklonal	1:2000 in 5 % BSA
Total- STAT3 (tSTAT3)	anti-STAT3	Cell Signaling #9139	Maus, monoklonal	1:1000 in 5 % Milch

Tabelle 5 verwendete Sekundärantikörper

Antikörper Bezeichnung	Firma / Produktnr.	Wirtsspezies	Verdünnung [TBS-T]
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), HRP-konjugiert	Dianova (111-035-144)	Ziege	1:10 000
Ziege anti-Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert	Dianova (115-035-062)	Ziege	1:10 000

2.5 Quantitative RT-PCR Analysen

2.5.1 Extraktion und Bestimmung der Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen

Für die RNA-Isolierung aus murinem linksventrikulärem Gewebe wurden circa 100 mg des Herzgewebes mit 1 ml TRIzol® (Life Technologies GmbH, Darmstadt) homogenisiert. Dafür wurde das Gewebe zunächst in 500 µl TRIzol® mittels Ultra-Turrax®-Dispergiergerät (T10 basic ULTRA-TURRAX mit S10 N-5 G Dispergierwerkzeug, IKA Labortechnik) zerkleinert und nach Zugabe von weiteren 500 µl TRIzol® für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das im TRIzol® enthaltene Guanidiniumthiocyanat inaktiviert die in den Zellen vorhandenen RNasen und Enzyme. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben durch Schütteln gemischt und anschließend bei 12.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, abgenommen und in ein neues RNase-freies Eppendorf-Cup überführt. Durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation (12.000 g, 15 min, 4 °C) wurde die RNA gefällt und einmal mit 75 %igem Ethanol gewaschen. Das nach erneuter Zentrifugation gebildete Pellet (= isolierte RNA) wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 20 µl RNase-freiem Wasser (Sigma Aldrich) aufgenommen, à 4 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die RNA-Extraktion aus isolierten murinen Kardiomyozyten wurden diese, wie bereits in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, zunächst in Kulturmedium aufgenommen, in Laminin-beschichteten 3,5 cm Zellkulturschalen ausplattiert und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS auf Eis gewaschen. Auf die Zellen wurde direkt 1 ml TRIzol® gegeben, anschließend die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst, in ein RNase-freies 2 ml Eppendorf-Cup überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Isolierung der murinen RNA erfolgte wie oben beschrieben.

Die RNA-Konzentration sowie die Reinheit der RNA wurden mit einem SimpliNano-Gerät von GE-Healthcare bestimmt. Die photometrische Messung erfolgte, indem die Absorption (A) von 2 µl Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt wurde. Zur Abschätzung einer möglichen Verunreinigung der Probe mit Proteinen wurde der Quotient $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ ermittelt. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen, um die Reinheit der Probe zu gewährleisten. Für die Leerwert-Messung wurde vor den Proben jeweils zweimal 2 µl RNase-freies Wasser aufgetragen.

2.5.2 Reverse-Transkription

Für die Analyse verschiedener Genexpressionslevel mittels qRT-PCR wurde zunächst die RNA in cDNA umgeschrieben. Bei der cDNA-Synthese wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA (Template) komplementäre DNA (cDNA) generiert. Die Synthese der cDNA erfolgte hier mit dem

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche (Katalog Nr.: 04897030001). Dafür wurde die nach 2.5.1 isolierte RNA auf eine Verdünnung von 1 µg/µl mit RNase-freiem Wasser eingestellt und anschließend in cDNA umgeschrieben (immer 1 µg RNA). Die so gewonnenen cDNA's wurden anschließend aliquotiert und bei -20 °C für die weitere Analyse mittels qRT-PCR aufbewahrt.

Tabelle 6 Reaktionsansatz gemäß Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit

Komponente	Ausgangskonzentration	Konzentration pro PCR-Ansatz
RNA	1 µg	1 µg
H ₂ O, PCR-grade		
Anchored oligo-(dT) ₁₈ Primer	50 pmol/µl	2,5 µM
Reverse Transcriptase Reaction Buffer	5 x konzentriert	1 x konzentriert
Protector RNase Inhibitor	40 U/µl	20 U
dNTP Mix	10 mM	je 1 mM
Reverse Transcriptase	20 U/µl	10 U
Gesamtvolumen		20

Tabelle 7 PCR Bedingungen für die cDNA-Synthese

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Reverse Transkription	55	30	1
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	85	5	1
Kühlung	4	∞	

2.5.3 Untersuchung der kardialen Expression verschiedener Zielgene mittels qRT-PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) Methode bezeichnet ein Verfahren, welches die Konzentration eines PCR-Produkts in Echtzeit bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung der Ausgangsmenge an eingesetzter mRNA wurden verschiedene DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenz-markierte Sonden eingesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet unspezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt. Dabei nimmt die Menge der PCR-Produkte (Ziel-DNA) proportional zur Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus zu. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität. SYBR Green I bindet nicht nur an hochmolekulare doppelsträngige DNA, sondern auch an kurzkettige DNA-Duplices (Primerdimere). Um die Spezifität der Reaktion zu untersuchen, führt man nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durch. Hierbei wird die DNA durch eine kontinuierliche Erhöhung der

Temperatur von 50 °C auf 95 °C aufgeschmolzen. Bei einer für das PCR-Produkt spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. Die damit verbundene Abnahme der Fluoreszenz wird photometrisch detektiert. Somit können Aussagen über die Struktur und indirekt über die Spezifität der DNA-Moleküle gemacht werden, da doppelsträngige DNA einen höheren Schmelzpunkt hat, als unspezifische Primerdimere.

Eine weitere, spezifischere Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren besteht in der Verwendung Fluoreszenz-markierter Sonden. Dabei handelt es sich um sequenzspezifisch zweifach-markierte Oligonukleotide, welche am 3'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FAM) und am 5'-Ende mit einem Quencher-Molekül markiert sind. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird bei intakten Sonden durch das Quencher-Molekül durch FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Sobald die Polymerase auf Grund ihrer 5' - 3' - Exonukleaseaktivität das 5' - Ende der Sonde während der PCR-Amplifikation hydrolysiert, entfernen sich Quencher und Reporter-Fluoreszenzfarbstoff räumlich voneinander. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird nun nicht mehr unterdrückt und kann dadurch detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal steigt direkt proportional zur zunehmenden Menge des PCR-Produktes. Trägt man die Fluoreszenz-Intensität gegen die Anzahl der PCR-Zyklen in einem Diagramm auf, erhält man den dreiphasigen Kurvenverlauf (Anfangsphase, exponentielle Wachstumsphase, Plateauphase) der PCR-Produktbildung. Der für die Quantifizierung ausschlaggebende Fluoreszenzschwellenwert ist der sog. „Threshold Cycle“ (C_T -Wert). Der C_T -Wert ist definiert als der PCR-Zyklus, bei dem die Reporter-Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Diese Schwelle wird von der Gerätesoftware vorgegeben und liegt innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase (Log-Phase) der PCR-Reaktion. Da der C_T -Wert indirekt proportional zur initialen Menge an Ziel-DNA ist, bedeutet das, je größer die Ausgangsmenge an cDNA in der Probe ist, desto früher wird der Schwellenwert überschritten. Durch die unterschiedlichen C_T -Werte der einzelnen Proben lassen sich so vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA machen. Parallel dazu werden in jedem PCR-Lauf Proben mit bekannter RNA-Menge bzw. -Verdünnung zwecks Generierung einer Standardkurve amplifiziert. Auf Basis dieser Bezugswerte ist es möglich, anhand eines bestimmten C_T -Werts auf die entsprechende Templatekonzentration zu schließen. Zur relativen Quantifizierung wurde das konstant exprimierte, nicht regulierte Referenzgen (S12) mitgemessen. Die verschiedenen mRNA-Expressionslevel der in Tabelle 8 aufgeführten Zielgene wurden in dieser Arbeit mittels qRT-PCR im LightCycler® LC-96 von der Firma Roche analysiert. Dafür wurden 20 µl-Reaktionsansätze bestehend aus 5 µl verdünnter cDNA und 15 µl Mastermix (entweder mit FastStart Essential Probes Master oder FastStart Essential Green Master (BNP, S12) und einer finalen Primerkonzentration von 1 µM), auf 96 well-Platten (LightCycler® 480 Multiwell Plates 96, Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetragen. Die Reaktionsansätze für die Standardkurve, die Proben und die

Negativkontrollen wurden jeweils als Doppelbestimmung angesetzt. Die mit der Gerätesoftware erhobenen Daten wurden mit Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) ausgewertet.

Die entsprechenden Verdünnungen der eingesetzten cDNA pro PCR-Lauf, der zu analysierenden Targets, sowie die dazugehörigen Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Sonden sind in Tabelle 8 beschrieben.

Tabelle 8 Übersicht der verwendeten Zielgene zur cDNA Amplifizierung

Target	Primersequenz 5' – 3' forward	Primersequenz 5' – 3' reverse	Sonde	cDNA Verd.	Farbstoff
BNP	AAG CTG CTG GAG CTG ATA AGA	GTT ACA GCC AAA CGA CTG AC	-	1:50	SYBR Green I
CNP	AG CGG TCT GGG ATG TTA GTG	CGT TGG AGG TGT TTC CAG AT	75	1:1,67	FAM
Col1a1	CAT GTT CAG CTT TGT GGA CCT	GCA GCT GAC TTC AGG GAT GT	15	1:10	FAM
CTGF	CCA CCC GAG TTA CCA ATG AC	TAG GTG TCC GGA TGC ACT TT	85	1:40	FAM
Cxcl1	AGA AGG GTG TTG TGC GAA AA	ACT GAC ATT CTT TTC AAG ACA TAC AAA	75	1:5	FAM
IL-6	TGA TGG ATG CTA CCA AAC TGG	TTC ATG TAC TCC AGG TAG CTA TGG	6	1:5	FAM
NOX4	TGG GCC TAG GAT TGT GTT TA	CTG CTA GGG ACC TTC TGT GA	-	1:5	SYBR Green I
S12	GAA GCT GCC AAG GCC TTA GA	AAC TGC AAC CAA CCA CCT TC	-	1:50	SYBR Green I

Die verwendeten Sonden und Farbstoffe mit den jeweils dazugehörigen Komponenten pro PCR-Ansatz wurden im Folgenden: Tabelle 9 bis Tabelle 11 angegeben eingesetzt.

Tabelle 9 qRT-PCR Ansatz mit UPL Sonden für Col1a1

Komponente	Konzentration pro Ansatz	Volumen pro Ansatz [µl]
(verdünnte) cDNA		5
Sonde	0,2 µM	0,4
Primer forward (100 µM)	1 µM	0,2
Primer reverse (100 µM)	1 µM	0,2
FastStart Essential DNA Probes Master, 2 x	1 x konzentriert	10
H ₂ O, PCR-grade		4,2

Tabelle 10 qRT-PCR Ansatz mit RealTime Ready Assay für CTGF, Cxcl1, IL-6

Komponente	Konzentration pro Ansatz	Volumen pro Ansatz [μ l]
(verdünnte) cDNA		5
Realtime Ready Assay, 20 x	1 x konzentriert	1
FastStart Essential DNA Probes Master, 2 x	1 x konzentriert	10
H ₂ O, PCR-grade		4

Tabelle 11 qRT-PCR Ansatz mit SYBR Green I für BNP, NOX4 und S12

Komponente	Konzentration pro Ansatz	Volumen pro Ansatz [μ l]
(verdünnte) cDNA		5
Primer forward (100 μ M)	1 μ M	0,2
Primer reverse (100 μ M)	1 μ M	0,2
FastStart Essential DNA Green Master, 2 x	1 x konzentriert	10
H ₂ O, PCR-grade		4,6

Die jeweiligen PCR Bedingungen für die qRT-PCRs mit oder ohne Sonden werden in der folgenden Tabelle 12 beziehungsweise Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 12 PCR Bedingungen für qRT-PCRs mit Sonden (FAM)

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Prä-Inkubation	95	10 min	1
Denaturierung	95	10 sec	55
Annealing	60	30 sec	
Elongation	72	1 sec	
Kühlung	40	30 sec	1
Cool Down	4	∞	

Tabelle 13 PCR Bedingungen für qRT-PCRs ohne Sonde (SYBR Green I)

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Prä-Inkubation	95	10 min	1
Denaturierung	95	10 sec	55
Annealing	60	10 sec	
Elongation	72	10 sec	
Schmelzkurve	95	10 sec	1
	65	1 min	
	97	1 sec	
Kühlung	40	30 sec	1
Cool Down	4	∞	

2.6 Experimentelles Modell der hypertensiven Herzerkrankung

2.6.1 Modell der transversalen Aortenkonstriktion an der Maus

Die nachfolgenden beschriebenen Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen: 55.2 2432-2-135). Für die Untersuchung der Wirkung von synthetischem CNP auf eine durch transverse Aortenkonstriktion (TAC)-induzierte Herzhypertrophie und -fibrose, wurden circa 8 Wochen alte männliche Versuchstiere mit einem *C57Bl/6* Hintergrund der Firma Charles River verwendet. Das Modell der TAC wurde auch an dem hier generierten genetischen Mausmodell verwendet. Unter Isofluran-Narkose wurde eine Ligation der Aorta ascendens vorgenommen, um so die Druck-Nachlast auf den linken Ventrikel zu erhöhen. Zur Untersuchung eines möglichen protektiven Effekts von CNP, wurde den Mäusen direkt nach erfolgter OP synthetisches CNP (50 ng/kg/min) für 14 Tage mittels osmotischer Minipumpen appliziert (Modell 1002, Fa. ALZET, Charles River). Die Pumpen wurden von Frau Katharina Völker (technische Assistentin, AG Kuhn, Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) implantiert. Den Kontrolltieren wurde analog der Thorax eröffnet und ohne Anlegen einer Ligation wieder geschlossen, sowie NaCl verabreicht.

2.6.2 Implantation osmotischer Minipumpen

Für die korrekte Implantation der Pumpen, wurde diese mit der entsprechenden Menge an CNP (0,5 mg) in 1,26 ml physiologischer Kochsalzlösung (90 mg NaCl in 10 ml destillierten Wasser) unter der Sterilbank befüllt. Da die Berechnung der CNP-Menge vom Abgabevolumen der Pumpe und vom Körpergewicht der Mäuse abhängig war, wurden die Tiere vorher gewogen. Der verwendete Pumpentyp hatte ein Füllvolumen von 100 µl und eine kontinuierliche Abgaberate von 0,2 µl pro Stunde. Für die chirurgische Implantation der Minipumpen wurde das Versuchstier über eine Inhalationsnarkose mit 2 %igen Isofluran in einer Isoflurananlage (ViP3000 Isoflurane, Matrix - Provet, Schweiz) betäubt. Anschließend wurde das Tier mit dem Bauch nach unten auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert. Der zu operierende Bereich am seitlichen Rücken wurde rasiert, desinfiziert und mit einem sterilen Skalpell durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Danach wurde mit einer sterilen Schere eine subkutane Tasche präpariert. In diese Tasche wurde die präparierte Minipumpe geschoben und der Hautschnitt mit einem Faden (Prolene 7-0 Ethicon, Norderstedt) wieder geschlossen. Die Nahtstelle wurde mit Bepanthen® - Creme versorgt und das Tier anschließend zur besseren Beobachtung in einen Einzelkäfig gesetzt. Die Wundheilung und der Sitz der Pumpe wurden mehrmals täglich kontrolliert.

2.6.3 Durchführung der transversen Aortenkonstriktion (TAC)

Die operative transverse Aortenkonstriktion wurde dankenswerterweise von Herrn Marco Abeßer (technischer Assistent, AG Schuh, Institut für Physiologie I, Universität Würzburg) an 8 Wochen alten, 19 – 25 g schweren Versuchstieren, wie in (Frantz 2013) beschrieben, durchgeführt.

Dafür wurden die Versuchstiere mittels Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert. Nach Fixierung der Maus in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (37 °C) wurde der Thorax rasiert. Eine Endotrachealkanüle wurde unter laryngoskopischer Kontrolle eingeführt und an ein volumenkontrolliertes Beatmungsgerät (Atemzugvolumen 0,250 – 0,300 ml, Frequenz 120/min, Harvard Apparatus) angeschlossen. Das weitere Vorgehen erfolgte unter einem Operationsmikroskop (Olympus, Wetzlar). Nach einem Hautschnitt über dem zweiten Interkostalraum links wurde der Aortenbogen und die aortalen Gefäßabgänge freigelegt. Die Konstriktion der Aorta erfolgte zwischen den beiden Carotiden, Carotis dextra und Carotis sinistra. Hierfür wurde eine 26 G Nadel (Durchmesser 0,45 mm) auf der Aorta platziert und eine Ligatur um die Nadel sowie das darunter liegende Gefäß mittels 6.0 Prolene Seidenfaden gesetzt. Danach wurde die Nadel entfernt (Rockman et al. 1991). Der Durchmesser der stenosierten Aorta bei allen operierten Tieren entsprach somit in etwa dem Durchmesser der Nadel. Nach erfolgter Aortenkonstriktion wurde der Thorax wieder verschlossen. Kurz vor Beendigung der Narkose wurde den Tieren das Analgetikum Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®) in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht (KGW) subkutan verabreicht. Nach Einsetzen der Spontanatmung wurde die Trachealkanüle entfernt und die Mäuse zur besseren Beobachtung in einen Einzelkäfig gesetzt und bis zum vollständigen Abklingen der Narkose überwacht. Zur Analgesie wurde täglich Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®) über weitere 3 Tage post-operativ appliziert.

Drei bzw. 14-Tage nach TAC wurden die Tiere narkotisiert (2 % Isofluran) und die Parameter der kontraktile Herzfunktion mittels eines linksventrikulären Druck/Volumen-Katheters erfasst. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls von Herrn Marco Abeßer durchgeführt.

2.7 Etablierung und Haltung eines neuen genetischen Mausmodells mit Kardiomyozyten-spezifischer Deletion des GC-B-Rezeptors (CM GC-B KO)

2.7.1 Generierung des CM GC-B KO Mausmodells

Zur Charakterisierung der Rolle des endogenen kardialen Hormones CNP und dessen Signalwege in Kardiomyozyten wurde im Rahmen dieser Dissertationsarbeit ein neues genetisches Mausmodell mittels des *Cre/loxP*-Rekombinations-Systems generiert. In der Arbeitsgruppe (AG) von Dr. Boris Skryabin (Institut für Experimentelle Pathologie der Universität Münster) wurden in Zusammenarbeit mit AG Kuhn Mäuse generiert, in denen das Exon 7 im Gen für GC-B (*Npr2*) gefloxt ist: GC-B^{flox/flox} (Spiranec 2018). Dafür wurden *lox-P* DNA-Sequenzen, bestehend aus 34 Basenpaaren, in das murine Gen für GC-B im Exon 7 mittels homologer Rekombination inseriert. Für meine nachfolgenden Untersuchungen habe ich diese Tiere (GC-B^{flox/flox}) mit heterozygoten α MHC-Cre Weibchen verpaart. Die transgenen α MHC-Cre Mäuse, bereitgestellt vom Zentrum für experimentelle molekulare Medizin des Universitätsklinikums Würzburg (AG Prof. Dr. Stefan Frantz), exprimieren unter Kontrolle des α MHC-Promotors die aktive Cre-Rekombinase ausschließlich in Kardiomyozyten (Frantz 2013). Das aktive Enzym Cre-Rekombinase erkennt und bindet die *lox-P* sites und schneidet die von diesen flankierte DNA-Sequenz heraus (Exzision). Dieser Verlust von Exon 7 sollte zur Deletion des GC-B Gens in Kardiomyozyten führen. Die GC-B Translation/Transkription in allen anderen Zellen soll erhalten bleiben. Wie im Ergebnisteil geschildert, zeigten meine Versuche, dass mit dieser Strategie Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des GC-B Rezeptors (CM GC-B KO) generiert wurden.

2.7.2 Genotypisierung des CM GC-B KO Mausmodells

Zum Nachweis von transgenem α MHC-Cre und GC-B^{flox/flox} wurden den Mäusen im Alter von 3 Wochen die Schwanzspitzen amputiert (ca. 5 mm Länge) und mit je 500 μ l Verdau-Puffer (100 mM Trizma[®] base, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % (w/v) SDS in RNase-freiem Wasser) und 5 μ l Proteinase K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich) für 3 - 4 Stunden bei 55 °C verdaut. Nach anschließender Zugabe von 500 μ l Phenol-Chloroform Gemisch (im Verhältnis 1:1) wurden die Proben gevortext und zentrifugiert (13.000 g für 10 min, RT). Die entstandene obere Phase wurde abgenommen und die darin befindliche genomische DNA mit 500 μ l Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 g für 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen und die pelletierte DNA über Nacht (16 h) in geöffneten Eppendorf-Cups unter dem Abzug getrocknet. Am nächsten Tag wurde das getrocknete Pellet in 50 – 100 μ l TE-Puffer (10 nM Trizma[®] base, 200 mM EDTA in RNase-freiem Wasser) resuspendiert und die DNA-Konzentration am SimpliNano-Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt.

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Die spezifischen Primer zur Bestimmung der α MHC-Cre- bzw. GC-B^{flox/flox}-Genotypen wurden zur Amplifizierung pro Ansatz in einer Konzentration von jeweils 30 μ M eingesetzt.

Tabelle 14 Auflistung der verwendeten Primer für die PCR-Ansätze

PCR	Primerpaare	Primersequenz 5' - 3'	Produkt-Größe [bp]
α MHC-Cre	Cre 800	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG	Cre-Bande (400)
	Cre 1200	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC	
GC-B ^{flox/flox}	GC-B d1	GGACGACCCATCCTGTGATA	Flox-Bande (660)
	GC-B r3	GTTACAAACAAAAGCAAGATAAATACC	KO-Bande (159)

Die Primer-Paare wurden zusammen mit dem PCR RedMastermix (2 x) (Genaxxon Bioscience GmbH), welcher Taq DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffer enthält, in einem Volumen von 20 μ l angesetzt und gemischt. Für jede PCR wurden 200 ng genomische DNA im Thermocycler (T1 Thermocycler, Biometra) nach dem in Tabelle 15 aufgeführten Programm prozessiert.

Tabelle 15 Zusammensetzung des RedMastermix (2 x)

Bestandteil	Konzentration
Taq DNA Polymerase	2 U
dNTPs	20 nM
MgCl ₂	4 mM
Reaktionspuffer	

Tabelle 16 Genotypisierungsprogramm für α MHC-Cre-PCR

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklen
initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	30	35
Primer-Anlagerung	63	30	
Elongation	72	60	
finale Elongation	72	180	1
Kühlung	4	∞	

Tabelle 17 Genotypisierungsprogramm für Flox-PCR

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklen
initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	30	35
Primer-Anlagerung	58	30	
Elongation	72	60	
finale Elongation	72	180	1
Kühlung	4	∞	

Die erhaltenen PCR-Produkte, sowie Positiv- und Negativkontrollen wurden anschließend durch Elektrophorese in einem 1,5 %igen DNA-Agarosegel (w/v in 1 x TAE-Puffer) analysiert.

Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 Volt für 55 Minuten in 1 x TAE-Puffer. Als Größenstandard wurde der 100 bp DNA-Ladder von Thermo Fisher (Längenbestimmung zwischen 100 – 1000 bp) eingesetzt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde Nancy-520 in einer Konzentration von 0,005 % (5 µl in 100 ml 1 x TAE-Puffer) eingesetzt. Dieser doppelsträngige DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff absorbiert UV-Licht und emittiert anschließend im sichtbaren Bereich (560 nm). Zur Analyse und Dokumentation der Banden diente das Gel Logic 100 Imaging System von Kodak. Dafür wurden die Agarosegele auf dem UV-Transilluminator von unten mit UV-Licht bestrahlt und ein Bild mit einer Kamera aufgenommen.

2.7.3 Versuchstierhaltung

Die Mäuse wurden in Makrolon Typ II Käfigen im Physiologischen Institut I der Universität Würzburg entsprechend den tierschutzrechtlichen Bestimmungen gehalten. Dies wurde unter anderem durch eine konstante Temperatur von 22 °C – 26 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden, wobei die Lichtphase von 6.00 – 18.00 Uhr andauerte, gewährleistet. Die Versuche wurden mit weiblichen und männlichen adulten Mäusen im Alter von 8 Wochen durchgeführt, wobei als Kontrolltiere, wenn möglich, Geschwistertiere verwendet wurden. Die Versuchstiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Als Einstreu für die Käfige wurden Holzspäne (Altromin) benutzt. Zur Zucht von CM GC-B KO Tieren wurden zwei heterozygot gefloxt Weibchen mit aktiver Cre-Rekombinase im gebärfähigen Alter mit einem homozygoten flox/flox GC-B Männchen verpaart. Die Nachkommen wurden im Alter von 21 Tagen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Dabei wurden die Tiere entsprechend am Ohr markiert, sowie Biopsien von Schwanzspitzen entnommen und diese anhand spezifischer PCR-Analyse genotypisiert.

2.8 Isolierung und Kultivierung von murinen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

2.8.1 Isolierung von murinen Kardiomyozyten mittels Langendorff-Perfusion

Die Isolation adulter muriner Kardiomyozyten wurde nach dem AfCS Protokoll PP00000125 „Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from 1 Heart“ (Tim O'Connell 2002) durchgeführt. Für die Versuche wurden 23 – 27 g schwere und 4 - 8 Monate alte Mäuse durch intraperitoneale Gabe von Urethan (3,3 mg/g Körpergewicht, Urethan, Sigma Aldrich, gelöst in 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung) tief narkotisiert. Anschließend wurde das Herz entnommen, die Aorta auf eine Perfusionskanüle gezogen und manuell mit Kalzium-freier Perfusionslösung durchspült. Die Perfusionskanüle mit dem Herz wurde dann in einer Langendorff-Apparatur fixiert und erneut für 5 min bei 38 °C perfundiert. Nach anschließendem 8-minütigem Durchspülen mit Liberase-Verdaulösung (50 mg Liberase DH, Roche) verfärbte sich das Herzgewebe leicht milchig. Danach wurde das Herz von der Perfusionskanüle genommen, die Vorhöfe abgetrennt und die Ventrikel in 2,5 ml Liberase-Verdaulösung gegeben. Mit einer Schere wurden beide Ventrikel zusammen in kleine Stücke zerschnitten und für 30 sec mit einer 1 ml Tuberkulinspritze dispergiert. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 2,5 ml Stop I-Lösung gestoppt und die Gewebefragmente für weitere 3 min dispergiert und anschließend durch Nylongaze in ein 50 ml Falcon Tube filtriert. Das Filtrat wurde in ein neues 15 ml Falcon Tube überführt und die Zellen 10 min sedimentiert. Der Überstand mit allen anderen Herzzellen (u.a. Fibroblasten) wurde mit einer 1 ml Pipette abgenommen und in ein neues 15 ml Falcon überführt. Das verbleibende Zellpellet mit der Kardiomyozyten-Fraktion wurde in 10 ml Stop II-Lösung aufgenommen und zur Rekalzifizierung in eine Petrischale überführt. Diese wurde stufenweise durchgeführt, wobei die finalen Kalziumkonzentrationen der einzelnen Rekalzifizierungsschritte 50, 100, 200, 500 und 1000 μM betragen. Zwischen den einzelnen CaCl_2 -Zugaben (100 mM) konnten sich die Zellen für jeweils 4 min adaptieren. Die Kalziumkonzentrationen wurden schrittweise in verschiedenen Konzentrationen erhöht und zu den Zellen gegeben, um allmählich zu einen normalen zytosolischen Kalziumspiegel zurückzukehren, ohne dass das Kalzium im Zytosol überladen und depolarisiert wird (Louch et al. 2011).

Benötigte Puffer für die Isolierung von murinen Kardiomyozyten und Fibroblasten:

Tabelle 18 Zusammensetzung der Stock-Perfusionslösung 1 x in 1 l Bidest.

Komponente	Menge	finale Konzentration [mM]
NaCl	6,6 g	113
KCl	0,35 g	4,7
KH ₂ PO ₄	0,082 g	0,6
Na ₂ HPO ₄	0,085 g	0,6
MgSO ₄	0,3 g	1,2
NaHCO ₃	1,01 g	12
KHCO ₃	1,01 g	10
HEPES (1M)	10 ml	10
Taurin	3,75 g	30

Tabelle 19 Zusammensetzung der Kalzium-freien Perfusionslösung (200 ml)

Komponente	Stammlösung	Menge	finale Konzentration
Stock-Perfusionslösung 1 x	1 x	196 ml	0,98 x
2,3 – Butanedione monoxime	500 mM	4 ml	10 mM
Glucose	180,2 g/mol	200 mg	5,5 mM

Tabelle 20 Zusammensetzung der Liberase-Verdauungslösung-30 ml (in Kalzium-freier Perfusionslösung)

Komponente	Menge	finale Konzentration
Liberase	750 µl	0,25 mg/ml
Trypsin	420 µl	0,14 mg/ml
CaCl ₂ , 100 mM	3,75 µl	12,5 µM
Kalzium-freie Perfusionslösung	28,8 ml	0,96 x

Tabelle 21 Zusammensetzung der Stop I-Lösung-10 ml (in Kalzium-freier Perfusionslösung)

Komponente	Menge	finale Konzentration
Bovines Kälberserum (BCS)	1 ml	10 % (v/v)
CaCl ₂ , 100 mM	1,25 µl	12,5 µM
Kalzium-freie Perfusionslösung	9 ml	0,9 x

Tabelle 22 Zusammensetzung der Stop II-Lösung-30 ml (in Kalzium-freier Perfusionslösung)

Komponente	Menge	finale Konzentration
Bovines Kälberserum (BCS)	1,5 ml	5 % (v/v)
CaCl ₂ , 100 mM	3,75 µl	12,5 µM
Kalzium-freie Perfusionslösung	28,5 ml	0,96 x

2.8.2 Kultivierung von murinen kardialen Fibroblasten

Der in 2.8.1 gewonnene Zellüberstand (mit „nicht-Myozyten“) wurde zentrifugiert (100 g, 5 min, 4 °C), der Überstand in ein neues 15 ml Falcon überführt und erneut zentrifugiert (500 g, 10 min, 4 °C), das entstandene Zellpellet mit den Fibroblasten in 5,5 ml Fibroblastenmedium (FBM complete-Medium, Lonza) resuspendiert und auf 10 Wells einer 24-Well Platte à 500 µl verteilt. Nach maximal 3 Stunden wurde das FBM complete-Medium mit den darin enthaltenen Endothelzellen, Perizyten und Erythrozyten abgenommen, die verbliebenen adhärenen Fibroblasten dreimal mit DMEM F12-Medium gewaschen und dann 1 ml frisches FBM complete-Medium zugegeben. In diesem Medium wurden die Fibroblasten bis zur 80 %igen Konfluenz (nach 4 – 6 Tagen) kultiviert und danach für den cGMP RIA (siehe 2.9.2) inkubiert.

2.9 Versuche zu den Effekten von CNP auf den intrazellulären cGMP-Gehalt von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

2.9.1 Inkubation der kultivierten Kardiomyozyten für Untersuchungen des CNP/cGMP-Signalwegs

Nach der in 2.8.1 beschriebenen Isolierung der Kardiomyozyten wurden diese für 20 min bei RT in Ruhe sedimentiert. Es bildete sich ein lockeres Pellet aus intakten stabförmigen Kardiomyozyten. Dieses Pellet wurde in 10 ml Tyrode-Lösung aufgenommen, resuspendiert und anschließend nochmals für 20 min zur Sedimentierung gebracht. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Kardiomyozyten in 1 ml einer 0,5 mM IBMX (Sigma-Aldrich)-haltigen Tyrode-Lösung aufgenommen, in 1,5 ml Eppendorf-Cups à 200 µl verteilt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe des unspezifischen Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) wird der Abbau von cGMP gehemmt. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit 10, 100 oder 1000 nM CNP oder 100 nM ANP über 10 min bei RT. Direkt danach wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Stimulation durch die Zugabe von 450 µl eiskaltem 100 %igem Ethanol gestoppt und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen bei RT wurden die Myozytenextrakte für 15 min bei 20.000 g und 4 °C ab-zentrifugiert. Anschließend wurden 650 µl Überstand abgenommen und in einer Speedvac für 3 – 4 Stunden lyophilisiert. Das so getrocknete Extrakt wurde in 200 µl eines 50 mM Natriumacetat Puffers (pH-Wert 6,0) resuspendiert und für den anschließenden cGMP-Radioimmunoassay bei -20 °C gelagert.

Das nach der 20.000 g Zentrifugation verbleibende Pellet wurde ebenfalls getrocknet (15 min bei 37 °C) in 60 µl Lysis-Puffer (10 mM NaHCO₃, 20 % SDS) gelöst und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (siehe 2.4.2.) bei -20 °C gelagert.

Tabelle 23 Zusammensetzung Tyrode-Lösung in 1 l Bidest. (pH Wert 7,3)

Komponente	Tyrode 1 x, Menge [g]	Tyrode 5 x, Menge [g]	finale Konzentration [mM]
NaCl	8,18	40,9	140
KCl	0,43	2,16	5,8
KH ₂ PO ₄	0,068	0,34	0,5
Na ₂ HPO ₄	0,072	0,36	0,4
MgSO ₄	0,22	1,1	0,9
Glucose	0,2	1,0	11,1
HEPES	2,38	11,9	10

2.9.2 Inkubation der kultivierten kardialen Fibroblasten für Untersuchungen des CNP/cGMP-Signalwegs

Die kultivierten kardialen Fibroblasten wurden zunächst 3 Stunden in FBM-Medium (Lonza) ohne Serum äquilibriert. Danach wurde das Medium abgesaugt und pro Well 300 µl serumfreies FBM-Medium mit 0,5 mM IBMX zugegeben. Nach einer 15-minütigen Adaption im Inkubator bei 37 °C wurden die Fibroblasten mit 10, 100 oder 1000 nM CNP oder 100 nM ANP für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend gestoppt indem das Medium abgenommen und 300 µl eiskalter 70 %iger Ethanol zugegeben wurde. Anschließend wurden die 24-Well Zellkulturplatten mit den Fibroblasten über Nacht bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag der Ethanol im Wasserbad bei 56 °C für circa 1 Stunde abgedampft. Die getrockneten Fibroblastenextrakte wurden anschließend in 300 µl Natriumacetat Puffer aufgenommen und für den folgenden cGMP-Radioimmunoassay bei -20 °C gelagert.

2.9.3 Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung des intrazellulären cGMP-Gehalts

Bei diesem kompetitiven Assay konkurrieren natürliche Antigene (cGMP aus der Probe) mit einer bestimmten Menge ¹²⁵I-markierter Antigene (Tracer) um einen im Überschuss vorliegenden Antikörper, der spezifisch gegen das nachzuweisende Antigen (hier: cGMP) gerichtet ist (Thomas 1998). Nach der Probenfällung und dem Absaugen des Überstandes kann somit die im Präzipitat befindliche Tracermenge durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden und mittels Anwendung einer Standardkurve der cGMP-Gehalt einer unbekannt Probe ermittelt werden. Dafür wurden 150 µl der zu untersuchenden Probe, sowie entsprechende Standardlösungen (S1 bis S9) mit je 5 µl eines Gemisches aus Triethylamin und Essigsäureanhydrid (T:E = 2:1) acetyliert, um die Affinität des Antikörpers für cGMP zu erhöhen. Unmittelbar nach Zugabe des T/E-Gemisches wurde die Probe

gemischt und 50 µl in Polypropylenröhrchen überführt. Zu jeder Probe wurden nun 100 µl des in 0,15 %igen γ -Globulin verdünnten cGMP-Antikörpers (final 1:2500) pipettiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten im Radioaktivlabor des Physiologischen Institut I.

Hier wurden 50 µl des in Natriumacetatpuffer (50 mM, pH 6) verdünnten Tracers (^{125}I -cGMP) hinzugefügt, der Ansatz gemischt und bei 4 °C für 16 Stunden inkubiert. Zur Trennung des freien ^{125}I -cGMP von Antikörper-gebundenem ^{125}I -cGMP wurde 0,8 %iges γ -Globulin und 15 %iges Polyethylenglycol (PEG 6000) in 10 mM Tris HCl (pH 7,4) zugegeben und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 min bei 4 °C wurde der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe abgenommen und das Sediment (= Antigen-Antikörper Komplexe) im γ -Counter gemessen und in counts per minute (cpm) angegeben. Anhand der Standardkurve konnte nun der cGMP-Gehalt der Proben ermittelt und auf den Proteingehalt der Proben bezogen werden.

2.10 Versuche zu den Effekten von CNP auf die Phosphorylierung von Phospholamban und Titin in kultivierten murinen Kardiomyozyten

Die Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) und Titin wurde in isolierten kultivierten Kardiomyozyten untersucht. Dafür wurden die Kardiomyozyten, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, isoliert und kultiviert. Nach einem 4-stündigen Adaptieren der Kardiomyozyten in Laminin-beschichteten 3,5 cm Zellkulturschalen im Inkubator bei 37 °C wurden diese nach dem unten beschriebenen Pipettierschema mit CNP und Isoproterenol (ISO) für 15 Minuten inkubiert. ISO ist ein synthetischer β -Adrenorezeptor Agonist und wird hier als Positivkontrolle in einer finalen Konzentration von 10 nM verwendet. Die Stimulation des β -adrenergen Rezeptors führt zur Bildung von zyklischem AMP (cAMP) und damit zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase A, welche Phospholamban an Serin16 phosphoryliert. CNP katalysiert nach Bindung an dessen Guanylylcyclase-B Rezeptor (GC-B) die Synthese von cGMP. cGMP als zweiter Signalträger aktiviert unter anderem die cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I), welche ebenso Phospholamban an Serin16 phosphoryliert.

Tabelle 24 Inkubationsschema für Kardiomyozyten bei 37 °C

Behandlung	Konzentration [nM]	Inkubationsdauer [min]
Vehicle	-	15
CNP	10	15
CNP	100	15
CNP	1000	15
ISO	10	15

Im Anschluss wurde das Medium mit den Stimuli abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Kardiomyozyten erfolgte in 80 µl Puffer (10 mM NaHCO₃, 20 % SDS) unter Zugabe von Protease- und Phosphatase Inhibitoren. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischale gelöst, in ein Eppendorf-Cup überführt, abzentrifugiert (13.000 g, 3 min, RT) und der Überstand anschließend aliquotiert. Die nachfolgende Bestimmung der Proteinkonzentration diente einer kontinuierlichen Beladung der Geltaschen eines 15 %igen Trenngels für die Detektion der Phosphorylierung von Phospholamban. Die Lysate wurden dafür entsprechend in 3 x Lämmli denaturiert, wobei jeder Ansatz eine Konzentration von 30 µg/µl Protein aufwies. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter Abschnitt 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben.

Die Untersuchung der Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von Titin wurde dankenswerterweise von Frau Prof. Dr. Nazha Hamdani am Institut für Physiologie der Ruhr-Universität in Bochum durchgeführt. Dafür wurde das Peptid-haltige Medium der Kardiomyozyten nach der Stimulation abgenommen und die Zellen wurden 1 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden je 200 µl PBS auf die Kardiomyozyten gegeben und vom Boden der Zellkulturschale mit einem Zellschaber abgelöst. Danach zentrifugiert (13.000 g, 4 °C, 10 min), der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis nach Bochum zur Analyse geschickt. Für die Titin Western Blots wurden die Proteine durch Elektrophorese (17 Stunden, 1,8 %igen Agarosegel) aufgetrennt und danach auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dies erfolgte in der Arbeitsgruppe von Nazha Hamdani. Aufgrund der Größe von Titin (3200 kDa) ist ein Blotting auf eine Nitrozellulose Membran nicht möglich. Nach dem Blotting wurde die Membran mit Commassie Blau (brilliant blue R-250) gefärbt und fotografiert. Nach anschließender Entfärbung mit einem Essigsäure/Methanol Gemisch (25 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol) wurde die PVDF Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen Serin-4080-phosphoryliertes Titin inkubiert. Diese Aminosäure wird spezifisch durch PKG I phosphoryliert. Zur Quantifizierung wurden die immunreaktiven Banden (Dichte und Größe) auf die Werte der Banden der Commassie Färbung normalisiert (Hamdani 2013).

2.11 Datenanalyse und Statistik

Für die statistische Auswertung aller Daten wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die Erstellung der Grafiken erfolgte ebenfalls mittels Microsoft® Excel 2013. Dabei wurden die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) abgebildet. Zur statistischen Auswertung möglicher Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde ein *t*-Tests verwendet (zweiseitige Verteilung, ungleiche

Varianz). Zum Vergleich von mehreren Mittelwerten wurden Varianzanalysen mittels *2-way ANOVA* und *multiple comparison Bonferroni test* durchgeführt. Dafür wurde das GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc) Programm benutzt. Für alle Ergebnisse wurde ein p-Wert kleiner 5 % ($p < 0,05$) als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Um die Bedeutung von CNP bei hypertensiver Herzhypertrophie zu untersuchen wurden zwei Studien durchgeführt:

3.1 Die erste Studie untersucht die Effekte von exogenem, synthetischem CNP an wildtypischen *C57Bl/6* Mäusen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC). Dafür wurde zusätzlich zu der angelegten Stenose exogenes CNP (50 ng/kg/min) für 14 Tage über osmotische Minipumpen appliziert-in Anlehnung an (Izumiya 2012). Die Kontrollgruppe (Sham) erhielt unter Narkose eine Thorakotomie- ohne dass die Aorta eingeengt wurde, und eine mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) gefüllte osmotische Minipumpe.

3.2 und **3.3** Um der Bedeutung des endogenen Hormons nachzugehen, wurden Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des CNP Rezeptors GC-B generiert und daran die Auswirkungen einer TAC untersucht.

3.1 Effekte von synthetischem CNP bei experimentell induzierter hypertensiver Herzinsuffizienz

3.1.1 Effekte von CNP auf den systemischen arteriellen Blutdruck

Hier wurde untersucht, ob die Gabe von exogenem CNP in wildtypischen *C57Bl/6* Mäusen zu einer Veränderung des systolischen- (SBD) oder diastolischen Blutdrucks (DBD) führt. Dafür wurde der SBD und DBD mittels Plethysmographie an der Schwanzarterie wacher Mäuse gemessen. Die zweiwöchige Gabe von CNP (50 ng/kg/min) hatte keinen Einfluss auf den systolischen- oder den diastolischen Blutdruck (Abb. 9).

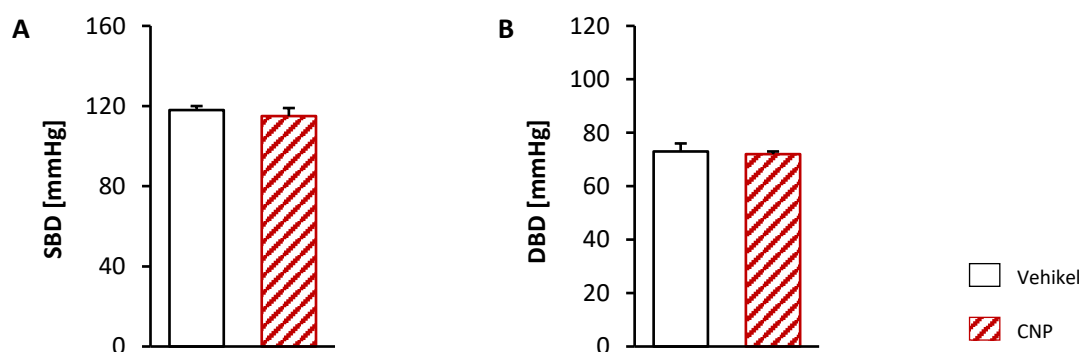


Abb. 9 Nicht invasive Blutdruckmessungen (A) Zeigt den systolischen- (SBD) und (B) den diastolischen Blutdruck (DBD) in mmHg. Gemessen wurde der Blutdruck in *C57Bl/6* Mäusen, welche 2 Wochen mit CNP (CNP Gruppe) oder mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %; als Vehikel) via osmotischer Minipumpen behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler, wie in 2.11 beschrieben. Vehikel (n=7), CNP (n=7)

3.1.2 Effekte von CNP auf die durch TAC-induzierte Erhöhung der Nachlast des linken Ventrikels

Die Druckbelastung des linken Ventrikels (also der Aortendruck proximal zu der Stenose) wurde mittels linksventrikulärer Katheterisierung (Millar Katheter) in narkotisierten Mäusen bestimmt. Durch die operativ herbeigeführte Konstriktion der Aorta transversalis (TAC) stieg die Nachlast des linken Ventrikels (also der Aortendruck proximal zu der Stenose) signifikant auf $179,4 \pm 2,3$ mmHg zur Kontrolle ($108,6 \pm 2,7$ mmHg) an. Die Mäuse, die nach TAC mit CNP behandelt wurden, zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg des Aortendrucks ($173,2 \pm 4,1$ mmHg). Zwischen den beiden TAC-Kollektiven (TAC und TAC+CNP) war kein Unterschied zu beobachten (Abb. 10).

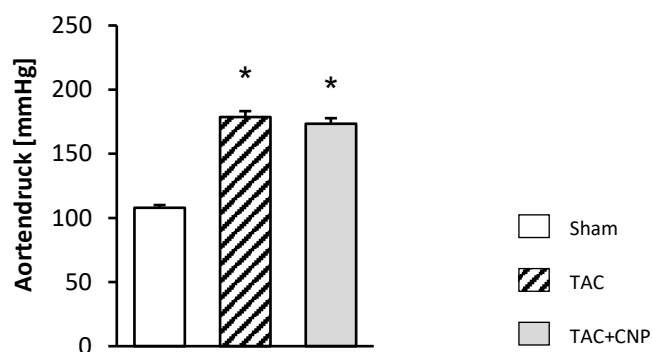


Abb. 10 Effekte von CNP auf die Nachlast des linken Ventrikels Mittels invasiver hämodynamischer Messungen wurde die Nachlast (Aortendruck) in mmHg in Kontrollmäusen (Sham), in Mäusen nach TAC und in Mäusen, welche nach TAC zusätzlich mit CNP mittels osmotischer Minipumpen für 14 Tage behandelt wurden, bestimmt. Sham (n=7), TAC (n=7), TAC+CNP (n=7); *p<0.05 (vs Sham)

3.1.3 Effekte von CNP auf die hypertensive Herzhypertrophie

Die bei Nekropsie und Organentnahme gewonnenen Daten zeigten, dass die beiden TAC-Kollektive (TAC und TAC+CNP) bezüglich der auf das Körpergewicht (in g) normierten Herzgewichte (in mg) (TAC: $7,1 \pm 0,3$ mg/g; TAC+CNP: $6,5 \pm 0,2$ mg/g) sowie der Körpergewicht-normierten linksventrikulären Gewichte (TAC: $5,5 \pm 0,2$ mg/g; TAC+CNP: $5,2 \pm 0,1$ mg/g) im Vergleich zu den Kontrolltieren (HG/KGW: $4,8 \pm 0,1$ und LVG/KGW: $3,6 \pm 0,1$) signifikant erhöht sind. Beide Kollektive zeigten somit nach Aortenkonstriktion eine signifikante Zunahme der Gewichte der Herzen sowie der linken Ventrikel, dies wurde durch die Gabe von CNP nicht signifikant beeinflusst (Abb. 11).

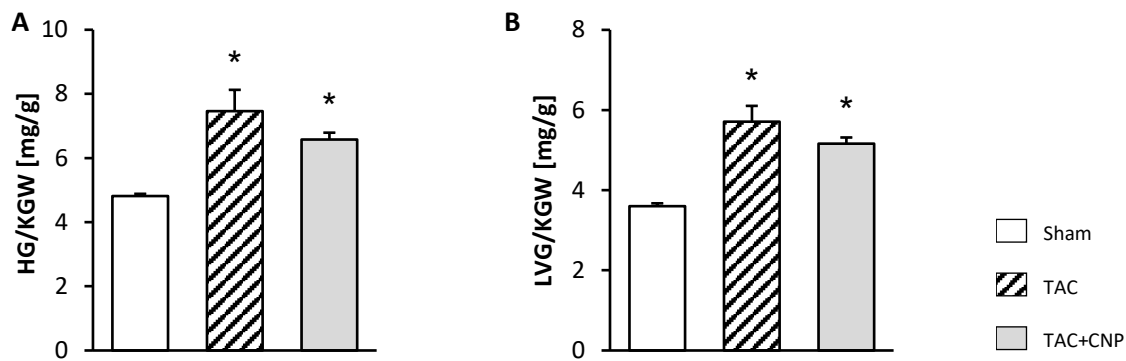


Abb. 11 Effekte von CNP auf die makroskopische Herzhypertrophie (A) Zeigt ermittelte Herzgewichte (HG) und (B) linksventrikuläre Gewichte (LVG) normiert auf das jeweilige Körpergewicht (KGW) in mg/g. Sham (n=10), TAC (n=10), TAC+CNP (n=10); *p<0.05 (vs Sham)

Wie bereits erwähnt, hatte die Behandlung mit synthetischem CNP (50 ng/kg/min; über 14 Tage) keinen signifikanten Einfluss auf die durch TAC-induzierte makroskopische Herzhypertrophie in *C57Bl/6* Mäusen. Allerdings hatte CNP einen signifikanten Effekt auf zellulärer (Abb. 12 C) und molekularer (Abb. 12 D) Ebene. Wie in Abb. 12 gezeigt, führte die TAC zu einem signifikanten Anstieg der Kardiomyozytenfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe, also zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten. Die Gabe von synthetischem CNP konnte die Myozytenfläche von $467,2 \pm 12,6 \mu\text{m}^2$ (nach TAC) signifikant zu $362,4 \pm 14,0 \mu\text{m}^2$ (TAC+CNP) verringern. Dieser Rückgang der Myozyten-Hypertrophie wurde durch die Bestimmung der mRNA Expression des Hypertrophiemarkers B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) bestätigt. Die BNP mRNA Expression stieg signifikant nach TAC auf $241,9 \pm 20,5 \%$ vs Sham) im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Dies wurde durch CNP-Infusion signifikant ($183,5 \pm 17,1 \%$ vs Sham) vermindert.

A

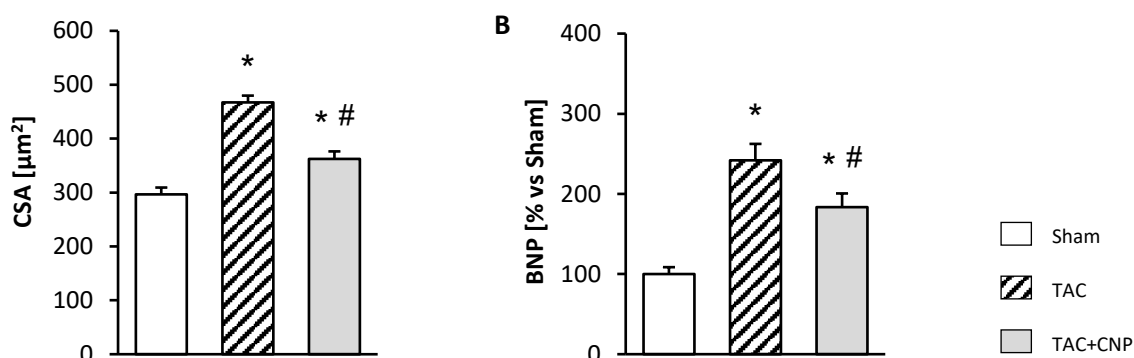
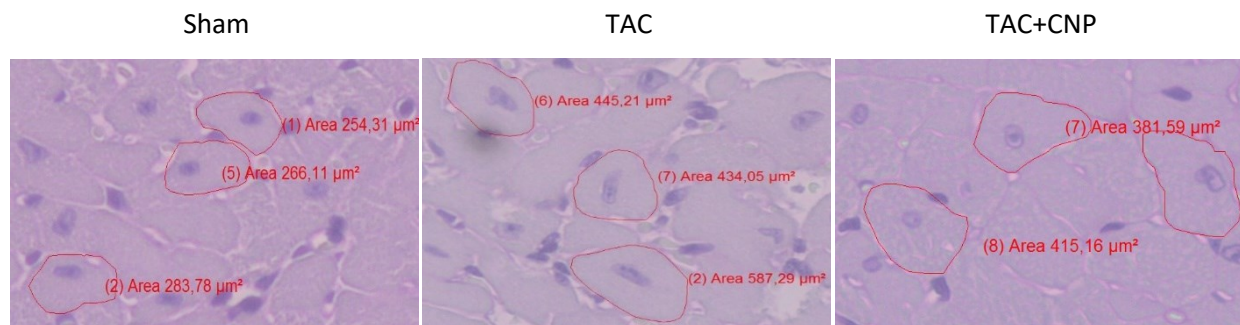
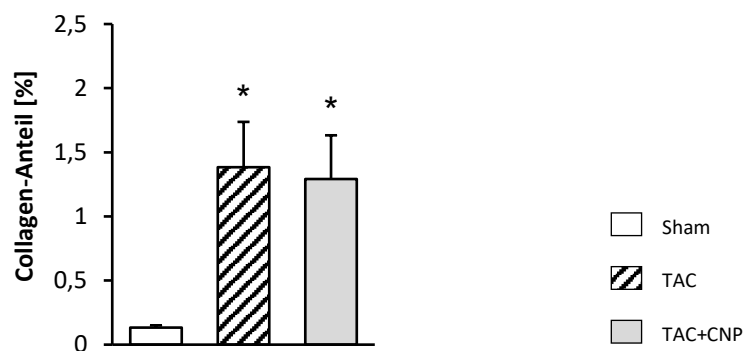
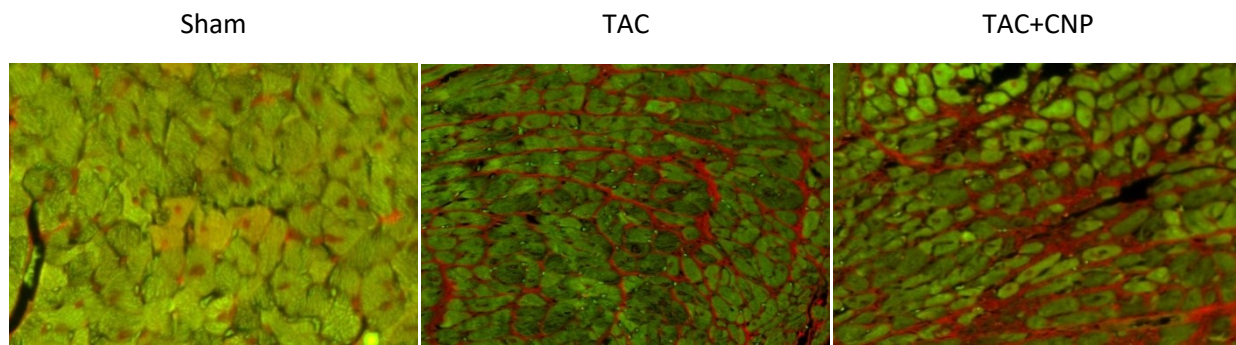


Abb. 12 Effekte von CNP auf die hypertensive TAC-induzierte Herzhypertrophie (A) Zeigt linksventrikuläre Kardiomyozytenflächen (CSA = cross sectional area) in μm^2 ermittelt aus histologischen mittels Periodic acid-Schiff Reaktion (PAS) gefärbten Herzpräparaten. Für jede Bedingung (Sham, TAC und TAC+CNP) wurden jeweils 50 Kardiomyozyten pro Herzschnitt ausgewertet. (B) Zeigt quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von BNP normiert auf das Referenzgen S12. Sham (n=8), TAC (n=14), TAC+CNP (n=14); *p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC)

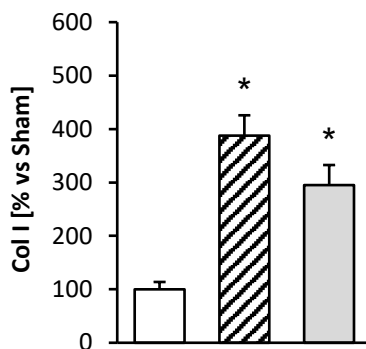
3.1.4 Effekte von CNP auf die linksventrikuläre interstitielle Fibrose nach TAC

Die Bestimmung des Kollagenfaser-Anteils in Prozent (%) bezogen auf die betrachtete Fläche zeigte, dass nach zweiwöchiger Aortenkonstriktion der Kollagenfaser-Anteil von $0,13 \pm 0,1$ % (Kontrollgruppe) auf $1,4 \pm 0,4$ % signifikant anstieg. Die zusätzliche Infusion mit CNP hatte auf den TAC-induzierten Anstieg des interstitiellen Kollagens keinen signifikanten Einfluss ($1,3 \pm 0,3$ %). Dies wurde auch durch die Bestimmung der mRNA Expression der Fibrosemarker Kollagen I (Col I) und des connective tissue growth factors (CTGF) bestätigt. Die mRNA Expression der beiden untersuchten Zielgene stieg signifikant nach TAC (Col I: $387,7 \pm 62,1$ % vs Sham und CTGF: $294,6 \pm 38,0$ % vs Sham) im Vergleich zur Kontrolle an und dies wurde durch exogenes CNP (Col I: $295,1 \pm 29,7$ % vs Sham und CTGF: $269,7 \pm 37,5$ % vs Sham) nicht beeinflusst.

A



B



C

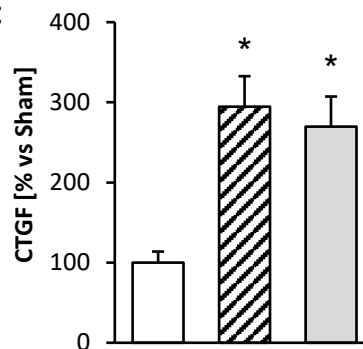


Abb. 13 Effekte von CNP auf die TAC-induzierte Fibrose (A) Zeigt den linksventrikulären interstitiellen Kollagen-Anteil in % der Gesamtfläche ermittelt aus histologischen nach Siriusrot gefärbten Herzpräparaten. Für jede Bedingung (Sham, TAC und TAC+CNP) wurden pro Maus 15 Fluoreszenzbilder aufgenommen und mittels digitaler Addition und Subtraktion die relative Fläche des Kollagens bestimmt. In Grün werden die Kardiomyozyten dargestellt und die interstitiellen Kollagenfasern werden in Rot angezeigt.

Sham (n=10), TAC (n=14), TAC+CNP (n=12).

(B) und (C) Zeigen quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von Col I und CTGF normiert auf das Referenzgen S12. Sham (n=8), TAC (n=14), TAC+CNP (n=14); *p<0.05 (vs Sham)

3.1.5 Effekte von CNP auf die linksventrikuläre Pumpfunktion

Mittels der linksventrikulären Katheterisierung wie in 3.1.2. bereits beschrieben, wurde auch hier die Herzmechanik untersucht. Die Ejektionsfraktion (EF) nahm nach TAC auf $35,4 \pm 7,3$ % gegenüber $60,9 \pm 3,4$ % (Sham) signifikant ab. Die Auswurf- oder Ejektionsfraktion ist ein Maß für die Herzfunktion. Da bei einer Kontraktion des Herzmuskels nicht das gesamte Blutvolumen aus der Kammer ausgestoßen wird, sondern immer ein gewisser Anteil zurückbleibt, kann der Teil des ausgestoßenen Volumens Rückschlüsse auf den Zustand des Herz- und Kreislaufs Systems bieten. Die EF bezeichnet hier den Anteil des vom Herzen bei einer Kontraktion ausgeworfenen Blutes im Verhältnis zum Gesamtblutvolumen in der linken Herzkammer. Die Infusion mit CNP führte zu einer tendenziellen Verbesserung der Herzfunktion indem die Ejektionsfraktion auf $50,3 \pm 7,3$ % anstieg (Abb. 14 A). Zudem entwickelte sich in den Tieren mit TAC eine exzentrische Herzhypertrophie mit deutlicher Vergrößerung des Kammervolumens. Die dilatierten Ventrikel konnten so nicht mehr vollständig kontrahieren, und das Restblutvolumen am Ende der Diastole ($38,1 \pm 3,2$ μ l) bzw. Systole ($30,9 \pm 4,4$ μ l) nahm signifikant zur Kontrollgruppe zu. Dieser Effekt wurde durch CNP signifikant gehemmt. Die Gabe des Peptids bewirkte einen signifikanten Rückgang der end-diastolischen ($27,9 \pm 1,0$ μ l) und end-systolischen ($18,7 \pm 2,1$ μ l) Volumina (Abb. 14 B und C), ein Hinweis für die Prävention der Dilatation der linksventrikulären Kammer.

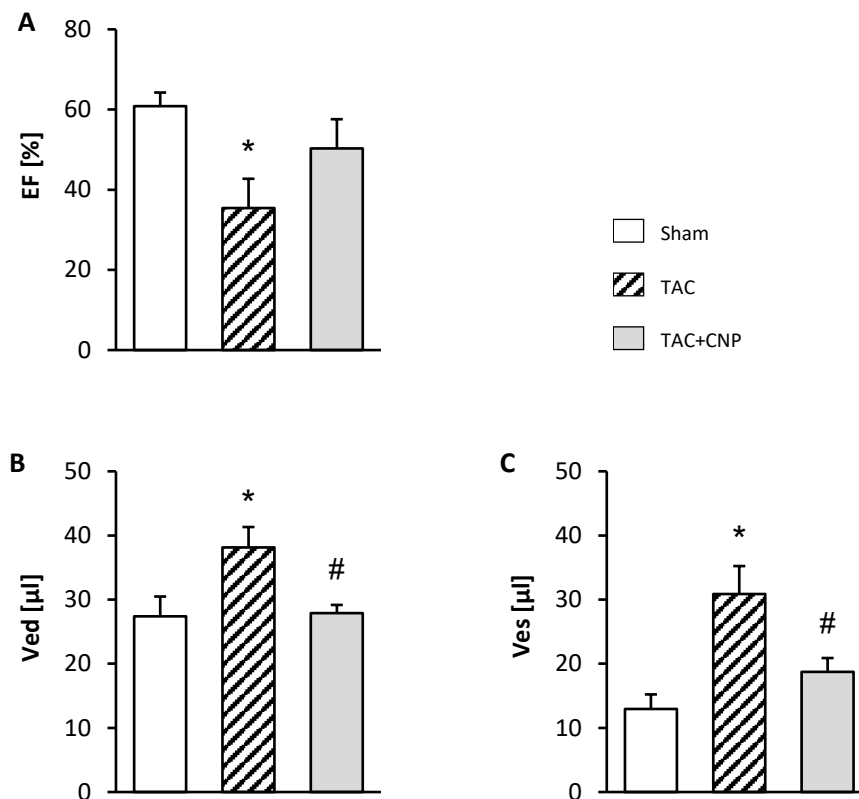


Abb. 14 Effekte von CNP auf die linksventrikuläre Pumpfunktion des Herzens (A-C) Zeigen invasive hämodynamische Messungen der EF in %, des linksventrikulären end-diastolischen Volumens (Ved) und des linksventrikulären end-systolischen Volumens (Ves) in µl. Sham (n=9), TAC (n=6), TAC+CNP (n=6); *p<0.05 (vs Sham), #p<0.05 (vs TAC)

Weitere relevante Parameter der linksventrikulären hämodynamischen Messung sind in Tabelle 25 dargestellt. Um die Leistung des Herzens nach einer Druckbelastung besser beurteilen zu können, wurde die Pumpaktivität, also das Blutvolumen das pro Minute in den Körperkreislauf abgegeben wird (sprich das Herzzeitvolumen), sowie das Schlagvolumen (gibt das Blutvolumen an, welches während der Systole aus der linken Herzkammer ausgeworfen wird) untersucht. In den 3 angegebenen Kollektiven (Sham, TAC und TAC+CNP) wurden keine signifikanten Veränderungen des Herzzeit- sowie des Schlagvolumens festgestellt. Auch die Herzrate war unverändert. Allerdings waren nach TAC die maximalen Kontraktions- (dp/dt_{max}) und Relaxationsraten (dp/dt_{min}) des linken Ventrikels signifikant um circa 20 % im Vergleich zu der Sham-Gruppe verringert. Die Infusion von CNP hatte darauf keinen signifikanten Einfluss.

Tabelle 25 Parameter der linksventrikulären Messung Die Tabelle zeigt das Herzzeitvolumen (HZV) in $\mu\text{l}/\text{min}$, das Schlagvolumen (SV) in μl , die Herzrate in Schlägen pro Minute (beats per minute-bpm) sowie die maximalen Kontraktions- (dP/dt max) bzw. Relaxationsraten (dP/dt min) in mmHg/s. Sham (n=9), TAC (n=6), TAC+CNP (n=6); *p<0.05 (vs Sham)

	Sham	TAC	TAC+CNP
HZV [$\mu\text{l}/\text{min}$]	8781,7 \pm 639,7	7172,3 \pm 1119,5	7529,5 \pm 1083
SV [μl]	16,4 \pm 1,1	12,7 \pm 1,8	13,5 \pm 1,6
HR [bpm]	536,2 \pm 17,2	565,6 \pm 24,1	546,7 \pm 17,6
dP/dt max [mmHg/s]	11608 \pm 690,6	9269 \pm 360,9 *	10019,5 \pm 489
dP/dt min [mmHg/s]	-10822,1 \pm 662,4	-8187,5 \pm 725,9 *	-9612,7 \pm 829

3.1.6 Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von Phospholamban und Titin im linken Ventrikel

Um mögliche Mechanismen für die protektive Wirkung von exogenem CNP auf die TAC-induzierte Dilatation zu finden, wurde die linksventrikuläre Expression und Phosphorylierung (p) von Phospholamban (pSer₁₆PLB) und Titin (pSer₄₀₈₀Titin) mittels Western Blot untersucht. Die quantitative Analyse von phosphoryliertem PLB (pPLB) in Relation zum gesamten kardialen Phospholamban (tPLB) ergab in den 3 untersuchten Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Die Untersuchung des sarkomerischen Proteins Titin hingegen, zeigte deutliche Veränderungen der Protein Phosphorylierung an Serin 4080. Diese Aminosäure wird spezifisch durch die Proteinkinase G I (PKG I) phosphoryliert (Hamdani et al. 2013, Hamdani et al. 2013). Hier ergab die quantitative Analyse des phosphorylierten Titin in Relation zur Referenz eine signifikante Erhöhung des Quotienten bei den Tieren, die nach TAC mit CNP behandelt wurden (Abb. 15).

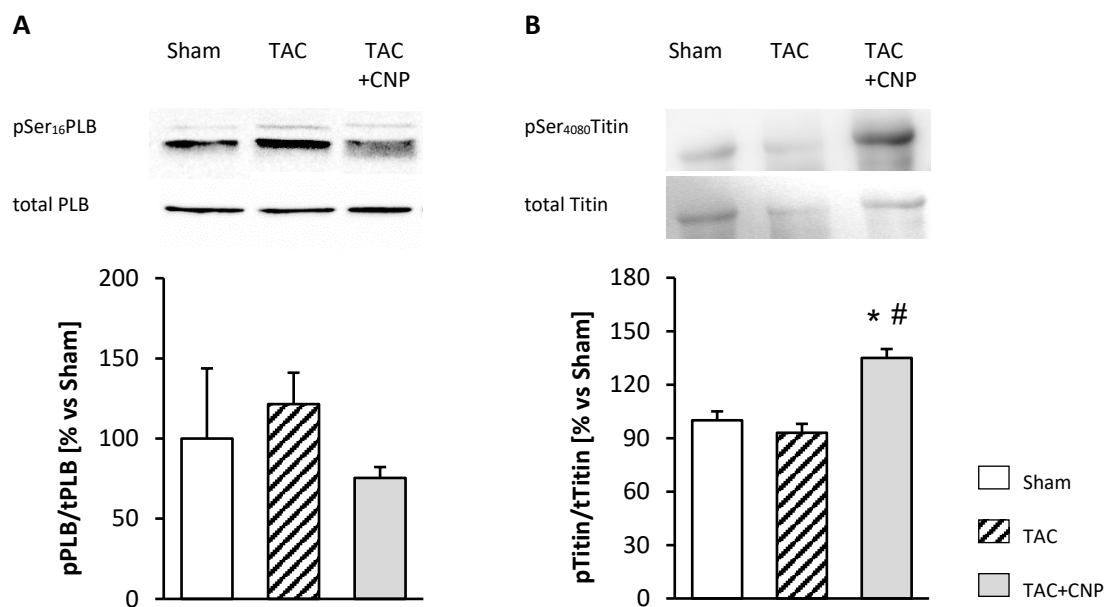


Abb. 15 Effekte von CNP auf die Expression und Phosphorylierung von PLB und Titin (A und B) Zeigen die linksventrikuläre Protein-Expression von (A) phosphoryliertem Phospholamban (pPLB) an Serin 16 und (B) von phosphoryliertem Titin (pTitin) an Serin 4080. Das Molekulargewicht von pPLB und tPLB liegt jeweils bei 25 kDa und von pTitin bei 3200 kDa. Die Expression von pPLB wurde auf tPLB normiert und die Expression von pTitin auf tTitin.

pPLB: Sham (n=4), TAC (n=4), TAC+CNP (n=4). pTitin: Sham (n=6), TAC (n=6), TAC+CNP (n=6); *p<0.05 (vs Sham), #p<0.05 (vs TAC)

3.1.7 Effekte von CNP auf die linksventrikuläre mRNA Expression von Zytokinen

Mittels quantitativer real time-PCR Analysen wurde die linksventrikuläre mRNA Expression von Interleukin 6 (IL-6) und dem Zytokin CX C ligand-1 (Cxcl-1) untersucht. Die IL-6 mRNA Expression stieg nach TAC signifikant auf $13,1 \pm 3,2$ x-fach vs Sham an. Dieser TAC-induzierte Anstieg von IL-6 wurde durch die Gabe von CNP ($6,6 \pm 1,2$ x-fach vs Sham) signifikant gehemmt.

Die Cxcl-1 mRNA Expression in linksventrikulärem Herzgewebe zeigte in den untersuchten Kollektiven keine signifikanten Veränderungen (Abb. 16).

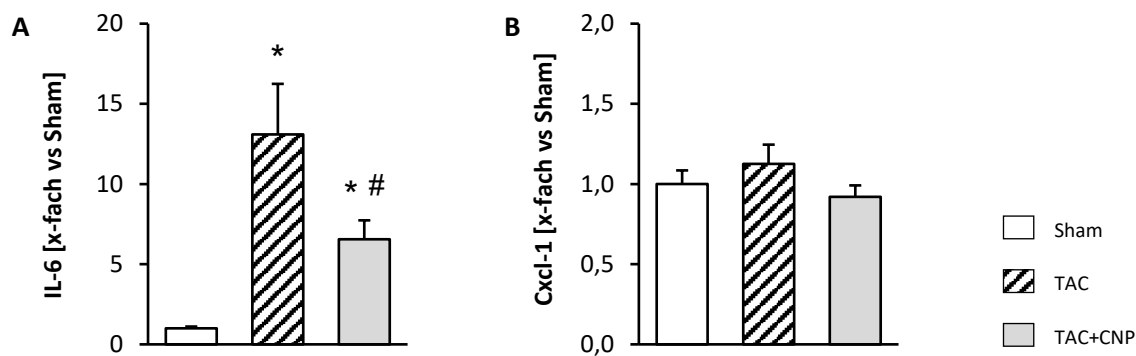


Abb. 16 Effekte von CNP auf die Expression inflammatorischer Proteine (A und B) Zeigen quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von IL-6 und Cxcl-1 normiert auf das Referenzgen S12. Sham (n=9), TAC (n=8), TAC+CNP (n=9); *p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC)

3.2 Generierung und Validierung eines neuen genetischen Mausmodells mit Kardiomyozyten-spezifischer Deletion des GC-B Rezeptors (CM GC-B KO)

3.2.1 Generierung der CM GC-B KO Mäuse

Für die Generierung der Kardiomyozyten (CM)-spezifischen Guanylylcyclase-B (GC-B) Knockout (KO)-Mäuse (CM GC-B KO) wurde eine Mauslinie, in der das Exon 7 des GC-B Gens homozygot gefloxt ($GC-B^{flox/flox}$) vorlag, benutzt (Spiranec 2018). Diese $GC-B^{flox/flox}$ Mauslinie wurde mit weiblichen α myosin heavy chain (α MHC)-Cre Mäusen verpaart. Die α MHC-Cre Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase nur in Kardiomyozyten (O'Neal 2007). Im Zellkern schneidet die Cre-Rekombinase die geflochten DNA-Sequenzen aus, wodurch es zum spezifischen Verlust des Exon 7 des GC-B Gens in den Kardiomyozyten kommt. Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden durch Schwanzspitzenbiopsien mittels PCR genotypisiert. Zum Nachweis des Cre-Transgens, sowie des Flox-Gens wurden spezifische Oligonukleotide (als Sonden bzw. Primer) eingesetzt (Holtwick 2002, Spiranec 2018).

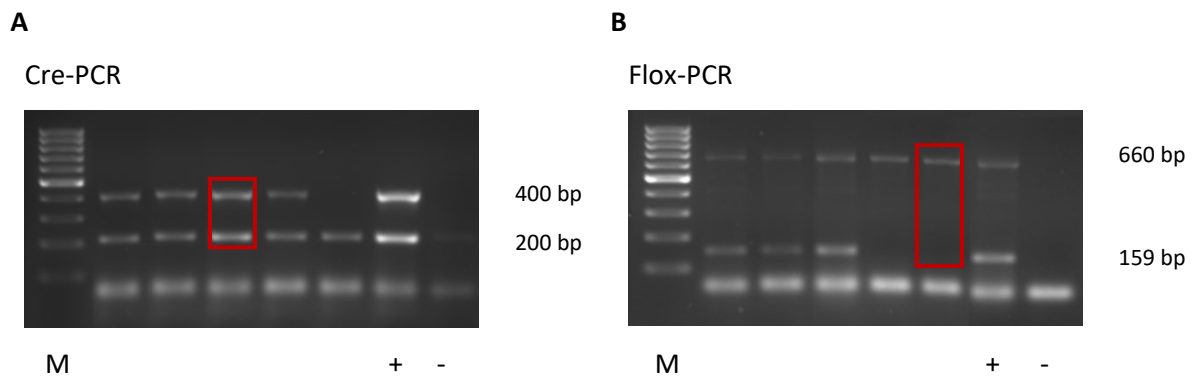


Abb. 17 Genotypisierung der CM GC-B KO Mäuse (A) Zeigt eine repräsentative Cre-PCR. Das PCR Produkt besitzt eine Größe von 400 Basenpaaren (bp). Die Bande bei 200 bp zeigt an, dass die DNA nicht degradiert ist - hierfür wurden unspezifisch bindende Kontrollprimer verwendet. (B) Zeigt eine repräsentative FloX-PCR. Das PCR Produkt besitzt eine Größe von 660 bp. Zudem kann hier auch eine KO-Bande detektiert werden, welche eine Größe von 159 bp aufzeigt. Die roten Kästchen geben die PCR-Produkte an, die die Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des GC-B Rezeptors aufweisen sollten. (M = Marker, + = Positivkontrolle, - = Negativkontrolle)

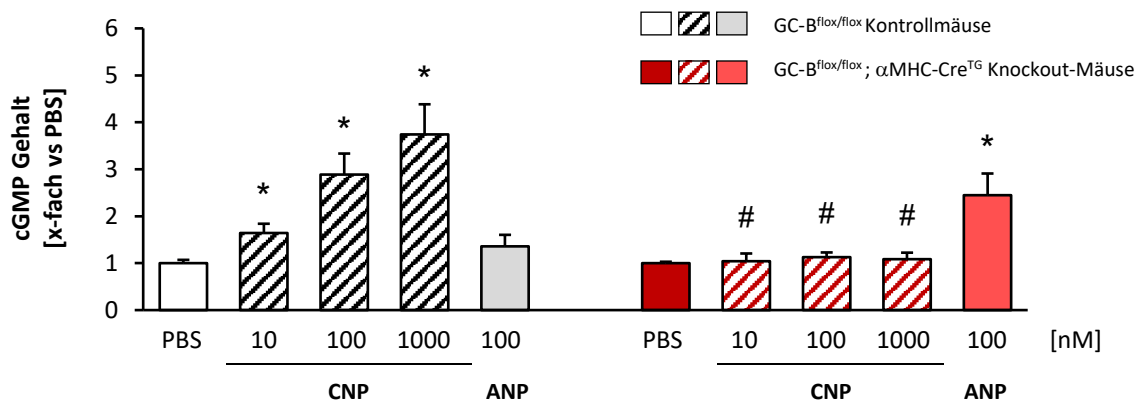
Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des GC-B Rezeptors wurden anhand der Cre-Bande (400 bp) und der FloX-Bande (660 bp) identifiziert (Abb. 17). Manche Tiere zeigten in den Schwanzbiopsien zusätzlich zu den Amplikons für Cre und FloX noch eine KO-Bande (159 bp). Also ein PCR-Produkt, welches nur bei einer Cre-vermittelten Rekombination des GC-B Gens entsteht. Dies ist vermutlich auf eine spontane ektopische Rekombinationsaktivität der Cre-Rekombinase in den Keimzellen zurückzuführen (Eckardt 2004, Skryabin 2004). Diese Tiere waren für die Zucht sowie experimentelle Versuche nicht geeignet und wurden nach der Genotypisierung geopfert.

3.2.2 Effekte von CNP auf den intrazellulären cGMP-Gehalt von kultivierten Kardiomyozyten und Fibroblasten

Um den Erfolg (also die Effizienz und Zellspezifität) der Generierungsstrategie der CM GC-B KO Mäuse nachzuweisen, wurde die CNP-induzierte cGMP-Produktion in isolierten Kardiomyozyten und kultivierten kardialen Fibroblasten untersucht. Dafür wurden die Kardiomyozyten sowie kardiale Fibroblasten von Kontroll- und KO-Mäusen mit unterschiedlichen CNP-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde der intrazelluläre cGMP-Gehalt mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt (Abb. 18). Die Kardiomyozyten der Kontrollmäuse zeigten einen Konzentrations-abhängigen Anstieg des intrazellulären cGMP-Gehalts, wohingegen die cGMP-Antwort der Kardiomyozyten aus CM GC-B KO Mäusen vollständig ausblieb. In den isolierten Herzfibroblasten aus Kontroll- und Knockout-Mäusen zeigte sich eine Korrelation des cGMP-Gehalts mit den CNP-Konzentrationen. Die Behandlung der Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten mit dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) löste einen

geringeren Anstieg des intrazellulären cGMP-Gehalts aus, als die Inkubation mit CNP. Dieses Ergebnis zeigt, dass die CNP-stimulierte cGMP-Produktion in Kardiomyozyten aus Mäusen, denen der GC-B Rezeptor in den Kardiomyozyten fehlen sollte (CM GC-B KO Mäuse), komplett ausblieb. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass der CNP-spezifische Rezeptor (GC-B) tatsächlich in den Kardiomyozyten deletiert wurde.

A



B

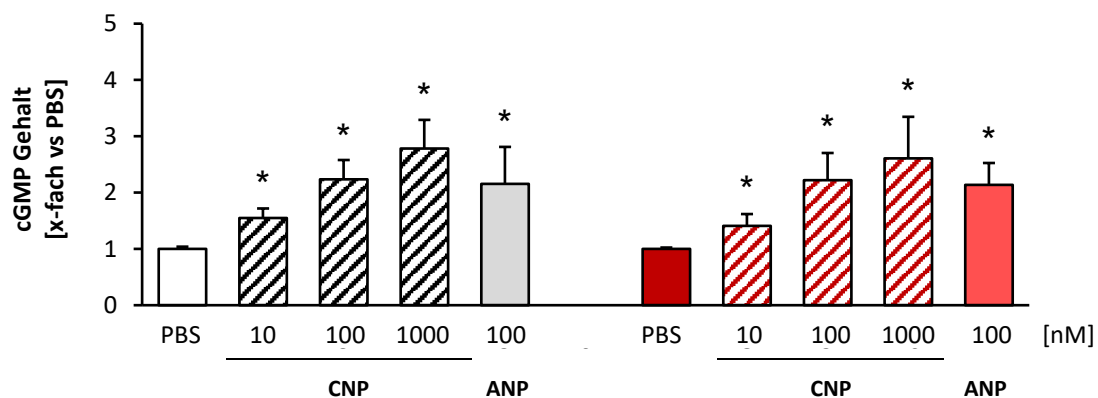


Abb. 18 Effekte von CNP auf den cGMP-Gehalt (A) Zeigt isolierte adulte Kardiomyozyten und (B) isolierte kardiiale Fibroblasten von Kontroll- und Knockout-Mäusen. Die Zellen wurden mit PBS, unterschiedlichen CNP-Konzentrationen (10, 100 und 1000 nM) und ANP (100 nM) inkubiert. Anschließend wurde der intrazelluläre cGMP-Gehalt bestimmt.

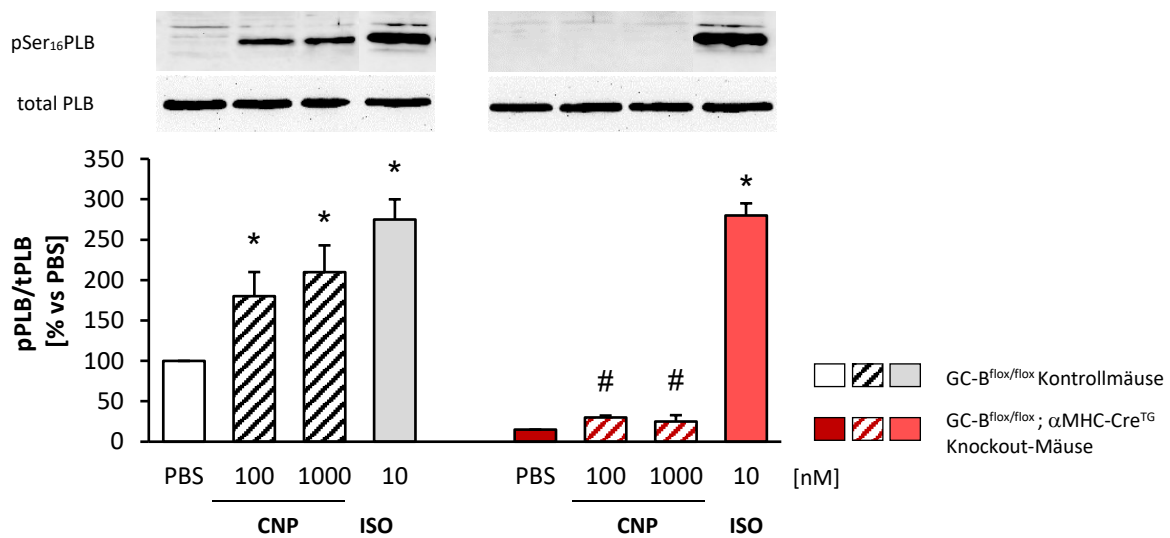
GC-B^{flox/flox} (n=9), CM GC-B KO (n=9); *p<0.05 (vs PBS); #p<0.05 (vs GC-B^{flox/flox})

3.2.3 Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von Phospholamban und Titin in kultivierten Kardiomyozyten

Weiterhin zeigten meine Versuche an isolierten Kardiomyozyten, dass CNP in Kardiomyozyten aus Kontrollmäusen eine deutliche Phosphorylierung von PLB an Serin 16 und von Titin an Serin 4080 (die PKG I abhängige Phosphorylierungsstelle) induziert. Dieser Effekt war in Kardiomyozyten aus den

Knockout-Mäusen aufgehoben. Die Phosphorylierung nach Isoprenalin (ISO) Behandlung war zwischen den Genotypen nicht unterschiedlich. ISO ist ein synthetischer $\beta 1$ und $\beta 2$ Adrenorezeptor Agonist und phosphoryliert PLB und Titin über die Proteinkinase A (PKA). Letztendlich bestätigen auch diese Experimente, dass unsere Strategie zur Generierung von Mäusen mit einer spezifischen Deletion des GC-B Rezeptors in Kardiomyozyten erfolgreich war.

A



B

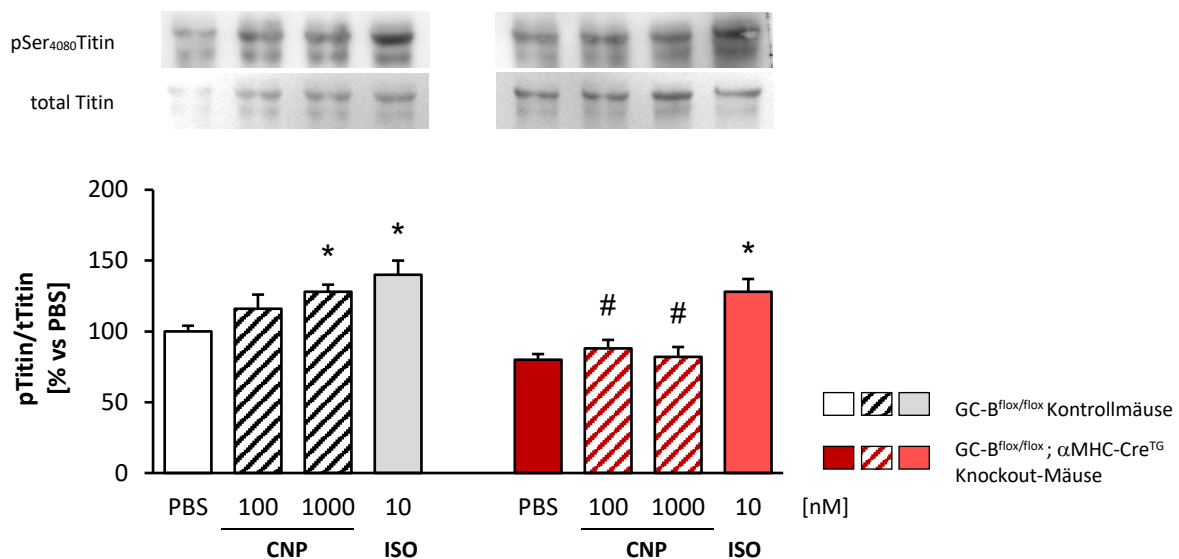


Abb. 19 Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von PLB und Titin in kultivierten Kardiomyozyten (A) Zeigt das Phosphorylierungsmuster des phosphorylierten Phospholamban an Serin 16 (pSer₁₆PLB) normiert auf total PLB. (B) Zeigt das Phosphorylierungsmuster des phosphorylierten Titin an Serin 4080 (pSer₄₀₈₀Titin) normiert auf die Banden von tTitin. Die isolierten Kardiomyozyten wurden mit PBS, CNP-Konzentrationen (10, 100 nM) und Isoprenalin (10 nM) inkubiert.

GC-B^{flox/flox} (n=3), CM GC-B KO (n=3); *p<0.05 (vs PBS); #p<0.05 (vs GC-B^{flox/flox})

3.2.4 Basaler Phänotyp der CM GC-B KO Mäuse

Die CM GC-B KO Mauslinie zeigte basal einen unauffälligen Phänotyp. In einem Alter von circa 2 – 4 Monaten waren das Skelettwachstum und die Herzfunktion unverändert gegenüber Geschwister-Kontrolltieren. Um mögliche altersbedingte kardiale Veränderungen der CM GC-B KO Mäuse zu detektieren, wurden sowohl weibliche als auch männliche CM GC-B KO Tiere und gleichaltrige Geschwister-Kontrolltiere (GC-B^{flox/flox}) im Alter von 12 – 14 Monaten untersucht.

3.2.4.1 Untersuchungen an weiblichen Mäusen

3.2.4.1.1 Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks

Die Messung des systolischen Blutdrucks (SBD) und des diastolischen Blutdrucks (DBD) mittels Plethysmographie an wachen circa 2 Monate alten weiblichen Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 20).

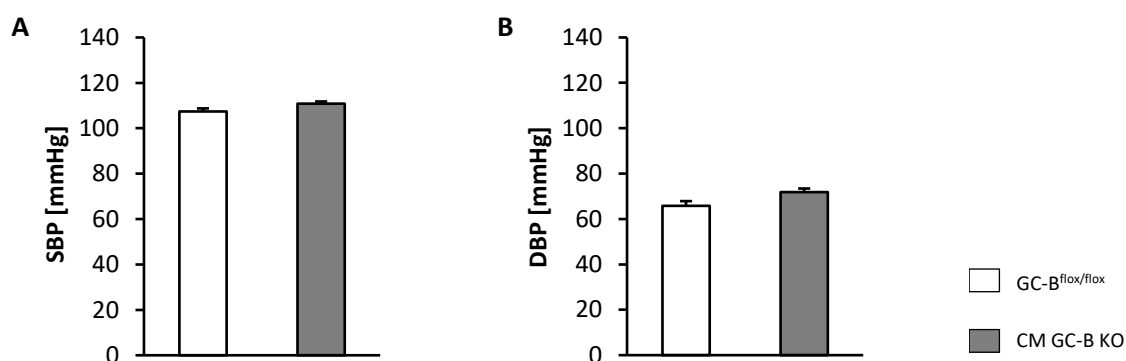


Abb. 20 Nicht invasive Blutdruckmessungen (A) Zeigt den systolischen- (SBD) und (B) den diastolischen Blutdruck (DBD) in mmHg. Gemessen wurde der Blutdruck in weiblichen CM GC-B KO Mäusen und deren Geschwister-Kontrolltieren (GC-B^{flox/flox}). GC-B^{flox/flox} (n=7), CM GC-B KO (n=7)

3.2.4.1.2 Einfluss des Alters bei weiblichen Mäusen auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie

Die bei Nekropsie und Organentnahme gewonnenen Ergebnisse der weiblichen Mäuse in einem Alter von 2 Monaten, zeigten zwischen den beiden Genotypen (GC-B^{flox/flox} und CM GC-B KO) keine signifikanten Unterschiede in den Körpergewicht-normierten Herzgewichten (GC-B^{flox/flox}: $5,2 \pm 0,2$ mg/g; CM GC-B KO: $5,1 \pm 0,1$ mg/g) und in den Körpergewicht-normierten linksventrikulären Gewichten (GC-B^{flox/flox}: $3,9 \pm 0,1$ mg/g; CM GC-B KO: $3,8 \pm 0,1$ mg/g). In einem Alter von circa 1 Jahr, zeigten die CM GC-B KO Weibchen signifikant höhere Körpergewicht-normierte Herzgewichte ($5,0 \pm 0,2$ mg/g) sowie Körpergewicht-normierte linksventrikuläre Gewichte ($3,9 \pm 0,1$ mg/g) im Vergleich zu den gleichaltrigen Geschwister-Kontrolltieren (Abb. 21).

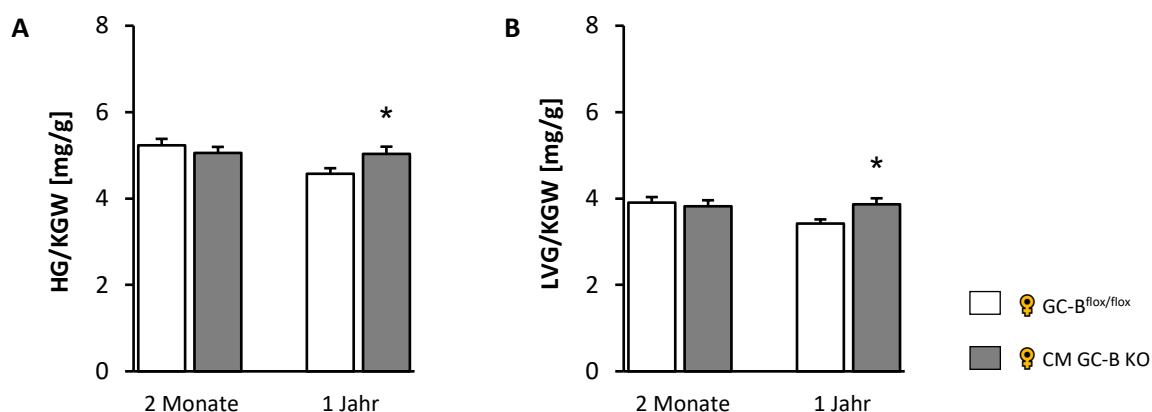


Abb. 21 Effekte des Alters auf die Entwicklung einer makroskopischen Herzhypertrophie (A) Zeigt die Herzgewichte (HG) und (B) die linksventrikulären Gewichte (LVG) normiert auf das jeweilige Körpergewicht (KGW) in mg/g. 2 Monate alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=14), CM GC-B KO (n=16), 1 Jahr alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=17), CM GC-B KO (n=16); *p<0.05 (vs GC-B^{flox/flox} 1 Jahr)

Diese Beobachtung (Abb. 21) reflektierte sich auch in den Kardiomyozytenflächen. Hier konnten in einem Alter von 2 Monaten zwischen den beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. In einem Alter von circa 1 Jahr zeigten die CM GC-B KO Weibchen im Vergleich zu den gleichaltrigen Geschwister-Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg der Kardiomyozytenfläche (GC-B^{flox/flox}: $283,4 \pm 11,1 \mu\text{m}^2$; KO: $335,8 \pm 10,3 \mu\text{m}^2$).

A

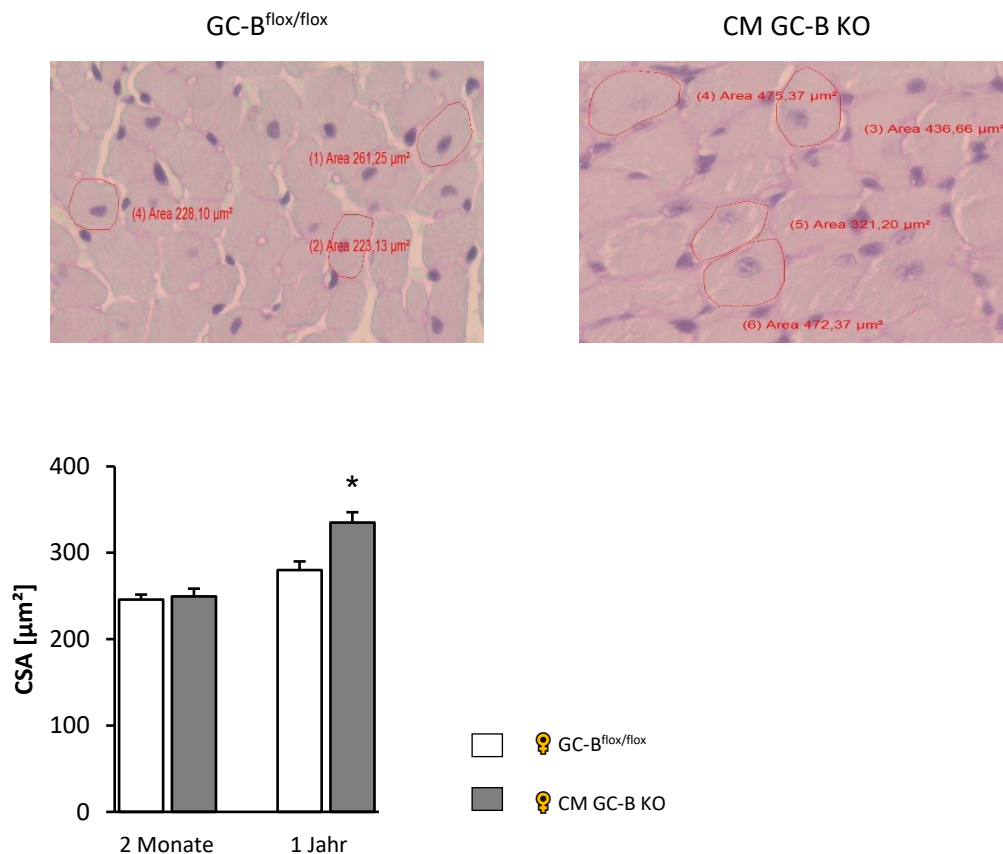


Abb. 22 Effekte des Alters auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie (A) Zeigt die Auswertung der linksventrikulären Kardiomyozytenflächen (CSA = cross sectional area) in μm^2 aus histologischen nach Periodic acid-Schiff Reaktion (PAS) gefärbten Herzpräparaten, es wurden jeweils 50 Kardiomyozyten pro Herzschnitt untersucht. 2 Monate alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=14), CM GC-B KO (n=16), 1 Jahr alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=17), CM GC-B KO (n=16); *p<0.05 (vs GC-B^{flox/flox} 1 Jahr)

3.2.4.1.3 Einfluss des Alters bei weiblichen Mäusen auf die linksventrikuläre Pumpfunktion

Die Untersuchung der Herzmechanik erfolgte, wie zuvor in 3.1.5 erwähnt, mittels der linksventrikulären Katheterisierung. In einem Alter von 2 Monaten konnten in den analysierten Herzparametern (EF, Volumina) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. In einem Alter von circa 1 Jahr, zeigten sich in den CM GC-B KO Tieren signifikante Veränderungen der linksventrikulären Herzfunktion. Die Untersuchung der EF zeigte, dass die Knockout-Mäuse eine deutlich schlechtere Herzfunktion (EF: $35,8 \pm 3,6 \%$) aufwiesen als die Kontrolltiere (EF: $49,7 \pm 2,9 \%$). Zudem zeigten die CM GC-B KO Mäuse in einem Alter von 1 Jahr signifikant erhöhte end-diastolische ($32,8 \pm 2,6 \mu\text{l}$) und end-systolische ($25,1 \pm 3,1 \mu\text{l}$) Volumina gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 23).

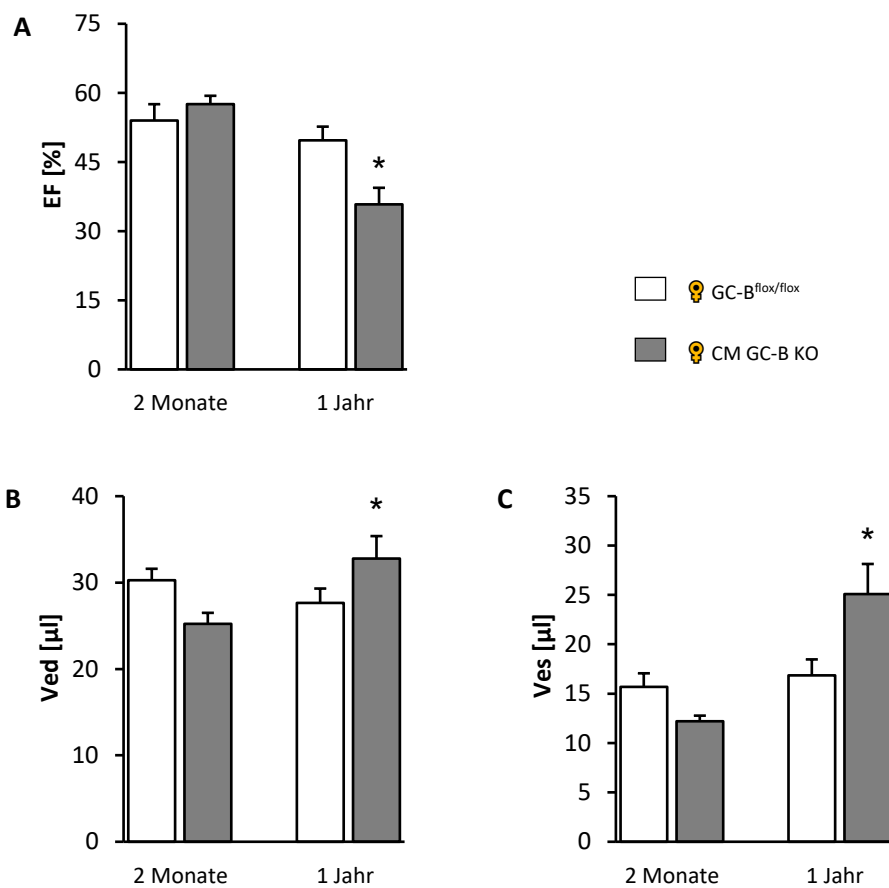


Abb. 23 Effekte des Alters auf die linksventrikuläre Pumpfunktion (A-C) Zeigen invasive hämodynamische Messungen der EF in %, des linksventrikulären end-diastolischen Volumens (Ved) und des linksventrikulären end-systolischen Volumens (Ves) in μl .
 2 Monate alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=14), CM GC-B KO (n=16), 1 Jahr alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=17), CM GC-B KO (n=16);
 *p<0.05 (vs GC-B^{flox/flox} 1 Jahr)

3.2.4.1.4 Einfluss des Alters bei weiblichen Mäusen auf die linksventrikuläre Phosphorylierung von Phospholamban (PLB)

Um mechanistische Ursachen für die dilatative Kardiomyopathie bei den alten CM GC-B KO-Weibchen zu finden, wurden die Protein-Expressionsspiegel von phosphoryliertem Phospholamban (pSer₁₆PLB) mittels Western Blot untersucht. Die quantitative Analyse von pPLB in Relation zum gesamten Phospholamban (tPLB) ergab in den beiden untersuchten Kollektiven keinen signifikanten Unterschied (Abb. 24).

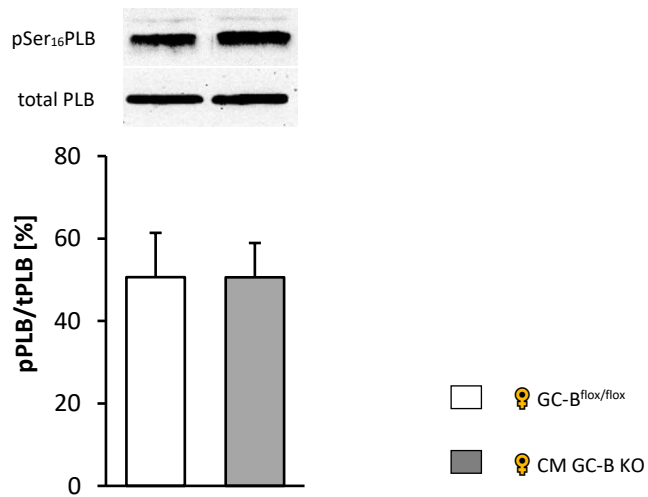


Abb. 24 Effekte des Alters auf die linksventrikuläre Phosphorylierung von Phospholamban Gezeigt wird die linksventrikuläre Protein-Expression des phosphorylierten Phospholamban (pPLB) an Serin 16. Das Molekulargewicht von pPLB und total Phospholamban (tPLB) liegt jeweils bei 25 kDa. Die Expression von pPLB wurde auf tPLB normiert.
1 Jahr alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=6), CM GC-B KO (n=6)

3.2.4.2 Untersuchungen in männlichen Mäusen

3.2.4.2.1 Einfluss des Alters bei männlichen Mäusen auf die Entwicklung einer Hypertrophie

Um eventuelle Unterschiede zwischen den Geschlechtern in der Entwicklung einer Herzhypertrophie zu erfassen, wurden auch männliche CM GC-B KO Tiere untersucht.

Die Nekropsie-Daten zeigten zwischen den beiden Genotypen (GC-B^{flox/flox} und CM GC-B KO) sowohl in einem Alter von 2 Monaten als auch in einem Alter von über einem Jahr keine signifikanten Unterschiede in den Körpergewicht-normierten Herzgewichten und in den Körpergewicht-normierten linksventrikulären Gewichten (Abb. 25).

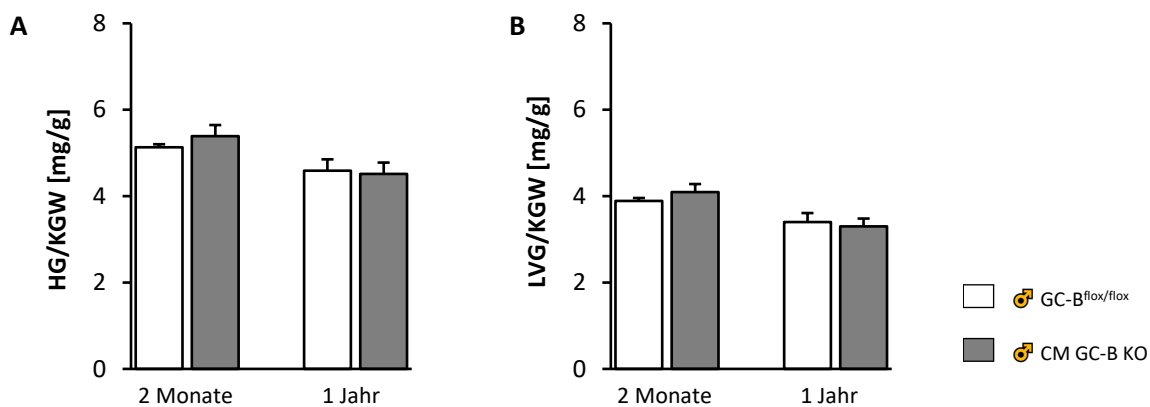


Abb. 25 Effekte des Alters auf die Entwicklung einer makroskopischen Herzhypertrophie (A) Zeigt ermittelte Herzgewichte (HG) und (B) linksventrikuläre Gewichte (LVG) normiert auf das jeweilige Körpergewicht (KGW) in mg/g.
2 Monate alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=9), CM GC-B KO (n=7), 1 Jahr alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=8), CM GC-B KO (n=9)

Auch auf zellulärer Ebene (Abb. 26) zeigten die Herzen der männlichen Mäuse unabhängig vom Alter keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (GC-B^{flox/flox} und CM GC-B KO).

A

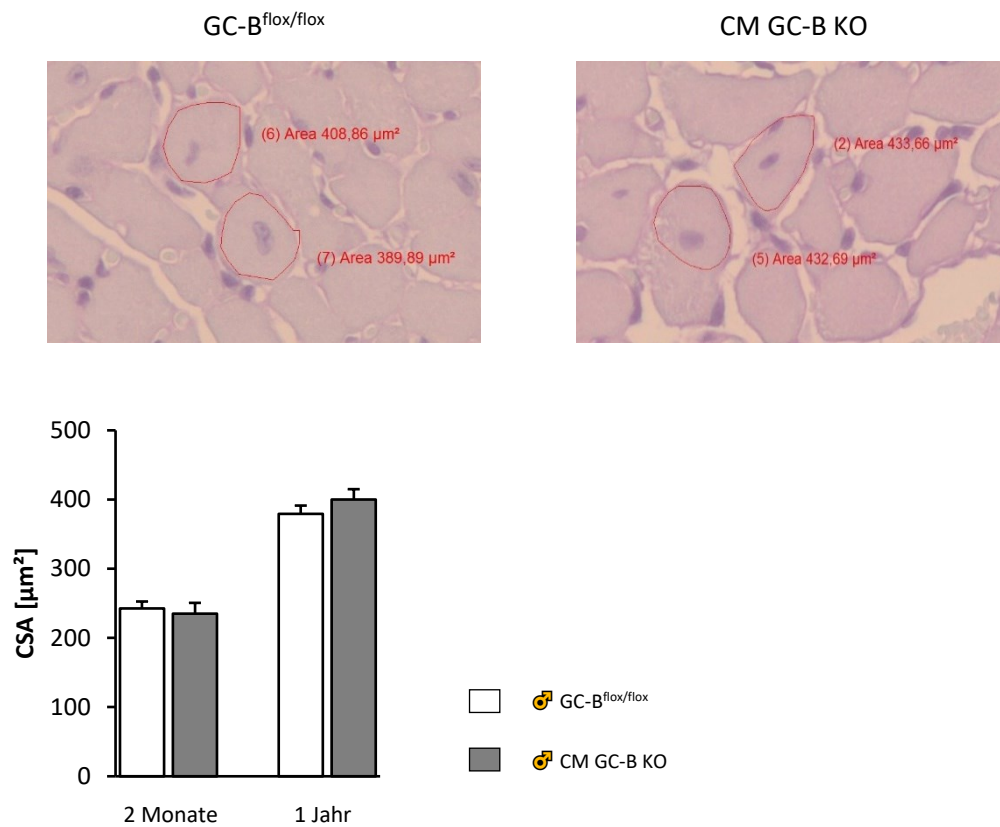


Abb. 26 Effekte des Alters auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie (A) Zeigt die Auswertung der linksventrikulären Kardiomyozytenflächen (CSA = cross sectional area) in μm^2 aus histologischen nach Periodic acid-Schiff Reaktion (PAS) gefärbten Herzpräparaten, es wurden jeweils 50 Kardiomyozyten pro Herzschnitt untersucht. 2 Monate alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=9), CM GC-B KO (n=7), 1 Jahr alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=8), CM GC-B KO (n=9)

3.2.4.2.2 Einfluss des Alters bei männlichen Mäusen auf die linksventrikuläre Pumpfunktion

Auch die Analyse der Herzparameter wie Ejektionsfraktion (EF), enddiastolisches Volumen (Ved) und endsystolisches Volumen (Ves) zeigte in den männlichen Mäusen in einem Alter von 2 Monaten sowie in einem Alter von über einem Jahr keine signifikanten Veränderungen zwischen den Genotypen (Abb. 27).

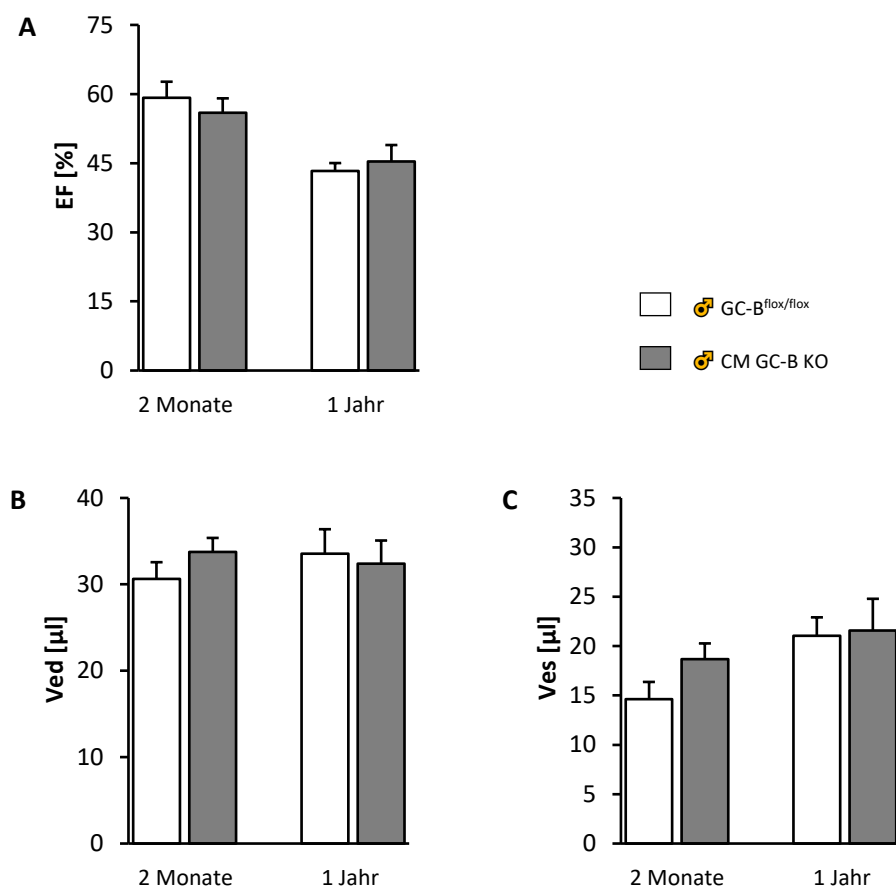


Abb. 27 Effekte des Alters auf die linksventrikuläre Pumpfunktion (A-C) Zeigen invasive hämodynamische Messungen der EF in %, des linksventrikulären end-diastolischen Volumens (Ved) und des linksventrikulären end-systolischen Volumens (Ves) in μ l.

2 Monate alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=9), CM GC-B KO (n=7), 1 Jahr alte Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=8), CM GC-B KO (n=9)

3.2.4.3 Genotyp-abhängiger Effekt auf die linksventrikuläre Herzfunktion im Alter

Weitere relevante Parameter der linksventrikulären hämodynamischen Messung wurden in Tabelle 26 dargestellt. In folgender Übersicht wurden nur die weiblichen und männlichen Mäuse in einem Alter von über einem Jahre miteinander verglichen, um die Genotyp-abhängigen Unterschiede zwischen den Geschlechtern deutlicher darzustellen. Die Pumpaktivität des Herzens (HZV) nimmt bei den KO-Weibchen, im Vergleich zu den Geschwisterkontrolltieren signifikant um circa 18 % ab. Das Schlagvolumen (SV) ist in CM GC-B KO Weibchen signifikant um circa 18 % geringer. Die maximalen Kontraktions- (dP/dt max) und Relaxationsraten (dP/dt min) verschlechterten sich in den KO-Weibchen gleichermaßen um circa 25 % im Vergleich zu den gleichaltrigen Geschwister-Kontrolltieren. Die Herzrate wurde durch das Alter (1 Jahr) in beiden Genotypen, Geschlecht-unabhängig nicht beeinflusst. Die CM GC-B KO Männchen zeigten in allen untersuchten Parametern keine signifikanten Veränderungen zwischen den Genotypen (GC-B^{flox/flox} und CM GC-B KO) (Tabelle 26).

Tabelle 26 Parameter der linksventrikulären Messung In der Tabelle werden das Herzzeitvolumen (HZV) in $\mu\text{l}/\text{min}$, das Schlagvolumen (SV) in μl , die Herzrate in Schlägen pro Minute (bpm) und die Kontraktions- (dP/dt max) bzw. Relaxationsraten (dP/dt min) in mmHg/s angegeben.

1 Jahr alte weibliche ♀ Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=17), CM GC-B KO (n=16)

1 Jahr alte männliche ♂ Tiere: GC-B^{flox/flox} (n=8), CM GC-B KO (n=9)

*p<0.05 (vs GC-B^{flox/flox})

	Weibchen 1 Jahr		Männchen 1 Jahr	
	GC-B ^{flox/flox}	CM GC-B KO	GC-B ^{flox/flox}	CM GC-B KO
HZV [$\mu\text{l}/\text{min}$]	7370,2 \pm 574,8	6048,8 \pm 473 *	6997 \pm 668,9	6065,2 \pm 502,4
SV [μl]	14,1 \pm 1	11,5 \pm 0,7 *	14,6 \pm 1,2	12,4 \pm 1
HR [bpm]	523,8 \pm 20,7	524,6 \pm 29,5	477,6 \pm 9,6	496,8 \pm 22,4
dP/dt max [mmHg/s]	8850,6 \pm 400,9	6429,5 \pm 422,9 *	6934 \pm 576,4	6312,6 \pm 263,9
dP/dt min [mmHg/s]	-8783,7 \pm 462,1	-6594,6 \pm 661,4 *	-7363 \pm 488,3	-6576,8 \pm 453,6

3.3 Morphologische und funktionelle kardiale Veränderungen in den CM GC-B KO Mäusen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC)

Nach erfolgreicher Validierung der CM GC-B KO Mauslinie und dem erbrachten Nachweis, dass exogenes, synthetisches CNP fast vollständig eine TAC-induzierte linksventrikuläre Dilatation in *C57Bl/6* Mäusen verhindert, wurde der Einfluss der Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des GC-B Rezeptors und somit die kardiale Rolle des endogenen CNP untersucht. Dafür wurde an den CM GC-B KO Mäusen und deren Geschwister-Kontrolltieren als experimentelles Hypertrophie Modell die transverse Aortenkonstriktion (TAC) für 3 und 14 Tage verwendet. Vorangegangene Versuche in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Franziska Werner zeigten, dass nach aortalem Banding in *C57Bl/6* Mäusen für 3, 7 und 14 Tage die mRNA Expression von CNP im Herzen nach 3 Tagen TAC signifikant anstieg und dann wieder abnahm. Aus diesem Grund haben wir uns für die beiden Untersuchungs-Zeitpunkte 3 und 14 Tage nach TAC entschieden.

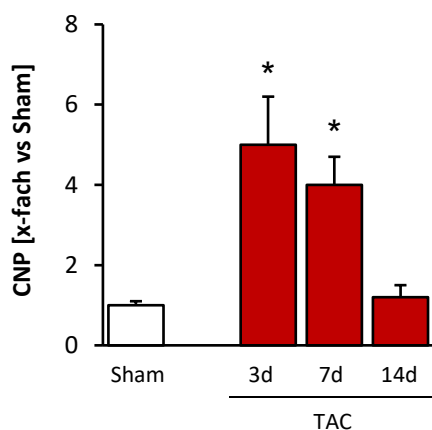


Abb. 28 Linksventrikuläre CNP mRNA Expression, basal und nach TAC in *C57Bl/6* Mäusen Die Abbildung zeigt quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von CNP normiert auf das Referenzgen S12. Sham (n=6), TAC 3d (n=4), TAC 7d (n=4), TAC 14d (n=5); *p<0.05 (vs Sham)

3.3.1 Erhöhung der Nachlast nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC

Unter Sham-Bedingungen wurde zwischen den beiden Genotypen (*GC-B^{flox/flox}* und CM GC-B KO) in Bezug auf den Aortendruck kein signifikanter Unterschied festgestellt. Nach TAC für 3 Tage stieg die Nachlast proximal zur Stenose (Aortendruck) in den Kontrolltieren auf $145,9 \pm 4,1$ mmHg und in den Knockout-Mäusen auf $146,6 \pm 4,3$ mmHg an. Nach 14 Tagen TAC stieg der Aortendruck in den Kontrollmäusen auf $158,2 \pm 5,3$ mmHg und in den CM GC-B KO Mäusen auf $163,9 \pm 7,5$ mmHg an (Abb. 29).

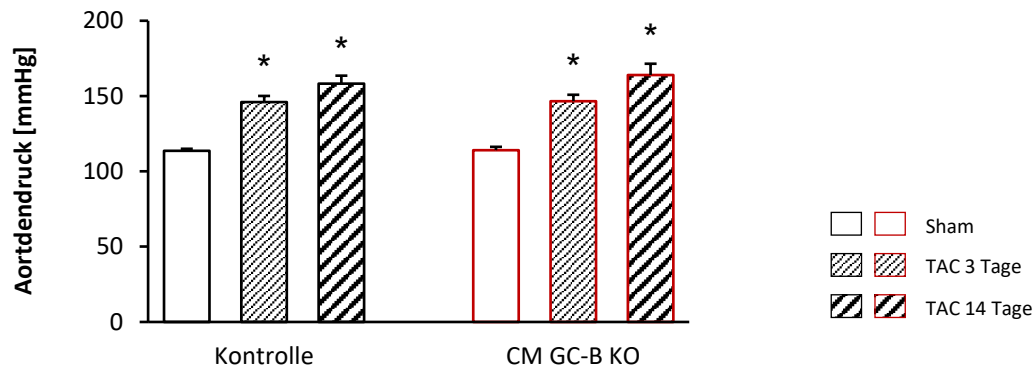


Abb. 29 Effekte der TAC auf die Nachlast in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen Die Abbildung zeigt invasive hämodynamische Messungen der Nachlast (Aortendruck) in mmHg in Kontrollmäusen (GC-B^{fl^{ox}/fl^{ox}}) und in Knockout-Mäusen nach TAC für 3 und 14 Tage. Sham (n=12 Kontrolltiere, 10 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=13 Kontrolltiere, 12 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=14 Kontrolltiere, 12 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. *p<0.05 (vs Sham)

3.3.2 Makroskopische Herzhypertrophie nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC

Die Druckbelastung durch Aortenkonstriktion provozierte eine progressive und signifikante Herzhypertrophie nach 3 und 14 Tagen. Dies zeigten auch die bei Nekropsie und Organentnahme gewonnenen Daten. Unter Sham-Bedingungen wurde wie zuvor auch in den Körpergewicht-normierten Herzgewichten sowie in den Körpergewicht-normierten linksventrikulären Gewichten zwischen den Genotypen kein Unterschied festgestellt. Nach 3-tägiger TAC stiegen die Körpergewicht-normierten Herzgewichte der Kontrollmäuse signifikant von $5,13 \pm 0,1$ mg/g (Sham) auf $6,6 \pm 0,4$ mg/g und die der Knockout-Mäuse von $5,18 \pm 0,2$ mg/g (Sham) auf $6,3 \pm 0,4$ mg/g an. Auch die Körpergewicht-normierten linksventrikulären Gewichte stiegen in den Kontrollmäusen signifikant nach 3 Tagen TAC auf $4,9 \pm 0,3$ mg/g und in den KO-Mäusen auf $4,7 \pm 0,3$ mg/g an. Die 14-tägige Druckbelastung führte zu einem weiteren signifikanten Anstieg der HG/KGW (Kontrolltiere: $7,3 \pm 0,5$ mg/g; CM GC-B KO: $6,5 \pm 0,4$ mg/g) und LVG/KGW Ratio's (Kontrollen: $5,8 \pm 0,4$ mg/g; CM GC-B KO: $5,2 \pm 0,3$ mg/g), jedoch zeigten beide Zeitpunkte keine Genotyp-abhängigen Unterschiede (Abb. 30).

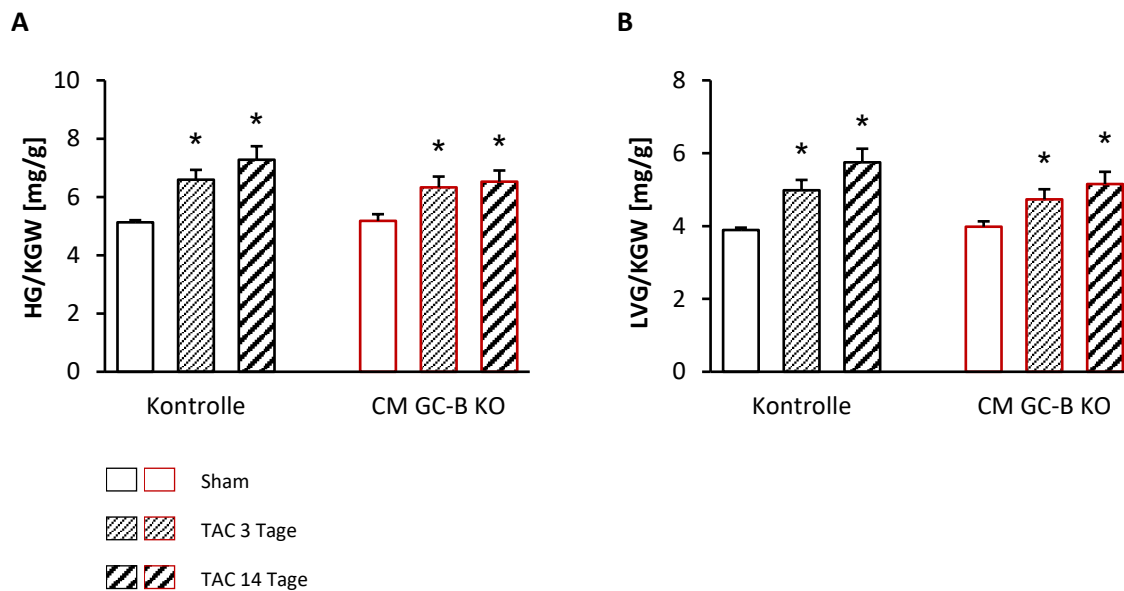
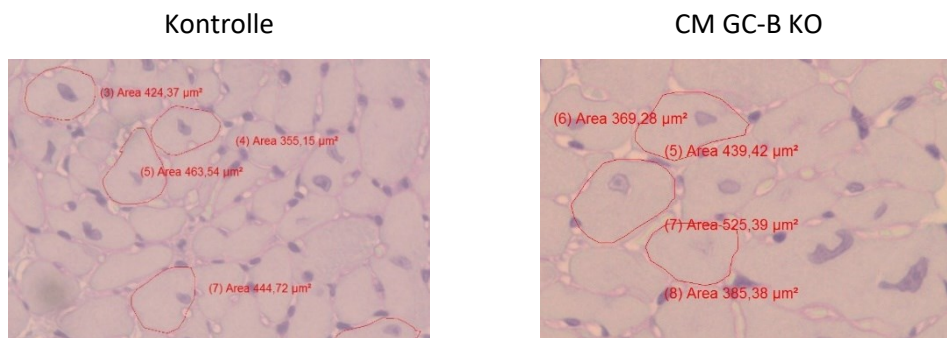


Abb. 30 Effekte der TAC auf die Entwicklung einer makroskopischen Herzhypertrophie in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A) Zeigt ermittelte Herzgewichte (HG) und (B) linksventrikuläre Gewichte (LVG) normiert auf das jeweilige Körpergewicht (KGW) in mg/g. Sham (n=13 Kontrolltiere, 10 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=15 Kontrolltiere, 12 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=15 Kontrolltiere, 12 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. *p<0.05 (vs Sham)

Die histologische Begutachtung der TAC-induzierten Herzhypertrophie zeigte, wie bereits aus den Nekropsie-Daten angedeutet, eine signifikante Zunahme der Kardiomyozytenflächen in beiden Genotypen. Allerdings zeigte sich nach 3 Tagen TAC, dass die Kardiomyozytenflächen der Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant größer waren. Die Fläche der Myozyten betrug nach 3 Tagen TAC $283,4 \pm 11,1 \mu\text{m}^2$ in den Kontrollmäusen und $318,9 \pm 10,4 \mu\text{m}^2$ in den Knockout-Mäusen. Nach 14 Tagen TAC, konnte dieses Genotyp-abhängige Ergebnis nicht detektiert werden. Hier verdoppelte sich die Kardiomyozytenfläche in den Kontrollmäusen auf $420,2 \pm 26,2 \mu\text{m}^2$ und in den Knockout-Mäusen auf $412,8 \pm 18,5 \mu\text{m}^2$. Die Bestimmung der mRNA Expression des Hypertrophiemarkers BNP zeigte einen signifikanten Genotyp-unabhängigen Anstieg nach 3 und 14 Tagen TAC, im Vergleich zu Sham-Bedingungen.

A



B

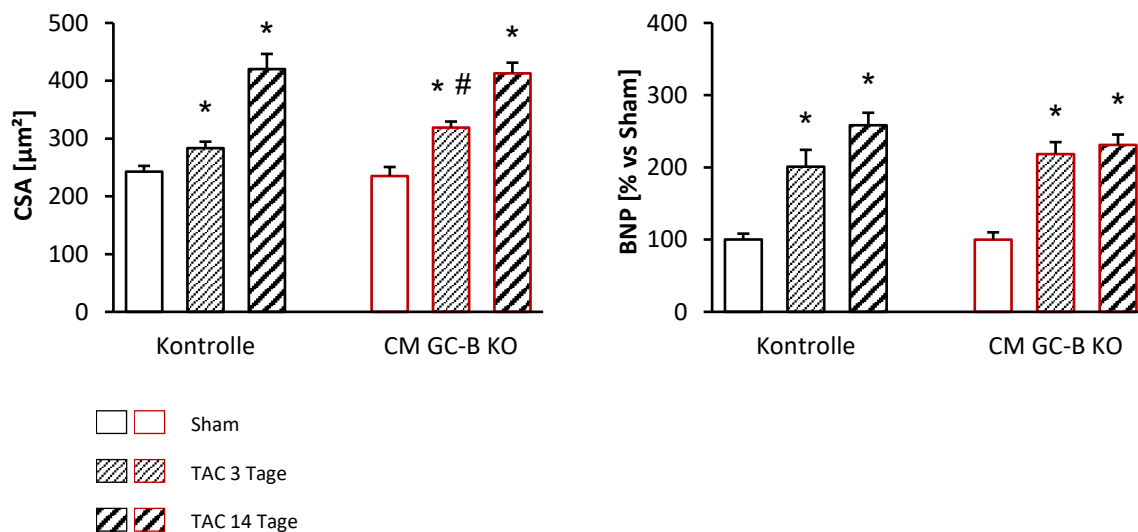


Abb. 31 Effekte der TAC auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A) Zeigt linksventrikuläre Kardiomyozytenflächen (CSA = cross sectional area) in μm^2 ermittelt aus histologischen nach Periodic acid-Schiff Reaktion (PAS) gefärbten Herzpräparaten, für jede Bedingung wurden jeweils 50 Kardiomyozyten pro Herzschnitt ausgewertet. (B) Zeigt quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von BNP normiert auf das Referenzgen S12. Sham (n=8 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=6 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=8 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor.
* $p < 0.05$ (vs Sham); # $p < 0.05$ (vs TAC über 3 Tage in Kontrolltieren)

Des Weiteren wurden die Längen der einzelnen Kardiomyozyten bestimmt. Nach Auswertung der Pan-Cadherin gefärbten linksventrikulären Herzgewebeschnitte zeigte sich unter Sham-Bedingungen zwischen den Genotypen kein Unterschied. Nach 3 Tagen TAC nahm in den Knockout-Mäusen die Myozytenlänge von $74,6 \pm 2,8 \mu\text{m}$ (Sham) signifikant auf $82,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$ zu. Die 14-tägige TAC bewirkte einen weiteren signifikanten Anstieg der Kardiomyozytenlänge auf $92,3 \pm 3,0 \mu\text{m}$ (Abb. 32). Dies wurde in den Kontrollmäusen nicht beobachtet.

A

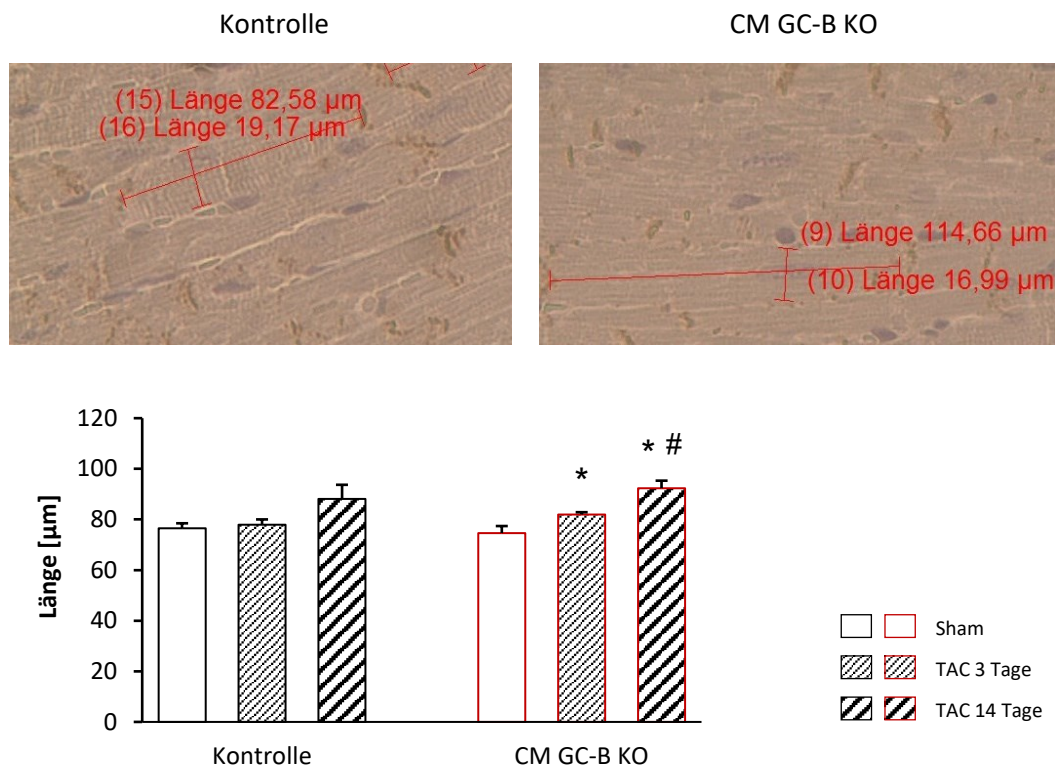
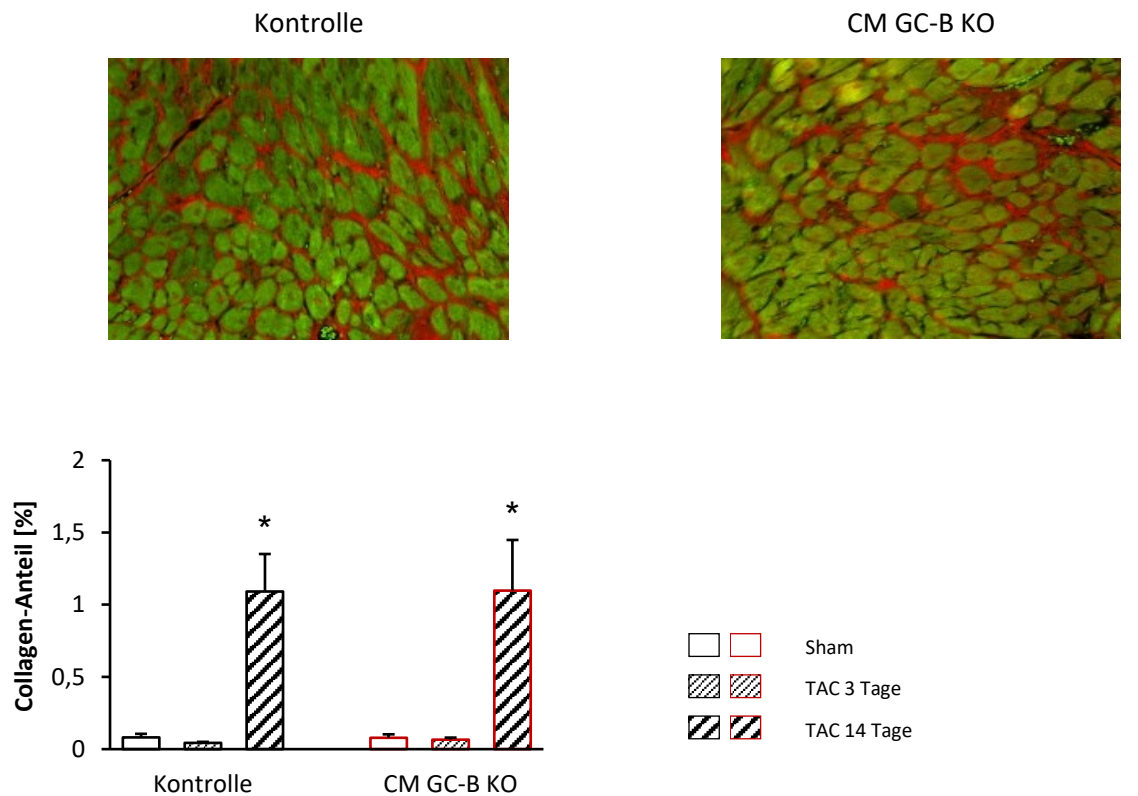


Abb. 32 Effekte der TAC auf die Länge der linksventrikulären Kardiomyozyten in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A) Zeigt linksventrikuläre Kardiomyozytenlängen in μm ermittelt aus histologischen mittels Pan-Cadherin gefärbten Herzpräparaten. In Braun werden die Z-Scheiben angezeigt. Für jede Bedingung wurden jeweils 50 Kardiomyozyten pro Herzschnitt ausgewertet. Sham (n=8 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=6 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=8 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. * $p < 0.05$ (vs Sham); # $p < 0.05$ (vs TAC über 3 Tage in CM GC-B KO Tieren)

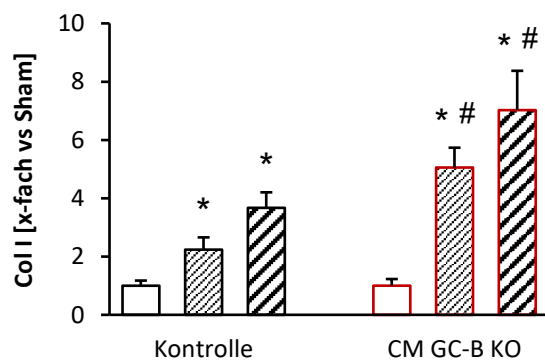
3.3.3 Linksventrikuläre interstitielle Fibrose nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC

Die Bestimmung des Kollagenfaser-Anteils in Prozent (%) bezogen auf die betrachtete Fläche zeigte, dass zwischen den beiden Genotypen (Kontrollmäuse und CM GC-B KO Mäuse) kein signifikanter Unterschied bestand. Der Kollagenfaser-Anteil im Interstitium des linksventrikulären Myokards war nach 3-tägiger TAC nicht erhöht. Nach zweiwöchiger TAC war der Kollagenanteil signifikant erhöht und betrug $1,1 \pm 0,3$ % der Fläche in den Kontrollmäusen und $1,1 \pm 0,4$ % in den CM GC-B KO Mäusen. In Diskrepanz zur Morphologie war die mRNA Expression von Kollagen I (Col I) nach 3- und 14-tägiger Aortenkonstriktion in den CM GC-B KO Mäusen verglichen mit den Kontrollmäusen signifikant erhöht. In den KO-Mäusen stieg die mRNA Expression nach 3 Tagen TAC auf $5,1 \pm 0,7$ x-fach vs Sham und nach 14 Tagen TAC auf $7,0 \pm 1,3$ x-fach vs Sham an. Die mRNA Expression in den Kontrollmäusen stieg lediglich auf $2,2 \pm 0,4$ x-fach vs Sham nach 3-tägiger TAC an und nach 14 Tagen TAC auf $3,7 \pm 0,5$ x-fach vs Sham. Die mRNA Expressionsspiegel von CTGF stiegen mit dem zeitlichen Verlauf der TAC an, jedoch ohne Genotyp-abhängige Unterschiede (Abb. 33).

A



B



C

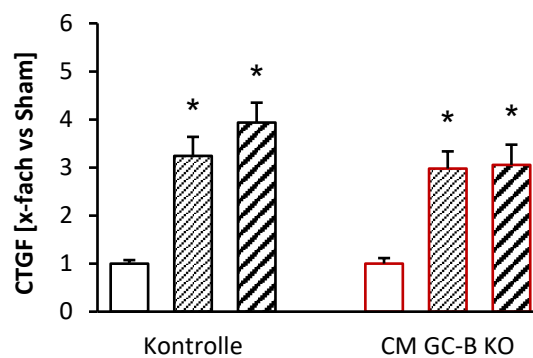


Abb. 33 Effekte der TAC auf die linksventrikuläre interstitielle Fibrose in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A)

Zeigt den linksventrikulären interstitiellen Kollagen Anteil in % ermittelt aus histologischen nach Siriusrot gefärbten Herzpräparaten, für jede Bedingung wurden pro Maus 15 Fluoreszenzbilder aufgenommen und mittels digitaler Addition und Subtraktion die relative Fläche des Kollagens bestimmt. In Grün wurden die Kardiomyozyten dargestellt und die interstitiellen Kollagenfasern wurden in Rot angezeigt.

Sham (n=5 Kontrolltiere, 5 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=9 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=14 Kontrolltiere, 10 CM GC-B KO Tiere).

(B) und (C) Zeigen quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von Col I und CTGF normiert auf das Referenzgen S12.

Col I und CTGF: Sham (n=8 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=6 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=8 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. *p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC über 3 und 14 Tage in Kontrolltieren)

3.3.4 Linksventrikuläre Pumpfunktion nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC

Mithilfe der linksventrikulären Katheterisierung wurde die Entwicklung verschiedener kardialer Parameter untersucht. Während in den Kontrollmäusen die EF nach 3- und 14-tägiger TAC nur leicht beeinträchtigt war, reagierten die CM GC-B KO Mäuse auf 3 Tage TAC mit einem signifikanten Abfall der EF von $55,8 \pm 2,4$ % (Sham) auf $31,5 \pm 3,0$ %. Nach 14 Tagen TAC stieg die EF wieder auf $43,7 \pm 3,9$ % an. Das end-diastolische Volumen (Ved) sowie das end-systolische Volumen (Ves) zeigte in den KO-Mäusen nach 3-tägiger TAC einen signifikanten Anstieg von $33,4 \pm 1,5$ μ l (Sham) auf $40,9 \pm 2,2$ μ l (Ved) und von $18,0 \pm 1,4$ μ l (Sham) auf $31,6 \pm 2,6$ μ l (Ves). Nach 14 Tagen TAC sank sowohl das end-diastolische Volumen ($31,1 \pm 1,4$ μ l) als auch das end-systolische Volumen ($21,5 \pm 1,6$ μ l) signifikant auf Basal-Niveau ab. Diese Modulationen wurden in den Kontrollmäusen nach 3 Tagen Aortenkonstriktion nicht beobachtet (Abb. 34). Die signifikant erhöhten linksventrikulären Volumina der CM GC-B KO Mäuse nach TAC deuten auf eine frühe (nach 3 Tagen TAC) linksventrikuläre Dilatation hin. Diese frühen Veränderungen wurden in den Kontrollmäusen nicht beobachtet.

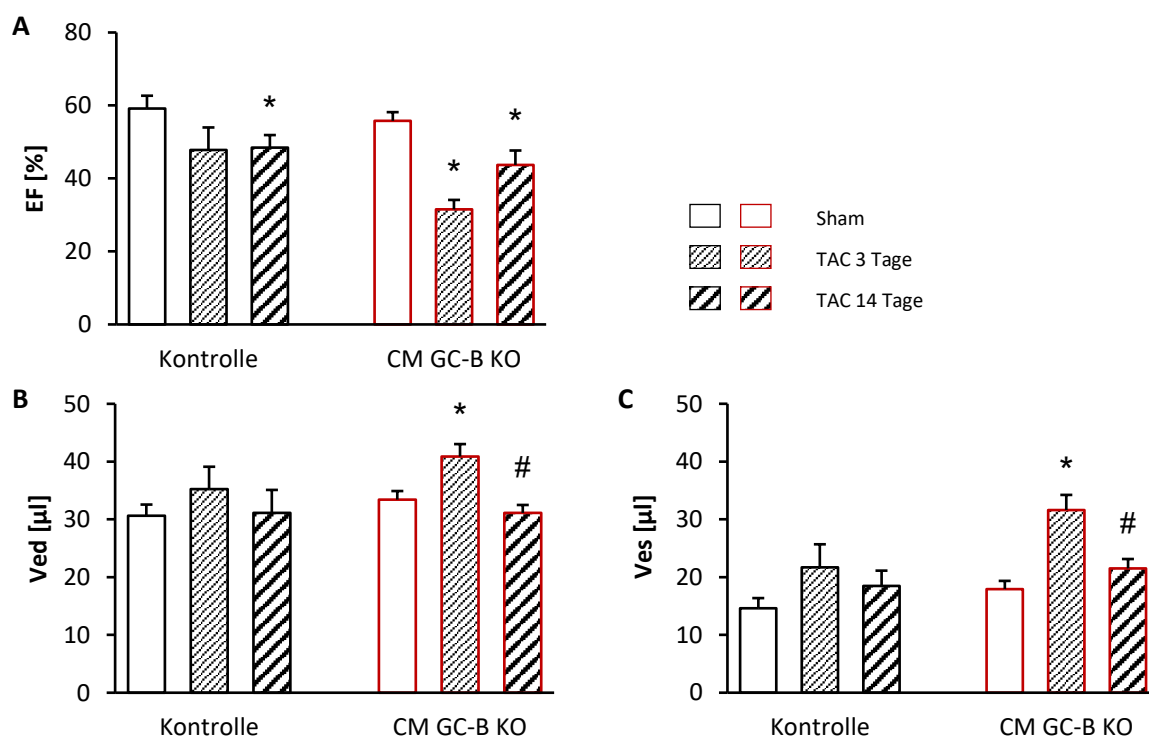


Abb. 34 Effekte der TAC auf die linksventrikuläre Pumpfunktion in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A-C) Zeigen invasive hämodynamische Messungen der EF in %, des linksventrikulären end-diastolischen Volumens (Ved) und des linksventrikulären end-systolischen Volumens (Ves) in μ l.

Sham (n=10 Kontrolltiere, 10 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=8 Kontrolltiere, 9 CM GC-B KO Tiere),

TAC 14 Tage (n=10 Kontrolltiere, 10 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. *p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC über 3 Tage in CM GC-B KO Tieren)

Andere relevante Parameter der linksventrikulären hämodynamischen Messung wurden in Tabelle 27 dargestellt. Um die Leistung des Herzens nach einer Druckbelastung besser beurteilen zu können, wurden wie auch zuvor die Pumpaktivität (Herzzeitvolumen, HZV) und das Schlagvolumen (SV) untersucht. Nach 3- und 14-tägiger TAC verschlechterte sich das HZV um circa 31 % und das SV um circa 35 % im Vergleich zu Sham, Genotyp-unabhängig. Die Herzrate stieg in den Mäusen mit 3 Tagen TAC in beiden Genotypen signifikant zu den Sham-Tieren an. Nach 14 Tagen TAC war dies lediglich in den CM GC-B KO Mäusen nachzuweisen. Die maximalen Kontraktions- ($dp/dt \text{ max}$) und Relaxationsraten ($dp/dt \text{ min}$) verringerten sich nach 3 Tage TAC um 14 % ($dp/dt \text{ max}$) und um 17 % ($dp/dt \text{ min}$) signifikant zur Sham-Gruppe. Alle aufgeführten Herzparameter zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen.

Tabelle 27 Effekte der TAC auf weitere Parameter der linksventrikulären hämodynamischen Messung in Kontrolltieren

und in CM GC-B KO Mäusen Gezeigt werden das Herzzeitvolumen (HZV) in $\mu\text{l}/\text{min}$, das Schlagvolumen (SV) in μl , die Herzrate in Schlägen pro Minute (bpm) und die Kontraktions- (dP/dt max) bzw. Relaxationsraten (dP/dt min) in mmHg/s. Sham (n=10 Kontrolltiere, 10 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=8 Kontrolltiere, 9 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=10 Kontrolltiere, 10 CM GC-B KO Tiere). *p<0.05 (vs Sham)

	Sham	
	Kontrolle	CM GC-B KO
HZV [$\mu\text{l}/\text{min}$]	9554,5 \pm 588,9	9934,7 \pm 370,1
SV [μl]	18,1 \pm 1	18,8 \pm 0,6
HR [bpm]	527,8 \pm 16,8	530,5 \pm 14,1
dP/dt max [mmHg/s]	10401,7 \pm 665,1	10304,1 \pm 480,7
dP/dt min [mmHg/s]	-9622,3 \pm 670,4	-9942,4 \pm 480,5

	TAC 3 Tage	
	Kontrolle	CM GC-B KO
HZV [$\mu\text{l}/\text{min}$]	6849,5 \pm 651 *	7350,7 \pm 441,8 *
SV [μl]	11,7 \pm 1,3 *	12,4 \pm 0,8 *
HR [bpm]	597,5 \pm 20 *	594,5 \pm 12,1 *
dP/dt max [mmHg/s]	8700,6 \pm 561,7 *	8384,5 \pm 409,2 *
dP/dt min [mmHg/s]	-7074,2 \pm 737,4 *	-6861,5 \pm 590,5 *

	TAC 14 Tage	
	Kontrolle	CM GC-B KO
HZV [$\mu\text{l}/\text{min}$]	5952,8 \pm 489,1 *	7041,6 \pm 730,2 *
SV [μl]	11,3 \pm 1,1 *	12,4 \pm 1,5 *
HR [bpm]	539,6 \pm 15,9	579,5 \pm 13,5 *
dP/dt max [mmHg/s]	9052,5 \pm 356,2	9765,1 \pm 481,8
dP/dt min [mmHg/s]	-8992,6 \pm 491,2	-9574,3 \pm 740,6

3.3.5 Linksventrikuläre Phosphorylierung von Phospholamban und Titin nach 3-tägiger TAC

Um die Ursache der frühen linksventrikulären Dilatation der CM GC-B KO Mäuse zu finden, wurde die linksventrikuläre Protein-Expression von pPLB (pSer₁₆PLB) und pTitin (pSer₄₀₈₀Titin) untersucht. Die quantitative Analyse von pPLB in Relation zum Gesamt-Phospholamban (tPLB) zeigte eine Erhöhung des Quotienten bei den operierten Tieren nach 3 Tagen TAC in beiden Genotypen. Der pPLB Anstieg zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockout-Mäusen. Die Untersuchung der Phosphorylierung des sarkomerischen Proteins Titin an Serin 4080 (die PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle) hingegen, zeigte deutliche Genotyp-abhängige Veränderungen in der Expression. Die Phosphorylierung von Titin war nach 3 Tagen TAC signifikant in den Kontrollmäusen erhöht. Dieser Effekt blieb in den Knockout-Mäusen aus (Abb. 35).

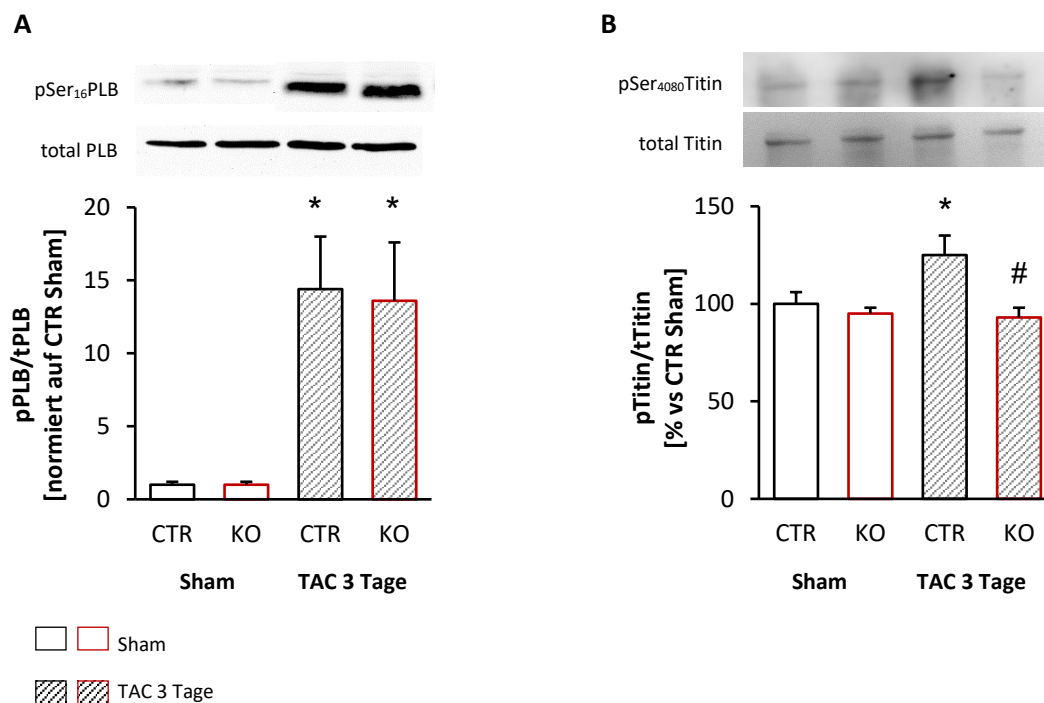


Abb. 35 Effekte der TAC auf die linksventrikuläre Expression und Phosphorylierung von PLB und Titin in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A und B) Zeigen die linksventrikuläre Protein-Expression von (A) phosphoryliertem Phospholamban (pPLB) an Serin 16 und (B) von phosphoryliertem Titin (pTitin) an Serin 4080. Das Molekulargewicht von pPLB und total Phospholamban (tPLB) liegt jeweils bei 25 kDa und von pTitin bei 3200 kDa. Die Expression von pPLB wurde auf tPLB und die Expression von pTitin auf tTitin normiert.

pPLB: Sham (n=4 Kontrolltiere, 4 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=4 Kontrolltiere, 4 CM GC-B KO Tiere).

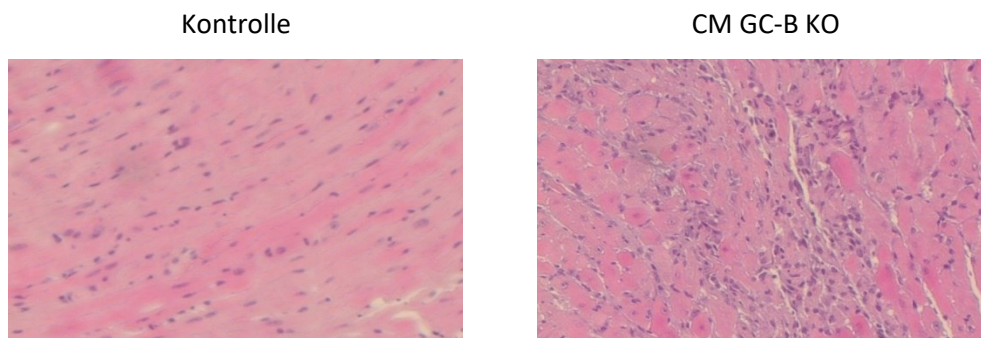
pTitin: Sham (n=8 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=8 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor.

*p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC über 3 Tage in Kontrolltieren)

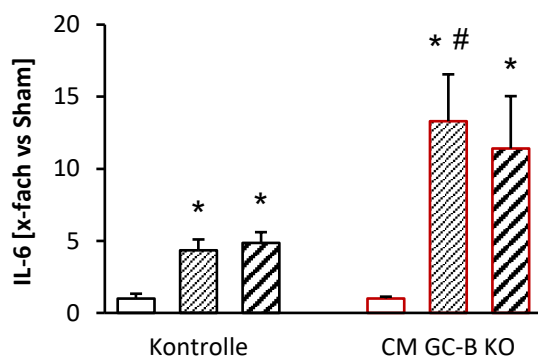
3.3.6 mRNA Expression von inflammatorischen Proteinen im linken Ventrikel nach 3-tägiger bzw. 2-wöchiger TAC

In den nach Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) gefärbten Herzschnitten nach 3 Tagen TAC von Kontroll- und CM GC-B KO Mäusen, ist nach visueller Begutachtung, eine deutliche Leukozyten-Infiltration des Herzgewebes der KO-Tiere zu sehen. Man erkennt in den Herzschnitten der CM GC-B KO Tiere auffällig mehr violett gefärbte Zellkerne von Leukozyten, verglichen mit den HE-gefärbten Herzschnitten der Kontrollen. Dies deutet auf mehr Entzündungsreaktionen in den Mäusen ohne den CNP-spezifischen GC-B Rezeptor in Kardiomyozyten hin. Das wurde mittels quantitativer real time-PCR Analyse bestätigt. Die linksventrikuläre mRNA Expression von IL-6 stieg in den Knockout-Mäusen nach 3-tägiger TAC auf $13,4 \pm 5,2$ x-fach vs Sham, im Vergleich zu den Kontrolltieren an. Dieser enorme Anstieg der IL-6 mRNA Expression konnte in den Kontrolltieren nicht beobachtet werden. Die mRNA Expression stieg nach 3 Tagen TAC auf $4,3 \pm 0,7$ x-fach vs Sham an. Nach 14 Tagen Aortenkonstriktion blieb die IL-6 mRNA Expression auf dem Niveau wie nach 3 Tagen TAC (TAC 14 Tage: $4,8 \pm 0,7$ x-fach vs Sham) bestehen. In den KO-Mäusen nahm die TAC-induzierte Hoch-Regulation von IL-6 leicht ab ($11,4 \pm 3,6$ x-fach vs Sham). Die mRNA Expression des Zytokins Cxcl-1 stieg in den CM GC-B KO Mäusen nach 3-tägiger TAC um $1,2 \pm 0,2$ x-fach vs Sham und nach 14-tägiger TAC um $1,9 \pm 0,2$ x-fach vs Sham an. Diese Veränderungen in der mRNA Expression waren in den Kontrollmäusen nicht zu beobachten. Hier ging die Expression von Cxcl-1 nach TAC sogar leicht zurück (Abb. 36).

A



B



C

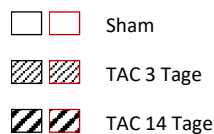
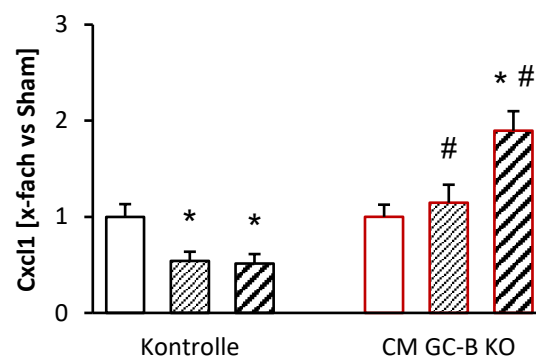


Abb. 36 Effekte der TAC auf die linksventrikuläre mRNA Expression von Zytokinen in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A) Zeigt linksventrikuläre histologische nach Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) gefärbte Herzpräparate. (B)

Zeigt quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von IL-6 und (C) von Cxcl-1 normiert auf das Referenzgen S12.

Sham (n=8 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=6 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere),

TAC 14 Tage (n=8 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. *p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC über 3 Tage in Kontrolltieren)

3.3.7 Linksventrikuläre Expression der NADPH Oxidase 4 (NOX4)

Um zu untersuchen, ob endogenes CNP nach einer TAC-induzierten Druckbelastung des linken Ventrikels die Bildung freier Sauerstoffradikale hemmen kann, wurde die Protein-Expression der Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) Oxidase 4 (NOX4) untersucht. Die quantitative Analyse von NOX4 in Relation zum Referenzprotein GAPDH zeigte eine signifikante Erhöhung des Quotienten in den Knockout-Mäusen nach 3-tägiger TAC, im Vergleich zu den operierten Kontrolltieren. Dieses Ergebnis wurde durch die Bestimmung der mRNA Expression der NADPH Oxidase 4 bestätigt. Nach 3 Tagen TAC stieg die mRNA Expression von NOX4 in den KO-Tieren

signifikant auf $1,2 \pm 0,1$ x-fach vs Sham, im Vergleich zu den operierten Kontrolltieren an. Die zweiwöchige Aortenkonstriktion führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg mRNA Expression von NOX4 in CM GC-B KO Mäusen ($3,2 \pm 0,5$ x-fach vs Sham) im Vergleich zu den Kontrolltieren ($1,7 \pm 0,1$ x-fach vs Sham) (Abb. 37).

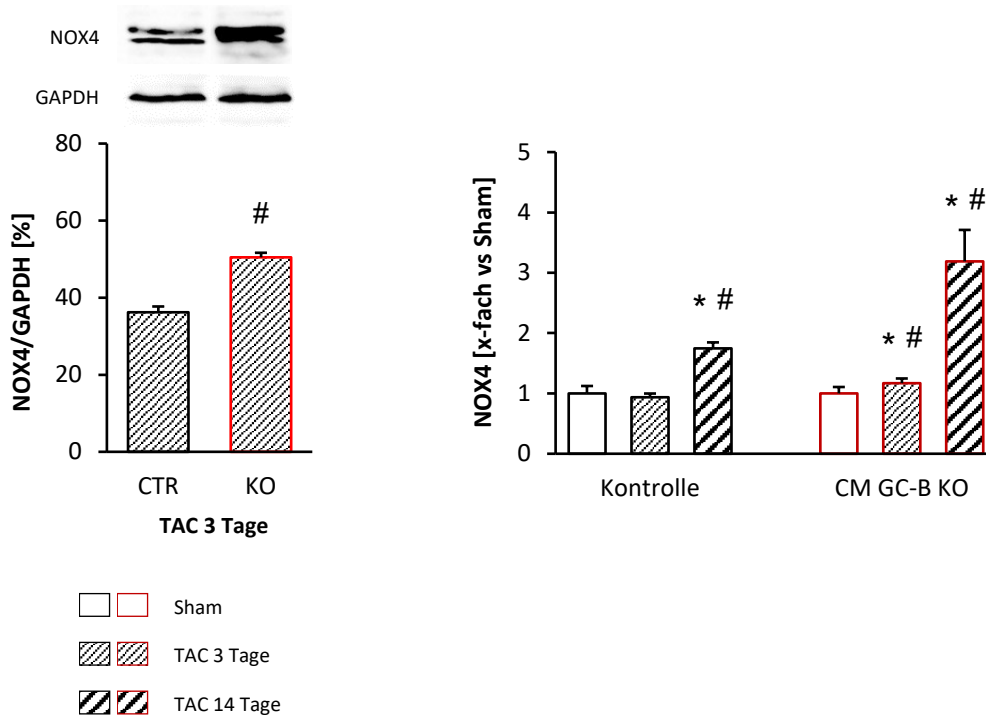


Abb. 37 Effekte der TAC auf die Expression der NADPH Oxidase 4 in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen (A) Zeigt die linksventrikuläre Protein-Expression von NOX4 normiert auf GAPDH (37 kDa). Das Molekulargewicht von NOX4 liegt bei 67 kDa. (B) Zeigt quantitative real time-PCR Analysen der linksventrikulären mRNA Expression von NOX4 normiert auf das Referenzgen S12.

NOX4 Western Blot: (n=4 Kontrolltiere, 4 CM GC-B KO Tiere);

NOX4 qRT-PCR: Sham (n=8 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 3 Tage (n=6 Kontrolltiere, 7 CM GC-B KO Tiere), TAC 14 Tage (n=8 Kontrolltiere, 8 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. *p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC über 3 Tage in Kontrolltieren)

3.3.8 Linksventrikuläre Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3)

Der Phosphorylierungsgrad des Transkriptionsfaktors STAT3 und die damit einhergehende mögliche anti-apoptotische Wirkung, könnte eine eventuelle Erklärung der frühen Dilatation in den CM GC-B KO Mäusen nach 3-tägiger TAC darstellen. Aus diesem Grund wurden die Protein-Expressionsspiegel von phosphoryliertem STAT3 (pTyr₇₀₅STAT3) in linksventrikulären Gewebelysaten untersucht. 3 Tage TAC führte in den Kontrolltieren zu einem signifikanten Anstieg der pSTAT3 Protein-Expression, im Vergleich zur Sham-Bedingung. Dieser Anstieg konnte in den CM GC-B KO Mäusen nach 3-tägiger TAC nicht detektiert werden (Abb. 38).

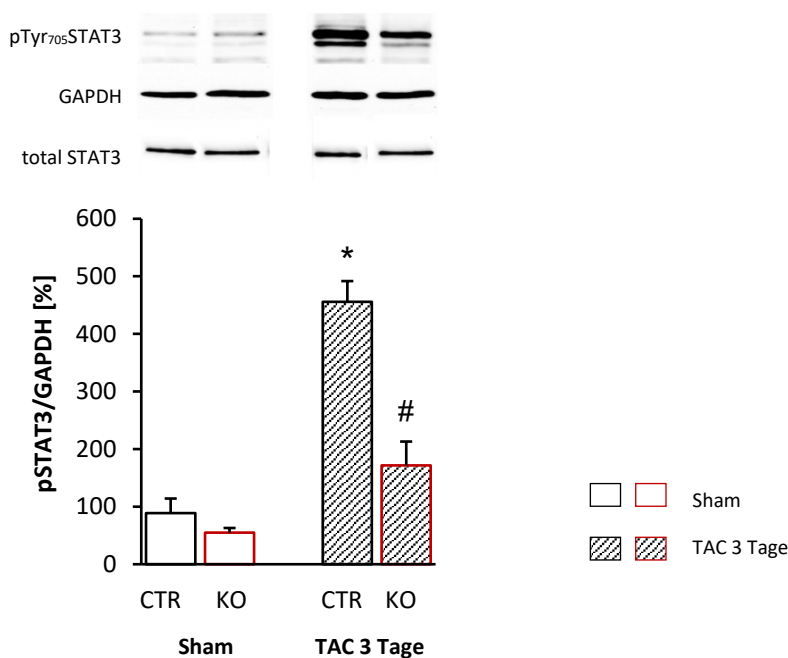


Abb. 38 Effekte der TAC auf die linksventrikuläre Phosphorylierung von STAT3 in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen Gezeigt werden die linksventrikuläre Protein-Expression von phosphoryliertem STAT3 an Tyrosin 705 normiert auf GAPDH (37 kDa). Das Molekulargewicht von pSTAT3 und total STAT3 (tSTAT3) liegt jeweils bei 79 - 86 kDa. Sham (n=3 Kontrolltiere, 3 CM GC-B KO Tiere); TAC 3 Tage (n=4 Kontrolltiere, 4 CM GC-B KO Tiere). Die rot umrahmten Balken, heben die Ergebnisse der CM GC-B KO Mäuse hervor. *p<0.05 (vs Sham); #p<0.05 (vs TAC über 3 Tage in Kontrolltieren)

4 Diskussion

4.1 Induktion der kardialen CNP mRNA-Expression bei akuter Druckbelastung des Herzens durch transverser Aortenkonstriktion (TAC)

Anhand des in Abb. 28 gezeigten Ergebnisses lässt sich feststellen, dass die CNP mRNA-Expression nach pathologischer Druckbelastung (TAC) signifikant, im Vergleich zur Sham-Bedingung (basal) ansteigt. Der höchste Anstieg der CNP-Expression lässt sich nach 3 Tagen transverser Aortenkonstriktion detektieren. Nach 7 Tagen TAC ist bereits ein Rückgang der mRNA-Expression zu erkennen, welcher nach 14 Tagen TAC dann bis auf Basal-Niveau absinkt. Dies deutet darauf hin, dass die kardiale CNP-Expression unter physiologischen Bedingungen (basal) im Herzen sehr niedrig ist, allerdings während pathologischen Bedingungen (z.B. nach TAC) signifikant ansteigt, wobei das Ausmaß von der Schwere und Art der kardiovaskulären Erkrankung abhängig ist.

Die basalen Plasmakonzentrationen von CNP liegen mit 1 – 3 pM weit unter denen von ANP und BNP (circa 30 – 50 pM). Zudem hat CNP mit einer Halbwertszeit von 2,6 min, im Gegensatz zu ANP/BNP mit 2 - 5 min, die kürzeste Halbwertszeit der natriuretischen Peptide (Emdin 2005, Hunt 1994, Potter 2006). In Übereinstimmung mit den hier gemachten Beobachtungen, dass die kardiale CNP-Expression nach TAC ansteigt, zeigen klinische Studien mit Patienten, die an chronischer Herzinsuffizienz leiden, ebenso erhöhte CNP-Plasmakonzentrationen (3,2 – 5,5 pM) (Del Ry 2005). Dass die kardiale CNP mRNA-Expression sowie CNP-Plasmaspiegel im Rahmen einer Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz ansteigen, könnte auf eine pathophysiologische Rolle des Hormons hindeuten.

CNP wird nicht wie ANP und BNP in den Granula von Kardiomyozyten gelagert, sondern hauptsächlich von Endothelzellen sezerniert (Del Ry 2011, Del Ry 2013). Auslöser für die Sekretion von CNP aus Endothelzellen können unter anderem Schubspannung, Hypoxie und verschiedene Zytokine wie TNF- α , TGF- β und IL-1 sein, welche während des kardiovaskulären Remodeling oder bei inflammatorischen Prozessen freigesetzt werden (Chun 1997, Del Ry 2013). Die genauen Induktoren von CNP nach einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) im Mausmodell sind noch nicht bekannt. Allerdings ist bekannt, dass nach einer experimentell durchgeführten Druckbelastung des Herzens (TAC) ein Entzündungsprozess ausgelöst wird. Die durch TAC-induzierte transiente Entzündungsreaktion geht mit einer Hochregulierung pro-inflammatorischer Zytokine einher, die von Immunzellen freigesetzt werden. Xia et al. zeigte einen signifikanten Anstieg von TNF- α und IL-1 β nach 3-tägiger Aortenkonstriktion. Die akute Hochregulation von TNF- α - und IL-1 β mRNA-Transkripten nach 3 Tagen TAC könnten für die Regulierung der Sekretion von CNP aus verschiedenen Herzzellen verantwortlich sein. Da die Expression dieser Zytokine auch nach 3 Tagen TAC akut erhöht ist, könnten diese Faktoren eine Rolle bei der Induktion von CNP in den frühen Stadien einer Druckbelastung des Herzens spielen (Xia 2009).

4.2 CM GC-B KO Mäuse haben eine effiziente und spezifische Deletion des GC-B Rezeptors in Kardiomyozyten

Es ist bekannt, dass der GC-B Rezeptor im Herzen von Kardiomyozyten, Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten exprimiert wird. Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. einer Herzinsuffizienz bleibt die Expression und die Aktivität des GC-B Rezeptors weitestgehend erhalten, im Gegensatz zu GC-A. Dies könnte daraufhin deuten, dass CNP während einer Herzerkrankung, eine spezielle Rolle als protektives Hormon einnimmt (Dickey 2012). In pharmakologischen Studien mit synthetischem CNP konnten ebenso anti-hypertrophe Effekte beschrieben werden (Soeki 2005), allerdings mit verwendeten CNP-Konzentrationen, die weit über den natürlich vorkommenden Hormonkonzentrationen lagen. In der Studie 1, die im Abschnitt 3.1 beschrieben wird, konnte mit einer CNP-Dosierung von 50 ng/kg/min eine TAC-induzierte Kardiomyozyten Hypertrophie auf zellulärer und molekularer Ebene verringert werden. Dieses Ergebnis führte zu der Frage, ob endogenes CNP als parakrines Hormon im Herzen auch das pathologische Wachstum und die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten während einer hypertensiven Herzerkrankung beeinflussen kann. Daraufhin wurde ein neues genetisches Mausmodell mit einer zellspezifischen Deletion des GC-B Rezeptors in Kardiomyozyten generiert. Um die Deletion von GC-B nachzuweisen, wurde die CNP-induzierte cGMP-Produktion in Kardiomyozyten und Herzfibroblasten untersucht. Die Kardiomyozyten der Kontrollmäuse zeigen einen konzentrations-abhängigen Anstieg der cGMP-Produktion. Wohingegen die cGMP Antwort der Kardiomyozyten aus den CM GC-B KO Mäusen vollständig ausbleibt. Das deutet darauf hin, dass in den Knockout-Mäusen die CNP/GC-B/cGMP-Signalkaskade unterbrochen ist und die katalytische Umwandlung von GTP zu cGMP nicht stattfindet. Um zu bestätigen, dass die Deletion des GC-B Rezeptors tatsächlich nur in Kardiomyozyten vorkommt, wurde zusätzlich noch die cGMP Antwort der Herzfibroblasten untersucht. Die cGMP-Spiegel der Fibroblasten aus Kontroll- und Knockout-Mäusen (CM GC-B KO) korrelieren jeweils mit den CNP-Konzentrationen. Weitere Kriterien zur Bestätigung der zellspezifischen Deletion des GC-B Rezeptors, stellen die CNP-induzierte Phosphorylierung von PLB und Titin dar. Da beide Proteine in Kardiomyozyten vorkommen und über die CNP/GC-B-Signalkaskade aktiviert werden können. Die Auswertung der Western Blots zeigt, dass CNP eine deutliche Phosphorylierung von PLB an Serin 16 und von Titin an Serin 4080 (die PKG abhängige Phosphorylierungsstelle) in isolierten Kontroll-Kardiomyozyten induziert. Dies wurde in den Kardiomyozyten der Knockout-Mäuse nicht beobachtet. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die Tatsache, dass die Behandlung der isolierten Kardiomyozyten mit Isoproterenol (ISO), Genotyp-unabhängig zu einer signifikanten Phosphorylierung von PLB und Titin führt. ISO als ein synthetischer β -Adrenorezeptor Agonist, führt nach Aktivierung des β -Rezeptors zur Bildung von cyclischem AMP (cAMP) und damit zu der Aktivierung der Serin/Threonin Proteinkinase A (PKA). Die PKA ist in der Lage, Phospholamban und Titin zu phosphorylieren (Yamasaki 2002). Die durch die PKA-

induzierte Phosphorylierung von PLB und Titin in den Kardiomyozyten der Knockout-Mäuse, ist ein weiterer Beweis für die Deletion des CNP/GC-B/cGMP in den Kardiomyozyten der CM GC-B KO Mäuse. Insgesamt bestätigen diese Experimente die Kardiomyozyten-spezifische Deletion des GC-B Rezeptors.

4.3 Unter physiologischen, basalen Bedingungen hat das CNP/GC-B System keine Bedeutung für die Morphologie und Funktion der Kardiomyozyten

Im Anschluss der erfolgreichen Validierung der CM GC-B KO Mäuse, wurde der Phänotyp dieser Tiere unter basalen Bedingungen untersucht. Die Beurteilung des Phänotyps erfolgte an 2 – 4 Monate alten Knockout-Mäusen. Die CM GC-B KO Mäuse zeigen, im Gegensatz zu den globalen GC-B oder CNP KO-Mäusen, kein verändertes Skelettwachstum. Zudem wurden keine Veränderungen des arteriellen Blutdrucks oder der Herzfunktion festgestellt.

Einige publizierte Studien beschreiben, dass CNP die kontraktile Funktion des Herzens (inotrope und lusitrope Effekte) verbessern kann (Li 2016, Moltzau 2013). Li et al. zeigte in einem Herzinsuffizienz (HF)-Modell, dass die intravenöse Gabe von CNP zu einer modifizierten Herzfunktion mit gesteigerter Relaxationsfähigkeit sowie vermehrter cGMP-Produktion führt (Li 2016). In einer anderen Arbeit wird beschrieben, dass CNP sowohl negative inotrope als auch positive lusitrope Effekte in gesunden Herzen induzieren kann. Diese Effekte wurden auch, konzentrationsabhängig von CNP, in einem Nagetier Myokardinfarkt-Modell detektiert (Moltzau 2013). Anhand dieser Zitate, erwarteten wir, dass die CM GC-B KO Mäuse unter physiologischen Bedingungen eine veränderte Herzfunktion aufweisen. Aber in den untersuchten Knockout-Tieren konnten wir, wie bereits beschrieben, basal keine Veränderungen der kontraktilen Funktion des Herzens feststellen. Dies könnte daran liegen, dass unter physiologischen Bedingungen, die endogenen, kardialen sowie im Blut zirkulierenden CNP-Konzentrationen sehr niedrig sind. In den erwähnten Zitaten wurde, um CNP-induzierte inotrope und lusitrope Effekte zu detektieren, CNP in einer Konzentration von 300 nM eingesetzt. Dies ist eine viel höhere Konzentration als basal im Organismus vorkommen würde. Zudem könnten durch die konstitutive Deletion des CNP/GC-B Signalwegs in Kardiomyozyten, andere Signalwege im Gegensatz dazu hochreguliert sein, um den Verlust zu kompensieren. Eine weitere wichtige Komponente in der Beurteilung der Herzfunktion sind die Phosphodiesterasen (PDEs). Die PDEs fungieren als Gegenspieler zu den Cyclasen und bauen cGMP zu GMP oder cAMP zu AMP ab. Afzal et al. beschreibt, dass die PDE3 und PDE4 für die Regulation der positiven inotropen und lusitropen Effekte im gesunden Herzen verantwortlich sind. Während bei einem Herzinsuffizienz-Zustand hauptsächlich die PDE3 als Regulator der kontraktilen Funktion agiert (Afzal 2011). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass CNP über GC-B/cGMP ähnliche hohe cAMP-Spiegel erzielen kann, wie der synthetische PDE3-Inhibitor Cilostamid (Qvigstad 2010). Zudem konnte CNP in isolierten Nagetier Papillarmuskeln über eine

erhöhte cGMP-Produktion positive lusitrope Effekte, ohne Beeinflussung des cAMP-Spiegels erzielen. Auch ist bekannt, dass eine erhöhte cGMP-Produktion zur Stimulation der Phosphorylierung von Phospholamban und Troponin führen und somit zur Regulierung der myokardialen Kontraktilität beitragen (Brusq 1999).

Insgesamt betrachtet, kann die ausbleibende veränderte Herzfunktion in den CM GC-B KO Mäusen auf eine Vielzahl von Gründen zurückgeführt werden. Dennoch wurde in mehreren Studien daraufhin gedeutet, dass CNP über eine erhöhte cAMP-vermittelte Signaltransduktion durch die hemmende PDE3 Wirkung, positive inotrope und lusitrope Effekte sowohl bei versagenden als auch bei gesunden Herzen vermitteln kann (Meier 2017).

4.4 Im Alter zeigen weibliche CM GC-B KO Mäuse eine dilatative Kardiomyopathie

Wie bereits in Abschnitt 4.3 beschrieben, zeigen die CM GC-B KO Mäuse in einem Alter von 2 – 4 Monaten einen unauffälligen Phänotyp. Interessanterweise, war aber in einem Alter von ungefähr einem Jahr, die Herzfunktion und die Herzmorphologie der weiblichen KO-Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen Geschwisterkontrolltieren signifikant verändert. Dies wurde nicht in den gleichaltrigen männlichen CM GC-B KO Mäusen beobachtet. In den circa 1 Jahr alten Weibchen zeigen sich signifikant erhöhte Körpergewicht-normierte Herz und linksventrikuläre Gewichte, sowie vergrößerte Kardiomyozytenflächen, im Vergleich zu den Geschwisterkontrolltieren. Dies lässt auf eine entstandene, ausschließlich in den Weibchen vorkommende Herzhypertrophie schließen. Zudem verschlechterte sich die Herzfunktion mit einem Absinken der Ejektionsfraktion um circa 28 % auch nur in den weiblichen KO-Tieren. Diese entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie, mit deutlicher Vergrößerung des Kammervolumens. So können die dilatierten Ventrikel nicht mehr vollständig kontrahieren, und das Restblutvolumen am Ende der Diastole bzw. Systole in den weiblichen CM GC-B KO Mäusen nimmt signifikant zu den gleichaltrigen Geschwister-Tieren zu. Da die dilatative Kardiomyopathie ausschließlich in den weiblichen KO-Tieren auftrat, könnte dies daraufhin deuten, dass das endogene CNP in den männlichen CM GC-B KO Mäusen verzichtbar war. In Moyes et al. wird ein ähnlicher Geschlechts-abhängiger Effekt beschrieben. Dort wird gezeigt, dass weibliche ec CNP KO Mäuse (Mäuse denen CNP nur in Endothelzellen fehlt), im Gegensatz zu den männlichen ec CNP KO Tieren, einen signifikant höheren arteriellen Blutdruck aufweisen. Die Gruppe von A. Hobbs postulierte, dass bei den männlichen Mäusen die Endothel-vermittelte Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) eine größere Bedeutung hätte als endotheliales CNP (Moyes 2014). Somit könnte der Verlust der CNP-Wirkungskaskade, bei den ec CNP KO Männchen durch NO kompensiert werden. Wohingegen bei den Weibchen CNP die größere Bedeutung einnimmt und somit die NO-Kompensation ausbleibt (Moyes 2014). Neben den Blutdruck-regulierenden Effekten, berichten einige

weitere Publikationen auch über eine schützende Rolle von NO im Rahmen von Herzerkrankungen. In Yu et al. wird beschrieben, dass erhöhte endogene NO-Spiegel das Myokard vor postischämischen Reperfusionsschaden schützen können (Yu 2018). Andere Studien zeigen, dass durch die Inhibierung der PDE2, zusammen mit dem über den NO/sGC-Signalweg produzierte cGMP, das Risiko der Entstehung einer Herzinsuffizienz reduziert werden kann (Baliga 2018).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem Bmal-1 Knockout (*Bmal1^{-/-}*) (brain and muscle ARNT-like protein = ein Transkriptionsfaktor, der den zirkadianen Rhythmus reguliert) nach circa 6 Monaten auch eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) entwickelten (Lefta et al. 2012). In Harding et al wird gezeigt, dass Kardiomyozyten-spezifische EP-4 Knockout Mäuse (Prostaglandin E2 Rezeptor 4) im Alter von 5 Monaten eine dilatative Kardiomyopathie mit einhergehender Fibrose und kontraktile Dysfunktion entwickeln. Hier sind allerdings die männlichen Mäuse mehr betroffen, bei den Weibchen entwickelte sich die DCM in einer milderer Form (Harding et al. 2010). *Timp 3^{-/-}* (Metalloproteasen Inhibitor 3) Mäuse entwickelten nach 21 Monaten Kardiomyozyten Hypertrophie mit linksventrikulärer Dilatation und kontraktile Dysfunktion (Fedak et al. 2004). Auch eine Deletion der lysosomalen Endopeptidase Cathepsin L (*CTSL^{-/-}*) führte in einjährigen Mäusen zu einer dilatativen Kardiomyopathie (Stypmann et al. 2002). In unserer Studie zeigen die CM GC-B KO-Mäuse, die DCM-Antwort ebenso in späteren Stadien. Das Fehlen des GC-B Rezeptors in Kardiomyozyten scheint für die Mäuse in einem früheren Stadium basal keine Probleme hervorzurufen. Allerdings scheint es für die Weibchen aber eine spezielle Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Herzfunktion und dem Schutz vor kontraktile Dysfunktion im Alter zu haben.

4.5 Endogenes, lokales CNP schützt vor pathologischer Herzhypertrophie, aber nicht vor interstitieller Fibrose des Herzens

In der Studie mit exogenem, synthetischem CNP, welche in Abschnitt 3.1 beschrieben wurde, konnten wir eine schützende Wirkung von CNP auf die TAC-induzierte Herzhypertrophie beobachten. CNP reduzierte signifikant die durch aortalen Banding vergrößerten linksventrikulären Kardiomyozytenflächen sowie die mRNA Expression des Hypertrophiemarkers BNP. Die erhobenen Körpergewicht-normierten Herz und linksventrikulären Gewichte wurden durch die 14-tägige Gabe von CNP tendenziell verringert. Zusammen mit publizierten Befunden (Del Ry 2013, Izumiya 2012, Wang 2007) führten diese Ergebnisse zu der Hypothese, dass CNP vor pathologischer Herzhypertrophie schützen kann. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen an den CM GC-B KO Mäusen unterstützt.

Die Knockout-Mäuse reagierten bereits nach 3-tägiger transverser Aortenkonstriktion mit einer ausgeprägten, progressiven Herzhypertrophie. Die Kardiomyozytenflächen der KO Tiere waren im

Vergleich zu den Kontrolltieren (in denen der CNP/GC-B/cGMP Signalweg funktioniert) signifikant vergrößert. Allerdings scheint die frühe hypertensive Herzhypertrophie der CM GC-B KO Mäuse bereits nach 3-tägiger TAC transient zu sein, da nach 14 Tagen TAC keine Unterschiede mehr zwischen Kontroll- und Knockout-Mäusen beobachtet wurden. Dieser Zeitverlauf passt interessanterweise zu der Hochregulierung der CNP Expression im Herzen, die ähnlich transient ist. Mittels qRT-PCR konnte nach 3 Tagen Aortenkonstriktion an Wildtyp Mäusen, ein akuter Anstieg der CNP mRNA Expression im linken Ventrikel detektiert werden. Nach 14 Tagen TAC sank dieser wieder fast auf Basal-Niveau ab. Wir vermuten daher, dass endogenes CNP nur transient nach einer Druckbelastung des Herzens eine schützende Bedeutung hat. Eine mögliche Ursache für die ausbleibende Herzhypertrophie nach 3 Tagen TAC in den Kontrolltieren, könnte die frühe beschriebene Hochregulation von TNF- α sein, welcher als möglicher CNP-Induktor fungiert (Xia 2009). Dass CNP eine direkte Wirkung auf eine durch Ang II-induzierte Herzhypertrophie hat, wurde in Rosenkranz et al. (2003) beschrieben. Der Mechanismus der hemmenden Wirkung von CNP auf eine Myozyten-Hypertrophie, insbesondere die hypertrophen Signalwege, wurde nicht untersucht. Aber Tokudome et al. zeigte, dass CNP die erhöhte Endothelin-1 (ET-1)-induzierte Calcium und Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) Aktivierung über cGMP-vermittelte Signalwege hemmen konnte (Tokudome 2004). Die Zunahme von Calcium spielt bei der ET-1-induzierten Kardiomyozyten Hypertrophie über aktivierte CaMKII-abhängige Signalwege eine entscheidende Rolle (Zhu et al. 2000). Diese Daten deuten darauf hin, dass der CNP/GC-B/cGMP Signalweg in frühen Stadien einer Herzbelastung anti-hypertrophe Effekte ausüben kann.

Die TAC-induzierte linksventrikuläre Fibrose wurde weder durch exogenes (Studie 1) noch durch endogenes CNP (Studie 2) beeinflusst. Obwohl beschrieben ist, dass CNP anti-fibrotische Wirkungen nach Myokardinfarkt zeigt (Soeki 2005, Izumiya 2012), sind die zellulären Mechanismen der anti-fibrotischen Wirkung *in vivo* nicht vollständig verstanden. Es wurde auch gezeigt, dass CNP in der Lage ist, die Proliferation und Kollagensynthese von kultivierten kardialen Fibroblasten zu hemmen (Horio 2003, Soeki 2005). Tatsächlich zeigen unsere Beobachtungen, dass die mRNA Expression von Kollagen (Col1a1) 14 Tage nach Aortenkonstriktion ansteigt, aber durch synthetisches CNP nicht beeinflusst wird. Somit konnten wir die Ergebnisse der *in vitro* Studien, *in vivo* nicht bestätigen.

4.6 Der CNP/GC-B/PKG Signalweg in Kardiomyozyten moduliert die Titin-Phosphorylierung und schützt vor dilatativer Kardiomyopathie

Die Ergebnisse meiner Dissertationsarbeit zeigen, dass exogenes CNP fast vollständig vor einer TAC-induzierten linksventrikulären Dilatation schützen kann (Studie 1). Eine mögliche mechanistische Ursache für die protektive Wirkung von CNP könnte die spezifische Phosphorylierung von Titin an

Position Serin 4080 sein. Durch die Gabe von synthetischem CNP, konnte ein signifikanter Anstieg der Titin-Phosphorylierung an der cGMP-abhängigen Phosphorylierungsstelle Serin 4080 detektiert werden. Es ist beschrieben, dass durch alternatives Splicing der Titin-prä-mRNA eine Vielzahl von Titin-Isoformen entsteht. Diese Isoformen befinden sich im dehnbaren I-Band Bereich des Titinfilaments. Im Herzmuskel werden 2 Isoformen ko-exprimiert, der N2BA-Typ und die steifere, kürzere Isoform N2B. Das Verhältnis dieser Isoformen bestimmt zu einem großen Teil die elastischen Eigenschaften des Titinfilaments (Kruger 2009). Hudson et al. postuliert, dass die Phosphorylierung von Titin am N2B-Element, durch die PKG, die Steifheit des Titinmoleküls reduziert und gleichzeitig somit die Elastizität erhöht. Ebenso, dass eine Hypophosphorylierung von Titin an der PKG-abhängigen Phosphorylierungsstelle, in Herzinsuffizienz-Patienten eine verminderte Elastizität des Titinmoleküls zur Folge hat (Hudson 2011). Dies könnte daraufhin deuten, dass der CNP/GC-B/cGMP/PKG-induzierte Anstieg der Titin Phosphorylierung zu einer verbesserten Compliance der Kardiomyozyten beiträgt und somit vor einer TAC-induzierten kontraktile Dysfunktion und linksventrikulären Dilatation schützt. Unterstützt werden diese Daten, durch unsere Beobachtungen an den CM GC-B KO Mäusen. Nach 3-tägiger Aortenkonstriktion wurde ein Rückgang der Titin-Phosphorylierung an der PKG-abhängigen Phosphorylierungsstelle, im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen detektiert. Die Hypophosphorylierung von Titin und die damit einhergehende verminderte Elastizität der Kardiomyozyten, könnte möglicherweise zu der verschlechterten Herzfunktion in den KO-Mäusen beigetragen haben. Dadurch, dass Titin durch die Bestimmung der Elastizität des Sarkomers direkt die Myozyten Kontraktion und besonders die Relaxation beeinflusst, könnte die verminderte Phosphorylierung des Titinmoleküls nach 3 Tagen TAC eine mögliche Ursache für die linksventrikuläre Dilatation der CM GC-B KO Mäuse sein.

Zudem konnten wir eine signifikant erhöhte Phospholamban (PLB) Phosphorylierung an Serin 16 nach 3 Tagen TAC, Genotyp-unabhängig (CM GC-B KO und Kontroll-Mäuse) detektieren. Die PLB-Phosphorylierung könnte auf eine exzessive Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren als Folge einer Stress-bedingten Aktivierung des Sympathikustonus sein (Wang et al. 2004). Die Phosphorylierung von Phospholamban wird dann durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt und dient einer besseren Relaxation des Herzens (Li et al. 2000). Dies wurde auch in der Studie mit exogenem CNP beobachtet. Die PLB-Phosphorylierung an Serin 16 konnte durch synthetisches CNP nicht beeinflusst werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass CNP über GC-B/cGMP/PKG spezifisch Titin an Serin 4080 phosphorylieren kann, und somit einer beginnenden Versteifung und Ausdehnung der Myofibrillen bei der Entstehung einer Herzhypertrophie entgegenwirkt und so zu einer besseren Relaxationsfähigkeit des Ventrikels beitragen kann.

4.7 Der CNP/GC-B/PKG Signalweg hemmt in Kardiomyozyten die Stress-abhängige Induktion von Zytokinen/Myokinen wie Interleukin 6, dies schützt möglicherweise vor Inflammation und Apoptose

In unserer Studie 1 mit exogenem CNP, resultierte die 14-tägige transverse Aortenkonstriktion in einem signifikanten Anstieg der IL-6 mRNA Expression. Dieser Anstieg wurde durch synthetisches CNP signifikant gehemmt. Das IL-6 als pro-inflammatorisches Zytokin zu der Entstehung einer Herzhypertrophie beitragen kann, wurde bereits in Kanda et al. 2004 gezeigt. Zudem konnten erhöhte IL-6 Plasmaspiegel in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz festgestellt werden (Kanda 2004). Andere Studien zeigen, dass eine systemische Deletion von IL-6 in einem Mausmodell die Auswirkungen durch eine TAC-induzierte Herzhypertrophie abschwächen kann (Zhao 2016). Die Regulation einer TAC-induzierten Entzündungsreaktion steht im engen Zusammenhang mit der Sezernierung von IL-6 aus Kardiomyozyten (Tsutamoto 1998). Auch wurde gezeigt, dass synthetisches CNP oder die PKG I die IL-6 Produktion und die damit einher gehende Entzündung in Nagetier-Modellen mit Nieren-, Lungen- sowie Herzerkrankungen signifikant reduzieren konnte (Kimura 2015, Li 2012, Wu 2018). Diese Studien passen zu unserer Beobachtung, dass synthetisches CNP die TAC-induzierte IL-6 Produktion signifikant verringern konnte. Anhand dieser Beobachtung vermuteten wir, dass der Verlust des endogenen CNP/GC-B/cGMP-Signalwegs in Kardiomyozyten im Gegensatz dazu die IL-6 Produktion erhöht und somit die Entzündungsreaktion initiiert. Tatsächlich, konnten wir in lysiertem linksventrikulärem Gewebe der CM GC-B KO Mäuse, einen akuten Anstieg der IL-6 mRNA Expression nach 3 Tagen TAC, im Vergleich zu den Kontrolltieren detektieren. Dieser IL-6 Anstieg nach 3 Tagen in den KO-Mäusen wurde zudem von einer erhöhten Cxcl-1 mRNA Expression sowie einer erhöhten NOX4-Expression begleitet. Dass CNP eine Ang II-induzierte erhöhte NOX4-Produktion signifikant hemmen kann, wurde bereits in Izumiya et al. (2012) beschrieben. Zusammen mit der Beobachtung in Xia et al. (2009), dass eine 3-tägige Aortenkonstriktion zu einer erhöhten mRNA-Expression von TNF- α führt und somit die Sezernierung von CNP induziert, deuten diese Daten darauf hin, dass der CNP/GC-B/cGMP-Signalweg nach TAC zu einer Herunterregulierung pro-inflammatorischer Gene in Kardiomyozyten beitragen kann.

In einem murinen Myokardinfarkt-Modell konnte gezeigt werden, dass eine pathologische gp-130 vermittelte STAT3-Aktivierung, zu linksventrikulärem Remodeling und Herzinsuffizienz führte (Tsutamoto et al. 1998). Angesichts dieser Studie würde man anhand des erhöhten IL-6 Anstiegs in den KO-Mäusen nach 3 Tagen eine Hochregulation von pSTAT3 erwarten. Die Phosphorylierung von STAT3 war aber in den CM GC-B KO Mäusen klar verringert. Aus der Literatur geht nicht eindeutig hervor, ob STAT3 mehr schützende oder schädigende Wirkungen aufweist. Smith et al. zeigen, dass eine Herz-spezifische Deletion von STAT3 keinen Einfluss auf die Infarktgröße hatte (Smith 2004).

Andere Studien zeigen anhand eines Mausmodells mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von STAT3, dass der Verlust des Transkriptionsfaktors nach Ischämie-Reperfusion zu einer erhöhten Infarktgröße und mehr Apoptose führt (Hilfiker-Kleiner 2005). Das könnte darauf hindeuten, dass die verringerte STAT3-Aktivierung in den CM GC-B KO-Mäusen nach 3 Tagen TAC, spezifische Apoptose-Signalwege induziert und so zu der detektierten Kardiomyopathie beiträgt. Dies konnte leider aus zeitlichen Gründen nicht untersucht werden.

4.8 Limitationen der Studie

Zu den kritischen Punkten in dieser Dissertationsarbeit gehört die Fibrose-Auswertung. Das Computer-Programm (Adobe Photoshop 7.0), welches zur Erkennung der Fluoreszenz-Bilder benutzt wurde, erkannte nicht 1:1 die rot-fluoreszierenden Kollagenfasern, sondern erfasste nur fluoreszierende Kollagenfasern, welche oberhalb eines bestimmten Schwellwertes lagen. Dieser Fehler wurde nicht rechtzeitig erkannt und damit sind die Ergebnisse (Abb. 13, Abb. 33) dieser Versuche nicht abschließend interpretierbar.

Weiter zu hinterfragen wäre der beobachtete Phänotyp der 1 Jahr alten weiblichen CM GC-B KO Mäuse. Mehrere Studien zeigen, dass eine erhöhte Expression der Cre-Rekombinase zu einer dilatativen Kardiomyopathie und Herzfibrose beitragen kann (Buerger 2006, Lexow 2013, Pugach 2015). Um einen alleinigen Cre-Effekt ausschließen zu können, wäre es sinnvoll gewesen, eine Cre-Kontrolle-also Tiere, die keine LoxP Sequenzen haben, mit zu untersuchen. Leider war dies im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht möglich gewesen.

Zudem wurde ein Medium mit einem bereits abgelaufenen Haltbarkeitsdatum für die Versuche an isolierten Kardiomyozyten verwendet. Es ist leider nicht auszuschließen, dass dadurch die Morphologie und Vitalität der Kardiomyozyten beeinträchtigt wurde.

Eine weiterer Kritikpunkt in dieser Dissertation wäre, dass in der Studie 1 (3.1) *C57Bl/6* Mäusen und in der Studie 2 (3.2) Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund (*C57Bl/6* und *129SV*) verwendet wurden. Koentges et al. postulierte, dass eine transverse Aortenkonstriktion bei den *C57Bl/6* Mäusen zu einer stärkeren Einschränkung der Herzfunktion führte, als bei den *129SV* Mäusen. Zudem war beispielsweise die Periostin mRNA Expression nach TAC in den *C57Bl/6* Mäusen signifikant stärker hochreguliert als in den *129SV* Mäusen. Dies könnte zu einer stärkeren Induktion von Fibrose in den *C57Bl/6* Mäusen bei tragen (Koentges 2017).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden die kardialen Effekte des C-Typ natriuretischen Peptids (CNP) an wildtypischen Mäusen (Studie 1) und an einem neuen genetischen Mausmodell, mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des Guanylyl-Cyclase (GC-B) Rezeptors (Studie 2) untersucht. In Studie 1 wurden die Wirkungen von exogenem, synthetischem CNP auf eine durch Druckbelastung-induzierte Herzinsuffizienz in wildtypischen Mäusen (*C57Bl/6* Hintergrund) untersucht. Dafür wurde CNP parallel zu einer operativen transversen Aortenkonstriktion (TAC) über osmotische Minipumpen in einer Dosierung von 50 ng/kg/min über 14 Tage appliziert. Die 14 Tage TAC führten zu einer ausgeprägten Linksherzhypertrophie. Diese wurde durch exogenes CNP auf zellulärer (verringerte Kardiomyozytenflächen) und molekularer (verringerte BNP mRNA Expression) Ebene signifikant gehemmt. Auch die durch TAC-induzierte linksventrikuläre Dilatation wurde durch exogenes CNP fast vollständig verhindert. Diese kardialen protektiven Effekte von CNP traten ohne eine wesentliche Veränderung des arteriellen Blutdrucks auf. Mögliche mechanistische Ursachen für die schützende Wirkung von CNP könnte die PKG-abhängige Phosphorylierung des sarkomerischen Proteins Titin sein. Eine gesteigerte Phosphorylierung von Titin an der elastischen N2B-Domäne verringert die Steifigkeit der Kardiomyozyten und verbessert somit deren Relaxationsfähigkeit (Hudson 2011). Die erhöhten linksventrikulären Volumina nach TAC (end-diastolische und end-systolische Volumina) wurden möglicherweise durch eine erhöhte Steifigkeit der Kardiomyozyten provoziert. Dies könnte durch den akuten IL-6 mRNA Anstieg nach TAC begünstigt werden, da Kruger et al. einen Zusammenhang zwischen passiver Steifigkeit der Kardiomyozyten und IL-6-Expression postulierten (Kotter 2016, Kruger 2009). Diese Veränderungen wurden durch exogenes CNP verhindert. Es ist wahrscheinlich, dass die CNP-induzierte Phosphorylierung von Titin an Serin 4080 in die Relaxationsfähigkeit der Kardiomyozyten und somit die diastolische Funktion des linken Ventrikels verbesserte.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in Studie 2 untersucht, ob auch endogenes CNP als parakrines Hormon im Herzen eine TAC-induzierte Herzhypertrophie und die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten bei einer hypertensiven Herzerkrankung beeinflussen kann. Dafür wurde ein neues genetisches Mausmodell mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des GC-B Rezeptors generiert (CM GC-B KO). Da vorangegangene Studien in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die basale CNP-Expression im Herzen sehr gering ist, nach 3-tägiger TAC aber akut ansteigt und nach 14-tägiger TAC wieder abfällt, haben wir CM GC-B KO Mäuse und deren Geschwister-Kontrolltiere an beiden Zeitpunkten nach TAC untersucht. Die TAC führte Genotyp-unabhängig zu einem Anstieg der kardialen Nachlast nach 3 Tagen und weiter nach 14 Tagen. Diese Druckbelastung provozierte eine progressive, signifikante Linksherzhypertrophie.

Allerdings reagierten die CM GC-B KO Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren bereits nach 3-tägiger TAC mit einer ausgeprägten Kardiomyozyten-Hypertrophie. Zudem beobachteten wir nach 3-tägiger TAC in den Knockout-Mäusen eine Abnahme der Ejektionsfraktion und gleichzeitig eine signifikante Zunahme der beiden linksventrikulären Volumina (end-diastolische und end-systolische Volumen). Diese frühe linksventrikuläre Dilatation wurde in den Kontrolltieren nicht beobachtet. Daraus schlussfolgerten wir, dass endogenes kardiales CNP, dessen Expression zu frühen Zeitpunkten nach Druckbelastung ansteigt, das Herz vor kontraktile Dysfunktion und Dilatation schützen kann. Um mögliche Mechanismen für die protektive Wirkung von endogenem CNP zu erklären, untersuchten wir die IL-6 mRNA Expression sowie die Titin-Phosphorylierung im Herzen. Der akute Anstieg der IL-6 mRNA Expression nach 3-tägiger TAC in den CM GC-B KO Mäusen korreliert mit der verminderten Phosphorylierung von Titin an der PGK-spezifischen Phosphorylierungsstelle (Serin 4080). Somit könnte der CNP/GC-B/cGMP-Signalweg zu einer Inhibition pro-inflammatorischer Gene beitragen, da der akute IL-6 mRNA Anstieg in den Kontrollen nicht beobachtet wurde. Auch die gesteigerte NOX4 Expression 3 Tage nach TAC, könnte zu der frühen dilatativen Kardiomyopathie in den Knockout-Mäusen beigetragen haben. Die verringerte STAT3 Aktivierung in den CM GC-B KO Mäusen würde laut Literatur zu vermehrter Apoptose führen, indem pro-apoptische Gene wie Bcl oder Bax vermehrt transkribiert werden. Auch die erhöhte Cxcl-1 mRNA Expression in den Knockout-Mäusen deutet zusammen mit dem IL-6 Anstieg auf vermehrte Entzündungsreaktionen 3 Tage nach TAC hin. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit darauf hin, dass der CNP/GC-B/cGMP-Signalweg in frühen Stadien einer erhöhten kardialen Druckbelastung und der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie entgegenwirken kann. Die Phosphorylierung des sarkomerischen Proteins Titin und die Hemmung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine (speziell IL-6) könnten zu diesem protektiven Effekt beitragen.

6 Abstract

Here we investigated cardiac effects of c-type natriuretic peptide (CNP) in wildtype mice (study 1) and in a newly generated mouse model with cardiomyocyte-specific deletion of the guanylyl cyclase (GC-B) receptor (study 2).

In study 1 the effects of exogenous, synthetic CNP were investigated in wildtype mice (*C57Bl6* background) after heart failure induced by pressure overload. Therefore, additionally to transverse aortic constriction (TAC) CNP (50 ng/kg/min) was administered via osmotic minipumps for 14 days. TAC provoked progressive heart hypertrophy. The TAC-induced hypertrophy was accompanied by enlarged cardiomyocyte areas and increased left ventricular mRNA levels of BNP. CNP significantly reduced cardiomyocyte areas and mRNA levels of BNP. Also, the TAC-induced left ventricular dilatation was almost prevented through synthetic CNP. These cardiac protective effects of CNP were accompanied by increased phosphorylation of the sarcomeric protein titin. Titin plays a critical role in maintaining the sarcomere structure and elasticity and thereby influences myocyte contraction and especially relaxation. The left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes were significantly increased after TAC.

The increased left-ventricular (end-diastolic and end-systolic) volumes after TAC are maybe provoked by an increased cardiomyocyte stiffness. The acute rise in IL-6 mRNA levels after TAC may favour these change, since Kruger et al postulate a relationship between passive cardiomyocyte stiffness and IL-6 expression. These changes were prevented by exogeneous CNP. Presumably, the CNP induced phosphorylation of titin on Serin 4080 within its elastic domain improves the cardiomyocyte relaxation and therefore the left-ventricular diastolic function.

Because of these observations, we investigated in study 2, whether endogenous CNP as a paracrine hormone can affect TAC-induced hypertrophy and contractile function of cardiomyocytes. Therefore, we generated a new genetic mouse model with a cardiomyocyte specific deletion of the GC-B receptor (CM GC-B KO). Since previous studies in our group demonstrated that cardiac baseline expression levels of CNP are very low, but they markedly increased 3 days after TAC and decline to baseline levels 14 days after TAC, CM GC-B KO mice and control littermates were investigated at both timepoints after TAC.

TAC resulted in increased cardiac afterload after 3 days, and more after 2 weeks, which was similar in both genotypes. Pressure overload provoked a progressive and significant cardiac hypertrophy, shown by the increased heart weight/body weight ratios, and were confirmed by histology. More severe myocyte hypertrophy was shown 3 days after TAC in CM GC-B KO mice, compared with control mice. Left ventricular contractile functions were also investigated by invasive catheterization in anesthetized mice. Notably, while in control mice subjected to TAC the LV ejection fraction was only mildly

decreased, the KO mice reacted with a very marked and early decrease of the ejection fraction at three days after TAC, which tend to improve later on. Even more, the left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes were markedly increased in the KO mice 3 days after TAC, indicating left ventricular dilatation. Again, this acute dilatation seems to reverse or improve at later stages. Such changes were not observed in control mice. To clarify possible downstream signalling pathways mediating these protective effects of CNP, we investigated titin-phosphorylation and IL-6 expression after 3 days of TAC. The acute increased IL-6 mRNA expression correlates well with the diminished phosphorylation of titin (serin 4080) in CM GC-B KO mice. Also, the increased NOX4 expression 3 days after TAC, could be one of the reasons of the early dilatation in KO mice. The diminished phosphorylation of STAT3 in CM GC-B KO mice may induce apoptosis by transcription of Bcl or Bax genes. Also, the increased mRNA expression of Cxcl-1 and IL-6 after 3 days of TAC can lead to more inflammation the hearts of the KO mice. In summary, these results show, that the CNP/GC-B/cGMP pathway can prevent cardiac dilatation in early stages. The phosphorylation of titin and the inhibition of the pro-inflammatory cytokines can contribute to this protective effects of CNP in the heart.

7 Anhang

7.1 verwendete Chemikalien

Tabelle 28 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller/Firma
Acrylamid – N, N Methylen-bisacrylamid Rotiphorese, Gel 30	Carl Roth GmbH
Agarose	Bio&Sell GmbH
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich GmbH
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA
BC Assay Reagent A	Interchim Montlucon
BCS	Life Technologies
Bromphenolblau	Merck KGaA
BSA-TYPE H1	Gerbu Biotechnik GmbH
Buprenorphinhydrochlorid	Indivior UK Ltd
2,3 – Butanedione monoxime	Sigma-Aldrich GmbH
Chloroform	Merck KGaA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA
Essigsäureanhydrid	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck KGaA
Ethanol	Merck KGaA
FastStart Essential DNA Green Master, 2 x	Roche Diagnostics GmbH
FastStart Essential DNA Probes Master, 2 x	Roche Diagnostics GmbH
FCS	Gibco, Life Technologies
Formaldehyd-Lösung 4 %	AppliChem GmbH
Gamma (γ)-Globulin	Sigma-Aldrich GmbH
GeneRuler (100-1000 bp) DNA Ladder	Life Technologies
Glucose	Merck KGaA
Glycerin	Merck KGaA
Glycin	Merck KGaA
HEPES	Merck KGaA
IBMX	Sigma-Aldrich GmbH
Isofluran	Cp pharma
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Isoproterenol	Sigma-Aldrich GmbH
¹²⁵ I-cGMP	Hartmann Analytic GmbH
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Kaliumhydrogencarbonat	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA
Kalziumchlorid	Merck KGaA
Kupfersulfat	Merck KGaA
Laminin	Roche Diagnostics GmbH

Liberase DH	Roche Diagnostics GmbH
Magnesiumsulfat	Merck KGaA
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Methanol	Merck KGaA
Nancy-520	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumacetat	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–170 kDa)	Thermo Fisher Scientific GmbH
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phenol	Carl Roth GmbH
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH
RNAse freies Wasser	Sigma-Aldrich GmbH
Dodecylsulfate-Na-salt	SERVA
Taurin	AppliChem GmbH
Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich GmbH
Trichloressigsäure	Merck KGaA
Triethylamin	Merck KGaA
Trizma® base	Sigma-Aldrich GmbH
TRIzol®	Thermo Fisher Scientific GmbH
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich GmbH
Urethan	Sigma-Aldrich GmbH

7.1.1 verwendete Enzyme

Produktbezeichnung

Hersteller/Firma

Liberase

Roche Diagnostics GmbH

Proteinase K

Sigma-Aldrich GmbH

Trypsin

Sigma-Aldrich GmbH

7.1.2 verwendete Kits (gebrauchsfertige Lösungen)

Produktbezeichnung

Hersteller/Firma

cComplete Protease EASYpack

Roche Diagnostics GmbH

(Protease Inhibitor Kit)

cComplete Phosphatase EASYpack

Roche Diagnostics GmbH

(Phosphatase Inhibitor Kit)

RedMastermix (2 x) Taq PCR Kit	Genaxxon Bioscience GmbH
SuperSignal™ Pierce® ECL Western Blot Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH

7.2 technische Laborgeräte

Tabelle 29 Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Produktbezeichnung	Hersteller/Firma
Allegra 64R Zentrifuge	Beckman Coulter
BIOFUGE fresco	Heraeus Instruments
Blutdruckmanschetten	Softron Co. Ltd.
Elektrophoresekammer	Werkstatt d. Physiologie
Feinwaage (TE214S)	Sartorius
FluorChem SP Chemilumineszenz Detektionssystem	Alpha Innotech Corporation/ProteinSimple
γ-Counter	Berthold Technologies
Gelkammer für Elektrophorese (Western Blot)	Peqlab Biotechnologie GmbH
Gel Logic 100 Imaging, System	Kodak
HERAcell® CO ₂ -Inkubator	Thermo Electron corporation
HERAsafe™ Sterilbank	Thermo Electron corporation
LightCycler® 96	Roche Diagnostics GmbH
Mikro-Dismembrator U	Sartorius
Mikroskop CK X41	Olympus
Multifuge 1 S-R	Heraeus Instruments
Semi-Dry Transferkammer	Biometra
Spannungsquelle E802	Consort EV202
SpeedVac Concentrator	BACHOFER
Thermomixer compact	eppendorf
Thermocycler T _{Gradient}	Biometra
Tischwaage	Sartorius
Viktor ² 1420 Multilabel, Counter	Perkin Elmer life sciences

7.3 verwendete Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Microtubes 1,5 / 2 ml	Eppendorf AG
Safe-Lock Eppendorf Microtubes	Eppendorf AG
Flüssigstickstoff	Linde AG
Filterpapier	Whatman GmbH
Kanülen, 23 und 26 G	Dispomed
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare Life Sciences
RIA-Röhrchen 4,5 ml	Sarstedt AG & Co.

7.4 Puffer und Lösungen

7.4.1 verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot

Lysis Puffer	1 Teil 10 mM NaH CO ₃ 2 Teile 20 % SDS 2 % Protease Inhibitoren (20 µl/ml Lysis Puffer) 10 % Phosphatase Inhibitoren (100 µl/ml Lysis Puffer)
Laemmli-Puffer, 3 x	2,4 g Tris-HCl (200 mM) (pH 6,7) 6 g SDS (6 %) 15 ml Glycerol (15 %) 10 mg Bromphenolblau 11 ml β-Mercaptoethanol bis zu 100 ml mit Bidest. Auffüllen
Elektrophoresepuffer, 1 x	3,43 g Trizma® base (25 mM) 14,0 g Glycin (192 mM) 1,0 g SDS (0,1 %) bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen
Transferpuffer, 1 x	3,8 g Trizma® base (25 mM) 18,0 g Glycin (192 mM) 200 ml Methanol (20 %) bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen

TBS, 10 x	61 g Trizma® base (0,5 M) 90 g NaCl (1,55 M) pH 7,6; bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen
TBS-T, 1 x	100 ml TBS 10 x und 1 ml TWEEN® 20 bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen
Milch-Puffer	5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T (5 %)
BSA-Puffer	5 g BSA-Pulver in 100 ml TBS-T (5 %)

7.4.2 verwendete Puffer und Lösungen für Genotypisierungen

Verdau-Puffer		finale Konzentration:
	2,5 ml Trizma® base (2 M)	100 mM
	0,5 ml EDTA (0,5 M)	5 mM
	5 ml NaCl (1 M)	200 mM
	0,5 ml SDS (20 %)	0,2 %
	bis zu 50 ml mit RNase/DNase freies Wasser auffüllen	
Proteinase K	Stammlösung: 20 mg/ml 5 µl/500 µl Verdaupuffer	
TE-Puffer		finale Konzentration:
	250 µl Trizma® base (2 M)	10 mM
	20 µl EDTA (0,5 M)	0,2 M
	bis zu 50 ml mit RNase/DNase freies Wasser auffüllen	
TAE-Puffer, 50 x	242 g Trizma® base (2 M) 146 g EDTA (0,5 M) 57,1 ml Essigsäure (> 99,9 %) pH 8,0; bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen	
TAE-Puffer, 1 x	20 ml TAE 50 x bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen	

7.4.3 verwendete Puffer und Lösungen für Zellkultur

PBS, 10 x	80,9 g Natriumchlorid (1,37 M) 2,0 g Kaliumchlorid (28,9 mM) 14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat (98,6 mM) 2,0 g Kaliumdihydrogenphosphat (14,7 mM) bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen
PBS, 1 x	100 ml PBS 10 x bis zu 1 l mit Bidest. auffüllen

7.4.4 verwendete Puffer und Lösungen für Radioimmunoassay (RIA)

NatriumAcetat Puffer	4,1 g NaAc in 1 l Bidest. (finale Konz. 50 mM) mit Essigsäure (98 %) auf pH 6,0 einstellen
γ-Globulin	0,15 g in 100 ml NaAc (finale Konz. 0,15 %)
Tris-HCl	6,057 g Trizma® base in 500 ml Bidest. (finale Konz. 100 mM) mit HCl (37 %) auf pH 7,4 einstellen, 10 ml Tris-HCl 100 mM in 90 ml Bidest. (finale Konz. 10 mM)
γ-Globulin	0,08 g in 10 ml Tris HCl 10 mM (finale Konz. 0,8 %)
Polyethylenglycol (PEG 6000)	15 g in 100 ml Tris-HCl-10 mM (finale Konz. 15 %)
cGMP-Antikörper	eingesetzt: final in 1:2500 in 0,15 % γ-Globulin

7.5 verwendete Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium:	DMEM-F12 (500 ml)
Nutrient Mixture F-12	1 % Penicillin/Streptomycin (5 ml)
Gibco® by Life Technologies GmbH	10 % FCS (50 ml)

Kulturmedium für Kardiomyozyten	Minimum Essential Medium (MEM)-HANKS (10,78 g/l) NaHCO ₃ (0,88 g/l) 5 % FCS (50 ml/l) 2 % BDM-10 mM (20 ml/l) 1 % Penicillin/Streptomycin (10 ml/l)
Fibroblast Basal Medium	FBM® Medium (500 ml)
Lonza	0,1 % hFGF-B (0,5 ml) 0,1 % Insulin (0,5 ml) 2 % FBS (10 ml) 0,1 % GA-1000 (0,5 ml)

7.6 verwendete rekombinante Proteine

Produktbezeichnung	Hersteller/Firma
Angiotensin II	Bachem AG
Atriales natriuretisches Peptid	ChinaPeptides Co Ltd
C-Typ natriuretisches Peptid	Bachem AG

7.7 verwendete Primer

7.7.1 Primer für qRT-PCR

Primer	Sequenz
BNP (Forw)	5' AAG CTG CTG GAG CTG ATA AGA 3'
BNP (Rev)	5' GTT ACA GCC AAA CGA CTG AC 3'
CNP (Forw)	5' AG CGG TCT GGG ATG TTA GTG 3'
CNP (Rev)	5' CGT TGG AGG TGT TTC CAG AT 3'
Col1a1 (Forw)	5' CAT GTT CAG CTT TGT GGA CCT 3'
Col1a1 (Rev)	5' GCA GCT GAC TTC AGG GAT GT 3'
CTGF (Forw)	5' CCA CCC GAG TTA CCA ATG AC 3'
CTGF (Rev)	5' TAG GTG TCCGGA TGC ACT TT 3'
Cxcl1 (Forw)	5' AGA AGG GTG TTG TGC GAA AA 3'
Cxcl1 (Rev)	5' ACT GAC ATT CTT TTC AAG ACA TAC AAA 3'
IL-6 (Forw)	5' TGA TGG ATG CTA CCA AAC TGG 3'

IL-6 (Rev)	5' TTC ATG TAC TCC AGG TAG CTA TGG 3'
NOX4 (Forw)	5' TGG GCC TAG GAT TGT GTT TA 3'
NOX4 (Rev)	5' CTG CTA GGG ACC TTC TGT GA 3'
S12 (Forw)	5' GAA GCT GCC AAG GCC TTA GA 3'
S12 (Rev)	5' AAC TGC AAC CAA CCA CCT TC 3'

Alle hier aufgeführten Primer für qRT-PCR wurden von Eurofins GmbH erworben.

Forw: Forward

Rev: Reverse

7.7.2 Primer für Genotypisierung

Gen	Primer	Sequenz
α MHC-Cre	Cre 800	5' GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG 3'
α MHC-Cre	Cre 1200	5' GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC 3'
GC-B	d1	5' GGACGACCCATCCTGTGATA 3'
GC-B	r3	5' GTTACAAACAAAAGCAAGATAAATACC 3'

Die hier aufgeführten Primer wurden ebenfalls alle von Eurofins GmbH erworben.

Um die Rolle von GC-B *in vivo* zu untersuchen, generierten wir Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von GC-B über das *Cre/LoxP* System. Wir floxten das Exon 7 des murinen GC-B Gens, welches für das *Npr2* Gen codiert. Hierdurch ist eine gezielte Deletion der Transmembran Domäne des GC-B Rezeptors möglich.

Flox Bande: Die Bande bei 660 bp zeigt eine erfolgreiche Integration der loxP-Sequenzen im Exon 7 des Gens für GC-B und einen homozygoten Genotyp.

Cre Bande: Die Bande bei 400 bp in den α MHC-Cre positiven Mäusen zeigt, dass die Cre-Rekombinase gebildet wurde.

KO Bande: Die Bande bei 159 bp zeigt eine Exon 7 Deletion des Gens für GC-B. Falls diese Bande in den Schwanzbiopsien auftritt, spricht dies für eine ektopische Aktivierung der Cre-Rekombinase. Diese Tiere wurden nicht für Versuche verwendet.

8 Abkürzungsverzeichnis

♂	männlich
♀	weiblich
α MHC	alpha Myosin Heavy Chain
Abb.	Abbildung
AfCS	Alliance for Cell Signaling
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure/n
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Bovine Calf Serum
BDM	2,3-Butanedione monoxime
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase I
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CM GC-B KO	Kardiomyozyten spezifischer Guanylylcyclase B Knock-Out
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid (2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase)
Col1a1	Kollagen1a1
cpm	counts per minute
CSA	Cross Sectional Area
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Cxcl1	Chemokine (C-X-C) ligand 1
d	Tag
DBP	diastolischer Blutdruck
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dP/dt max	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (Kontraktionsgeschwindigkeit)
dP/dt min	minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (Relaxationsgeschwindigkeit)
DSH	dishevelled

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
ERK 1/2	extrazellulär regulierende Kinasen 1 und 2
ET-1	Endothelin-1
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FBM	Fibroblast Basal Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGFR	fibroblast growth factor receptors (Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GA-1000	Gentamycin-1000
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-A	Guanylylcyclase-A
GC-B	Guanylylcyclase-B
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
hFGF-B	human-Fibroblast Growth Factor B
HG	Herzgewicht
HR	Herzrate
HRP	Horseradish Peroxidase
HZV	Herzzeitvolumen
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
LVG	linksventrikuläres Gewicht
KHD	Kinasehomologe Domäne
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KO	Knock-Out
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MEM HANKS	Minimal Essential Medium Hanks
min	Minute
n	Anzahl

NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEB	NewEngland BioLabs
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOX4	NADPH Oxidase 4
NP	Natriuretisches Peptid
Nppc	Natriuretic peptide C (CNP)
NPR-C	Natriuretic Peptide Receptor-C (clearance Rezeptor)
PAS	Periodic Acid Schiff Reaktion
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglykol
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase G
PLB	Phospholamban
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIA	Radioimmunoassay
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SBP	systolischer Blutdruck
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SERCA	Sarkoplasmatische Retikulums Ca ²⁺ ATPase
sGC	lösliche Guanylylcyclase
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SV	Schlagvolumen

TAC	Transverse Aortic Constriction
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N', N', N', N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TnI	Troponin I
U	Units
UPL Sonde	Universal ProbeLibrary Sonde
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Ved	enddiastolisches Volumen
Ves	endsystolisches Volumen
WT	Wildtyp

9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich und hochachtungsvoll bei Frau Professor Dr. med. Michaela Kuhn für die allzeit gewährte Unterstützung und die unermüdliche fachliche Betreuung bedanken. Ich fühlte mich zu keiner Zeit mit dem Thema meiner Dissertation alleine gelassen, Frau Kuhn war immer bereit mit hilfreichen Kommentaren oder Vorschlägen alles in eine sehr gute Richtung zu lenken. Weiterhin danke ich Frau Kuhn, dass Sie mir die Möglichkeit gab, meine Ergebnisse in Form von Posterpräsentationen und Vorträgen auf internationalen Kongressen darunter in Boston (USA) vorstellen zu dürfen. Auch in diesen Punkten unterstützte Sie mich mit großem Enthusiasmus und nahm einem somit auch einen großen Teil der Nervosität ab. Ich bedanke mich ganz herzlich bei Ihnen für Ihre Betreuung!!!

Des Weiteren möchte ich bei Herrn Professor Dr. Thomas Müller aus dem Lehrstuhl für Botanik I- Pflanzenphysiologie und Biophysik für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Kai Schuh für die anregenden Diskussionen und netten Kaffee-Pausen. Besonders hervorheben möchte ich die großartige Unterstützung von Herrn Marco Abeßer für die geduldige Durchführung der Transversen Aortenkonstriktion, sowie die unzähligen Millar-Messungen an unseren Mäusen.

Auch möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Hideo Baba und seinen Mitarbeiterinnen für die Anfertigung der Herzgewebepräparate zur Bestimmung des Kollagenfasergehaltes und der Vermessung der Kardiomyozytenflächen ganz herzlich bedanken.

Ein ganz liebes Dankeschön geht auch an Frau Prof. Dr. Nazha Hamdani, für die vielen Titin Western Blots und für die geduldige Beantwortung noch so kleinster Fragen.

Ein ganz großer Dank gilt auch meiner „Labor-Mama“ Katharina Völker. Katharina hatte immer ein offenes Ohr für technische und auch andere Probleme. Sie war stets hilfsbereit in allen Lebenslagen und erleichterte einem stets sehr die Arbeit im Tierstall. An dieser Stelle möchte ich auch unserer leider verstorbenen Birgit Gaßner von ganzem Herzen für Ihre bloße Anwesenheit damals danken. Sie hat mir gerade in den ersten Monaten meiner Zeit im Institut mit allem sehr geholfen und war immer für mich da, das werde ich nie vergessen!

Natürlich möchte ich mich auch noch ganz aufrichtig bei meinen Arbeitskollegen, insbesondere bei Frau Dr. Franziska Werner (Franzi) bedanken. Franzi war immer sofort zur Stelle, wenn mal etwas nicht funktionierte, etwas vergessen wurde oder andere kleine Problemchen im Laboralltag auftraten. Sie stand mir stets bei der Erstellung meiner Poster, Vorträge und letztendlich auch bei der Dissertation unterstützend zur Seite, sei es fachlich oder mit einem kleinen Cappuccino mit Sojamilch.

Frau Bärbel Zumkeller und Herrn Winfried Keller danke ich für die kleinen Gefallen, die sie mir stets abgenommen haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner geduldigen und liebevollen Familie danken. Sie waren immer für mich da gewesen und haben mir über manche Tiefs stets unterstützend zur Seite gestanden. Meinem Ehemann Tobias Michel kann ich nicht genug danken. Es gab keinen Tag, an dem er mir nicht mit aufbauenden, liebevollen und klaren Worten zur Seite stand und es so ermöglichte, diesen Weg zu beschreiten und zu beenden. Dies wäre ohne dich niemals möglich gewesen!!!

10 Literaturverzeichnis

Afzal, F. A., J. M.; Moltzau, L. R.; Sjaastad, I.; Levy, F. O.; Skomedal, T.; Osnes, J. B.; Qvigstad, E. (2011). "Differential regulation of beta2 -adrenoceptor-mediated inotropic and lusitropic response by PDE3 and PDE4 in failing and non-failing rat cardiac ventricle." Br J Pharmacol **162**(1): 54-71.

Baliga, R. S. P., M. E. J.; Dukinfield, M. S.; Chu, S. M.; Aubdool, A. A.; Bubbs, K. J.; Moyes, A. J.; Tones, M. A.; Hobbs, A. J. (2018). "Phosphodiesterase 2 inhibition preferentially promotes NO/guanylyl cyclase/cGMP signaling to reverse the development of heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(31): E7428-E7437.

Bartels, C. F. B., H.; Padayatti, P.; Rhee, D. K.; van Ravenswaaij-Arts, C.; Pauli, R. M.; Mundlos, S.; Chitayat, D.; Shih, L. Y.; Al-Gazali, L. I.; Kant, S.; Cole, T.; Morton, J.; Cormier-Daire, V.; Faivre, L.; Lees, M.; Kirk, J.; Mortier, G. R.; Leroy, J.; Zabel, B.; Kim, C. A.; Crow, Y.; Braverman, N. E.; van den Akker, F.; Warman, M. L. (2004). "Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux." Am J Hum Genet **75**(1): 27-34.

Bennett, B. D. B., G. L.; Vitangcol, R. V.; Jewett, J. R.; Burnier, J.; Henzel, W.; Lowe, D. G. (1991). "Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera." J Biol Chem **266**(34): 23060-23067.

Beyer, C. Z., C.; Palumbo-Zerr, K.; Mancuso, R.; Distler, A.; Dees, C.; Zerr, P.; Huang, J.; Maier, C.; Pachowsky, M. L.; Friebe, A.; Sandner, P.; Distler, O.; Schett, G.; Berger, P.; Distler, J. H. (2015). "Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGFbeta signalling." Ann Rheum Dis **74**(7): 1408-1416.

Biermann, M. R., M.; Moreno, A.; Wu, J.; Josiah-Durant, A.; Zipes, D. P. (1998). "Differential effects of cytochalasin D and 2,3 butanedione monoxime on isometric twitch force and transmembrane action potential in isolated ventricular muscle: implications for optical measurements of cardiac repolarization." J Cardiovasc Electrophysiol **9**(12): 1348-1357.

Brenner, B. M. B., B. J.; Gunning, M. E.; Zeidel, M. L. (1990). "Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide." Physiol Rev **70**(3): 665-699.

Brusq, J. M. M., E.; Guigui, L.; Kirilovsky, J. (1999). "Effects of C-type natriuretic peptide on rat cardiac contractility." Br J Pharmacol **128**(1): 206-212.

Buerger, A. R., O.; Sherwood, M. C.; Dorfman, A. L.; Bisping, E.; Abel, E. D.; Pu, W. T.; Izumo, S.; Jay, P. Y. (2006). "Dilated cardiomyopathy resulting from high-level myocardial expression of Cre-recombinase." J Card Fail **12**(5): 392-398.

Bukulmez, H. K., F.; Bartels, C. F.; Murakami, S.; Ortiz-Lopez, A.; Sattar, A.; Haqqi, T. M.; Warman, M. L. (2014). "Protective effects of C-type natriuretic peptide on linear growth and articular cartilage integrity in a mouse model of inflammatory arthritis." Arthritis Rheumatol **66**(1): 78-89.

Calvieri, C. R., S.; Volpe, M. (2012). "Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides." J Mol Med (Berl) **90**(1): 5-13.

Canaan-Kuhl, S. J., R. L.; Myers, B. D.; Pratt, R. E. (1992). "Identification of "B" receptor for natriuretic peptide in human kidney." Endocrinology **130**(1): 550-552.

- Chauhan, S. D. N., H.; Ahluwalia, A.; Hobbs, A. J. (2003). "Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1426-1431.
- Chinkers, M. G., D. L. (1989). "The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling." Science **245**(4924): 1392-1394.
- Chinkers, M. S., S.; Garbers, D. L. (1991). "Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system." J Biol Chem **266**(7): 4088-4093.
- Chrisman, T. D. G., D. L.; Parks, M. A.; Hardman, J. G. (1975). "Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung." J Biol Chem **250**(2): 374-381.
- Chrisman, T. D. S., S.; Potter, L. R.; Garbers, D. L. (1993). "Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides." J Biol Chem **268**(5): 3698-3703.
- Chun, T. H. I., H.; Ogawa, Y.; Tamura, N.; Takaya, K.; Igaki, T.; Yamashita, J.; Doi, K.; Inoue, M.; Masatsugu, K.; Korenaga, R.; Ando, J.; Nakao, K. (1997). "Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin." Hypertension **29**(6): 1296-1302.
- Chusho, H. T., N.; Ogawa, Y.; Yasoda, A.; Suda, M.; Miyazawa, T.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Kurihara, T.; Komatsu, Y.; Itoh, H.; Tanaka, K.; Saito, Y.; Katsuki, M.; Nakao, K. (2001). "Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4016-4021.
- Collinson, P. O. B., F. G.; Gaze, D. C. (2001). "Measurement of cardiac troponins." Ann Clin Biochem **38**(Pt 5): 423-449.
- Costello-Boerrigter, J. A. S., Wayne L Miller, Guido Boerrigter, Horng H Chen, Ruth Kempf, Candace Y Lee, John C Burnett Jr (2011). "Cenderitide (CD-NP), a novel peptide designed to activate both guanylyl cyclase B and A, activates the second messenger cGMP, suppresses aldosterone, and preserves GFR without reducing blood pressure in a proof-of-concept study in patients with chronic heart failure." BMC Pharmacology **11**: 18.
- D'Souza, S. P. D., M.; Baxter, G. F. (2004). "Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart." Pharmacol Ther **101**(2): 113-129.
- Davidson, V. S., D.; Hyde, R.; Grässel, S. (1996). Intensivkurs: Biochemie: mit 50 Tabellen.
- Day, A. J., Z.; Hyde, C.; Simbi, B.; Fowkes, R.; Lawson, C. (2018). "C-Type Natriuretic Peptide (CNP) Inhibition of Interferon-gamma-Mediated Gene Expression in Human Endothelial Cells In Vitro." Biosensors (Basel) **8**(3).
- de Bold, A. J. (1985). "Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart." Science **230**(4727): 767-770.
- Del Ry, S. (2013). "C-type natriuretic peptide: a new cardiac mediator." Peptides **40**: 93-98.
- Del Ry, S. C., M.; Vozzi, F.; Battolla, B.; Caselli, C.; Forini, F.; Segnani, C.; Prescimone, T.; Giannessi, D.; Mattii, L. (2011). "Expression of C-type natriuretic peptide and its receptor NPR-B in cardiomyocytes." Peptides **32**(8): 1713-1718.

- Del Ry, S. P., C.; Maltinti, M.; Emdin, M.; Giannessi, D. (2005). "C-type natriuretic peptide plasma levels increase in patients with chronic heart failure as a function of clinical severity." Eur J Heart Fail **7**(7): 1145-1148.
- Deshmane, S. P. P., S. J.; Crupper, S. S.; Robertson, D. C.; Schulz, S.; Waldman, S. A. (1997). "Cytoplasmic domains mediate the ligand-induced affinity shift of guanylyl cyclase C." Biochemistry **36**(42): 12921-12929.
- Dickey, D. M. B., J. C., Jr.; Potter, L. R. (2008). "Novel bifunctional natriuretic peptides as potential therapeutics." J Biol Chem **283**(50): 35003-35009.
- Dickey, D. M. D., D. L.; Margulies, K. B.; Potter, L. R. (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." J Mol Cell Cardiol **52**(3): 727-732.
- Dickey, D. M. F., D. R.; Bryan, P. M.; Xu, X.; Chen, Y.; Potter, L. R. (2007). "Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart." Endocrinology **148**(7): 3518-3522.
- Dickey, D. M. P., L. R. (2011). "Dendroaspis natriuretic peptide and the designer natriuretic peptide, CD-NP, are resistant to proteolytic inactivation." J Mol Cell Cardiol **51**(1): 67-71.
- Eckardt, D. T., M.; Doring, B.; Speidel, D.; Willecke, K.; Ott, T. (2004). "Spontaneous ectopic recombination in cell-type-specific Cre mice removes loxP-flanked marker cassettes in vivo." Genesis **38**(4): 159-165.
- Emdin, M. C., A.; Clemenza, F.; Galvani, M.; Latini, R.; Masson, S.; Mule, P.; Panteghini, M.; Valle, R.; Zaninotto, M.; Ganau, A.; Mariotti, R.; Volpe, M.; Aspromonte, N.; Cacciatore, G.; Cappelletti, P.; L'Abbate, A.; Miglio, F.; Ottani, F.; Pagani, F.; Passino, C.; Plebani, M.; Sarzani, R.; Zucchelli, G. (2005). "Recommendations for the clinical use of cardiac natriuretic peptides." Ital Heart J **6**(5): 430-446.
- Fedak, P. W., D. S. Smookler, Z. Kassiri, N. Ohno, K. J. Leco, S. Verma, D. A. Mickle, K. L. Watson, C. V. Hojilla, W. Cruz, R. D. Weisel, R. K. Li and R. Khokha (2004). "TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy." Circulation **110**(16): 2401-2409.
- Feil, R. H., F.; Kleppisch, T. (2005). "Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system." Rev Neurosci **16**(1): 23-41.
- Frantz, S. K., M.; Baba, H. A., Oberwinkler, H., Volker, K.; Gabetaner, B., Bayer, B.; Abebetaser, 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." Eur Heart J **34**(16): 1233-1244.
- Fujii, T. H., K.; Yasoda, A.; Takizawa, A.; Morozumi, N.; Nakamura, R.; Yotsumoto, T.; Kondo, E.; Yamashita, Y.; Sakane, Y.; Kanai, Y.; Ueda, Y.; Yamauchi, I.; Yamanaka, S.; Nakao, K.; Kuwahara, K.; Jindo, T.; Furuya, M.; Mashimo, T.; Inagaki, N.; Serikawa, T.; Nakao, K. (2018). "Rats deficient C-type natriuretic peptide suffer from impaired skeletal growth without early death." PLoS One **13**(3): e0194812.

Gambaryan, S. W., C.; Smolenski, A.; Walter, U.; Poller, W.; Haase, W.; Kurtz, A.; Lohmann, S. M. (1998). "Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 9003-9008.

Gotz, K. R. S., J. U.; Perera, R. K.; Steinbrecher, J. H.; Lehnart, S. E.; Kuhn, M.; Gorelik, J.; Balligand, J. L.; Nikolaev, V. O. (2014). "Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes." Circ Res **114**(8): 1235-1245.

Hagiwara, H. S., H.; Itakura, M.; Yoshimoto, T.; Furuya, M.; Tanaka, S.; Hirose, S. (1994). "Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B." J Biol Chem **269**(14): 10729-10733.

Hamdani, N., K. G. Bishu, M. von Frieling-Salewsky, M. M. Redfield and W. A. Linke (2013). "Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction." Cardiovasc Res **97**(3): 464-471.

Hamdani, N., J. Krysiak, M. M. Kreusser, S. Neef, C. G. Dos Remedios, L. S. Maier, M. Kruger, J. Backs and W. A. Linke (2013). "Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation." Circ Res **112**(4): 664-674.

Hamdani, N. K., J.; Kreusser, M. M.; Neef, S.; Dos Remedios, C. G.; Maier, L. S.; Kruger, M.; Backs, J.; Linke, W. A. (2013). "Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation." Circ Res **112**(4): 664-674.

Harding, P., X. P. Yang, J. Yang, E. Shesely, Q. He and M. C. LaPointe (2010). "Gene expression profiling of dilated cardiomyopathy in older male EP4 knockout mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **298**(2): H623-632.

Hata, K. T., Y.; Murakami, T.; Nishimura, R. (2017). "Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification." J Bone Metab **24**(2): 75-82.

Heineke, J. M., J. D. (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(8): 589-600.

Hilfiker-Kleiner, D. H., A.; Fuchs, M.; Kaminski, K.; Schaefer, A.; Schieffer, B.; Hillmer, A.; Schmiedl, A.; Ding, Z.; Podewski, E.; Podewski, E.; Poli, V.; Schneider, M. D.; Schulz, R.; Park, J. K.; Wollert, K. C.; Drexler, H. (2004). "Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury." Circ Res **95**(2): 187-195.

Hilfiker-Kleiner, D. L., A.; Drexler, H. (2005). "STAT3-mediated activation of myocardial capillary growth." Trends Cardiovasc Med **15**(4): 152-157.

Hirota, H. Y., K.; Kishimoto, T.; Taga, T. (1995). "Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4862-4866.

Hisado-Oliva, A. R.-M., A.; Sentchordi, L.; Funari, M. F. A.; Bezanilla-Lopez, C.; Alonso-Bernaldez, M.; Barraza-Garcia, J.; Rodriguez-Zabala, M.; Lerario, A. M.; Benito-Sanz, S.; Aza-Carmona, M.; Campos-Barros, A.; Jorge, A. A. L.; Heath, K. E. (2018). "Mutations in C-natriuretic peptide (NPPC): a novel cause of autosomal dominant short stature." Genet Med **20**(1): 91-97.

- Hofmann, F. W., J. W. (2013). "cGMP-dependent protein kinases (cGK)." Methods Mol Biol **1020**: 17-50.
- Holtwick, R., Baba, H. A., 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." J Cardiovasc Pharmacol **40**(5): 725-734.
- Horio, T. T., T.; Maki, T.; Yoshihara, F.; Suga, S.; Nishikimi, T.; Kojima, M.; Kawano, Y.; Kangawa, K. (2003). "Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts." Endocrinology **144**(6): 2279-2284.
- Hudson, B. H., C.; Saripalli, C., Granzier, H. (2011). "Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction." Circ Res **109**(8): 858-866.
- Hunt, P. J. R., A. M.; Espiner, E. A.; Nicholls, M. G.; Yandle, T. G. (1994). "Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man." J Clin Endocrinol Metab **78**(6): 1428-1435.
- Ichiki, T. D., N.; Burnett, J. C., Jr. (2018). "Natriuretic peptide based therapeutics for heart failure: Cenderitide: A novel first-in-class designer natriuretic peptide." Int J Cardiol.
- Igaki, T. I., H.; Suga, S. I.; Hama, N.; Ogawa, Y.; Komatsu, Y.; Yamashita, J.; Doi, K.; Chun, T. H.; Nakao, K. (1998). "Effects of intravenously administered C-type natriuretic peptide in humans: comparison with atrial natriuretic peptide." Hypertens Res **21**(1): 7-13.
- Ignarro, L. J. B., G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9269.
- Izumiya, Y. A., S.; Usuku, H.; Rokutanda, T.; Hanatani, S.; Ogawa, H. (2012). "Chronic C-Type Natriuretic Peptide Infusion Attenuates Angiotensin II-Induced Myocardial Superoxide Production and Cardiac Remodeling." Int J Vasc Med **2012**: 246058.
- Jacoby, J. J. K., A.; Liu, M. G.; Zhang, S. S.; Gao, Q.; Chai, G. X.; Ji, L.; Iwamoto, Y.; Li, E.; Schneider, M.; Russell, K. S.; Fu, X. Y. (2003). "Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12929-12934.
- Kalra, P. R. A., S. D.; Struthers, A. D.; Coats, A. J. (2001). "The role of C-type natriuretic peptide in cardiovascular medicine." Eur Heart J **22**(12): 997-1007.
- Kalra, P. R. C., J. R.; Bolger, A. P.; Anker, S. D.; Poole-Wilson, P. A.; Struthers, A. D.; Coats, A. J. (2003). "Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure." Circulation **107**(4): 571-573.
- Kaminski, K. A. O., E.; Bialobrzewska, K.; Kozuch, M.; Musial, W. J.; Winnicka, M. M. (2007). "The effects of moderate physical exercise on cardiac hypertrophy in interleukin 6 deficient mice." Adv Med Sci **52**: 164-168.
- Kanda, T. T., T. (2004). "Interleukin-6 and cardiovascular diseases." Jpn Heart J **45**(2): 183-193.
- Katz, A. (2011). Physiology of the heart.
- Kimura, H. M., F. (1974). "Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart." J Biol Chem **249**(21): 6910-6916.

Kimura, T. N., T.; Hosoda, H.; Ishikane, S.; Shintani, Y.; Inoue, M.; Miyazato, M.; Okumura, M.; Kangawa, K. (2015). "C-type natriuretic peptide attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice." J Surg Res **194**(2): 631-637.

Klinke, R. P., H. C.; Kurtz A.; Silbernagel, S. (2009). "Physiologie." Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York **6. Auflage, Münster, Regensburg und Würzburg**: 134-171.

Knollmann, B. C. R., D. M. (2008). "A genetic framework for improving arrhythmia therapy." Nature **451**(7181): 929-936.

Koentges, C. P., M. E.; Musse, C.; Pfeil, K.; Alvarez, S. V. V.; Hoppe, N.; Hoffmann, M. M.; Odening, K. E.; Sossalla, S.; Zirlik, A.; Hein, L.; Bode, C.; Wende, A. R.; Bugger, H. (2017). "Gene expression analysis to identify mechanisms underlying heart failure susceptibility in mice and humans." Basic Res Cardiol **113**(1): 8.

Koller, K. J. d. S., F. J.; Lowe, D. G.; Goeddel, D. V. (1992). "Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases." Mol Cell Biol **12**(6): 2581-2590.

Koller, K. J. L., D. G.; Bennett, G. L.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H.; Goeddel, D. V. (1991). "Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP)." Science **252**(5002): 120-123.

Kondo, E. Y., A.; Tsuji, T.; Fujii, T.; Miura, M.; Kanamoto, N.; Tamura, N.; Arai, H.; Kunieda, T.; Nakao, K. (2012). "Skeletal analysis of the long bone abnormality (Ibab/Ibab) mouse, a novel chondrodysplastic C-type natriuretic peptide mutant." Calcif Tissue Int **90**(4): 307-318.

Kotter, S. K., M.; Andresen, C.; Bottermann, K.; Grandoch, M.; Gorressen, S.; Heinen, A.; Moll, J. M.; Scheller, J.; Godecke, A.; Fischer, J. W.; Schmitt, J. P.; Kruger, M. (2016). "Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction." Circ Res **119**(9): 1017-1029.

Kruger, M. K., S.; Grutzner, A.; Lang, P.; Andresen, C.; Redfield, M. M.; Butt, E.; dos Remedios, C. G.; Linke, W. A. (2009). "Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs." Circ Res **104**(1): 87-94.

Kruger, M. L., W. A. (2009). "Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium." J Mol Cell Cardiol **46**(4): 490-498.

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

Kuhn, M. (2012). "Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides." Br J Pharmacol **166**(2): 522-531.

Kuhn, M. (2016). "Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors." Physiol Rev **96**(2): 751-804.

Kuroda, J. A., T.; Matsushima, S.; Zhai, P.; Schneider, M. D.; Sadoshima, J. (2010). "NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(35): 15565-15570.

Kuroda, J. S., J. (2010). "NADPH oxidase and cardiac failure." J Cardiovasc Transl Res **3**(4): 314-320.

- Kurtz, A. D. B., R.; Pfeilschifter, J.; Taugner, R.; Bauer, C. (1986). "Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4769-4773.
- Kuwahara, M., S. Sugano, K. Yayou, H. Tsubone and H. Kobayashi (1991). "Evaluation of a new tail-cuff method for blood pressure measurements in rats with special reference to the effects of ambient temperature." Jikken Dobutsu **40**(3): 331-336.
- Langenickel, T. H. B., J.; Pagel-Langenickel, I.; Lindner, M.; Monti, J.; Beuerlein, K.; Al-Saadi, N.; Plehm, R.; Popova, E.; Tank, J.; Dietz, R.; Willenbrock, R.; Bader, M. (2006). "Cardiac hypertrophy in transgenic rats expressing a dominant-negative mutant of the natriuretic peptide receptor B." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4735-4740.
- Lederhuber, H. C. L., V. (2010). "Basics Kardiologie." Elsevier.
- Lefta, M., K. S. Campbell, H. Z. Feng, J. P. Jin and K. A. Esser (2012). "Development of dilated cardiomyopathy in Bmal1-deficient mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **303**(4): H475-485.
- Levin, E. R. G., D. G.; Samson, W. K. (1998). "Natriuretic peptides." N Engl J Med **339**(5): 321-328.
- Lexow, J. P., T.; Sarathchandra, P.; Santini, M. P.; Rosenthal, N. (2013). "Cardiac fibrosis in mice expressing an inducible myocardial-specific Cre driver." Dis Model Mech **6**(6): 1470-1476.
- Li, L., J. Desantiago, G. Chu, E. G. Kranias and D. M. Bers (2000). "Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(3): H769-779.
- Li, P. W., D.; Lucas, J.; Oparil, S.; Xing, D.; Cao, X.; Novak, L.; Renfrow, M. B.; Chen, Y. F. (2008). "Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts." Circ Res **102**(2): 185-192.
- Li, Q. L., S. D. (2015). "Aversion and attraction through olfaction." Curr Biol **25**(3): R120-R129.
- Li, T. C., H. J.; Ohte, N.; Hasegawa, H.; Morimoto, A.; Herrington, D. M.; Little, W. C.; Li, W.; Cheng, C. P. (2016). "C-Type Natriuretic Peptide Improves Left Ventricular Functional Performance at Rest and Restores Normal Exercise Responses after Heart Failure." J Pharmacol Exp Ther **357**(3): 545-553.
- Li, Y. T., X.; Maimaitiyiming, H.; Clemons, K.; Cao, J. M.; Wang, S. (2012). "Overexpression of cGMP-dependent protein kinase I (PKG-I) attenuates ischemia-reperfusion-induced kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **302**(5): F561-570.
- Li, Z. Q. L., Y. L.; Li, G.; Li, B.; Liu, Y.; Li, X. F.; Liu, A. J. (2015). "Inhibitory effects of C-type natriuretic peptide on the differentiation of cardiac fibroblasts, and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and plasminogen activator inhibitor-1." Mol Med Rep **11**(1): 159-165.
- Louch, W. E., K. A. Sheehan and B. M. Wolska (2011). "Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer." J Mol Cell Cardiol **51**(3): 288-298.
- Lumsden, N. G. K., R. S.; Hobbs, A. J. (2010). "C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target." Curr Pharm Des **16**(37): 4080-4088.

- Mao, W. I., C.; Liu, J.; Sheu, S. S.; Fu, M.; Liang, C. S. (2008). "Darbepoetin alfa exerts a cardioprotective effect in autoimmune cardiomyopathy via reduction of ER stress and activation of the PI3K/Akt and STAT3 pathways." *J Mol Cell Cardiol* **45**(2): 250-260.
- Matsukawa, N. G., W. J.; Takahashi, N.; Pandey, K. N.; Pang, S.; Yamauchi, M.; Smithies, O. (1999). "The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7403-7408.
- Mattingly, M. T. B., R. R.; Heublein, D. M.; Wei, C. M.; Nir, A.; Burnett, J. C., Jr. (1994). "Presence of C-type natriuretic peptide in human kidney and urine." *Kidney Int* **46**(3): 744-747.
- Maurice, D. H. K., H.; Ahmad, F.; Wang, Y.; Chung, J.; Manganiello, V. C. (2014). "Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases." *Nat Rev Drug Discov* **13**(4): 290-314.
- Meier, S. A., K. W.; Aronsen, J. M.; Sjaastad, I.; Hougen, K.; Skomedal, T.; Osnes, J. B.; Qvigstad, E.; Levy, F. O.; Moltzau, L. R. (2017). "PDE3 inhibition by C-type natriuretic peptide-induced cGMP enhances cAMP-mediated signaling in both non-failing and failing hearts." *Eur J Pharmacol* **812**: 174-183.
- Melendez, G. C. M., J. L.; Levick, S. P.; Du, Y.; Janicki, J. S.; Brower, G. L. (2010). "Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats." *Hypertension* **56**(2): 225-231.
- Moltzau, L. R. A., J. M.; Meier, S.; Nguyen, C. H.; Hougen, K.; Orstavik, O.; Sjaastad, I.; Christensen, G.; Skomedal, T.; Osnes, J. B.; Levy, F. O.; Qvigstad, E. (2013). "SERCA2 activity is involved in the CNP-mediated functional responses in failing rat myocardium." *Br J Pharmacol* **170**(2): 366-379.
- Moncada, S. H., A. (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." *N Engl J Med* **329**(27): 2002-2012.
- Moyes, A. J. K., R. S.; Villar, I.; Bubb, K. J.; Baliga, R. S.; Lumsden, N. G.; Xiao, F.; Gane, P. J.; Rebstock, A. S.; Worthington, R. J.; Simone, M. I.; Mota, F.; Rivilla, F.; Vallejo, S.; Peiro, C.; Sanchez Ferrer, C. F.; Djordjevic, S.; Caulfield, M. J.; MacAllister, R. J.; Selwood, D. L.; Ahluwalia, A.; Hobbs, A. J. (2014). "Endothelial C-type natriuretic peptide maintains vascular homeostasis." *J Clin Invest* **124**(9): 4039-4051.
- Nakao, K. K., K.; Nishikimi, T.; Nakagawa, Y.; Kinoshita, H.; Minami, T.; Kuwabara, Y.; Yamada, C.; Yamada, Y.; Tokudome, T.; Nagai-Okatani, C.; Minamino, N.; Nakao, Y. M.; Yasuno, S.; Ueshima, K.; Sone, M.; Kimura, T.; Kangawa, K.; Nakao, K. (2017). "Endothelium-Derived C-Type Natriuretic Peptide Contributes to Blood Pressure Regulation by Maintaining Endothelial Integrity." *Hypertension* **69**(2): 286-296.
- Nakao, K. O., K.; Yasoda, A.; Yamanaka, S.; Fujii, T.; Kondo, E.; Koyama, N.; Kanamoto, N.; Miura, M.; Kuwahara, K.; Akiyama, H.; Bessho, K.; Nakao, K. (2015). "The Local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth." *Sci Rep* **5**: 10554.
- Naruko, T. U., M.; van der Wal, A. C.; van der Loos, C. M.; Itoh, H.; Nakao, K.; Becker, A. E. (1996). "C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions." *Circulation* **94**(12): 3103-3108.
- Nelson, D. L., ; Beginnen, K.; Cox, M. M.; Lehninger, A. L.; Nelson-Cox (2005). "Lehninger Biochemie: mit 40 Tabellen." *Springer: Berlin; Springer Science+Business Media Kapitel 7.3; Abb. 7-32*.
- O'Neal, K. R. A., R. (2007). "Conditional targeting: inducible deletion by Cre recombinase." *Methods Mol Biol* **366**: 309-320.

Obata, H. Y., B.; Tanaka, K.; Ohnishi, S.; Kataoka, M.; Miyahara, Y.; Ishibashi-Ueda, H.; Kodama, M.; Aizawa, Y.; Kangawa, K.; Nagaya, N. (2007). "CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis." Biochem Biophys Res Commun **356**(1): 60-66.

Ogawa, H. Q., Y.; Ogata, C. M.; Misono, K. S. (2004). "Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction." J Biol Chem **279**(27): 28625-28631.

Olney, R. C. (2006). "C-type natriuretic peptide in growth: a new paradigm." Growth Horm IGF Res **16 Suppl A**: S6-14.

Opie, L. H., G. Hasenfuss and D.L. Mann (2012). "a textbook of cardiovascular medicine." Elsevier Saunders **9 Aufl. Philadelphia/PA, USA**: 459-504.

Palmer, R. M. F., A. G.; Moncada, S. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-526.

Palmer, S. C. P., T. C.; Espiner, E. A.; Yandle, T. G.; Richards, A. M. (2009). "Regional release and clearance of C-type natriuretic peptides in the human circulation and relation to cardiac function." Hypertension **54**(3): 612-618.

Piper, H. M., J. Daut, A. Deussen, R. Brandes and R. Buss (2010). "Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie." **31. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag**: 517-626.

Potter, L. R. A.-H., S.; Dickey, D. M. (2006). "Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions." Endocr Rev **27**(1): 47-72.

Potter, L. R. G., D. L. (1992). "Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization." J Biol Chem **267**(21): 14531-14534.

Potter, L. R. H., T. (1998). "Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor." J Biol Chem **273**(25): 15533-15539.

Potter, L. R. H., T. (2001). "Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation." J Biol Chem **276**(9): 6057-6060.

Pugach, E. K. R., P. A.; Azofeifa, J. G.; Dowell, R. D.; Leinwand, L. A. (2015). "Prolonged Cre expression driven by the alpha-myosin heavy chain promoter can be cardiotoxic." J Mol Cell Cardiol **86**: 54-61.

Qian, J. Y. H., A.; Asada, Y.; Nishida, T.; Saito, Y.; Matsuda, T.; Ueno, H. (2002). "Local expression of C-type natriuretic peptide suppresses inflammation, eliminates shear stress-induced thrombosis, and prevents neointima formation through enhanced nitric oxide production in rabbit injured carotid arteries." Circ Res **91**(11): 1063-1069.

Qvigstad, E. M., L. R.; Aronsen, J. M.; Nguyen, C. H.; Hougen, K.; Sjaastad, I.; Levy, F. O.; Skomedal, T.; Osnes, J. B. (2010). "Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition." Cardiovasc Res **85**(4): 763-772.

Rockman, H. A., R. M. Adamson, W. P. Dembitsky, J. W. Bonar and B. E. Jaski (1991). "Acute fulminant myocarditis: long-term follow-up after circulatory support with left ventricular assist device." Am Heart J **121**(3 Pt 1): 922-926.

- Schachner, T. L., G.; Vertacnik, K.; Bonaros, N.; Nagiller, J.; Bonatti, J. (2004). "Is the axillary artery a suitable cannulation site in aortic surgery?" J Cardiovasc Surg (Torino) **45**(1): 15-19.
- Schäffler, A. H., U. (2000). Biologie, Anatomie, Physiologie: kompaktes Lehrbuch für die Pflegeberufe.
- Schmidt, R. L., F (2007). Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Springer Medizin Verlag.
- Schulz, S. S., S.; Bellet, R. A.; Singh, G.; Tubb, D. J.; Chin, H.; Garbers, D. L. (1989). "The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family." Cell **58**(6): 1155-1162.
- Scotland, R. S. C., M.; Foster, P.; Lovell, M.; Mathur, A.; Ahluwalia, A.; Hobbs, A. J. (2005). "C-type natriuretic peptide inhibits leukocyte recruitment and platelet-leukocyte interactions via suppression of P-selectin expression." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14452-14457.
- Seidman, J. G. S., C. (2001). "The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms." Cell **104**(4): 557-567.
- Skryabin, B. V. H., R.; Fabritz, L.; Kruse, M. N.; Veltrup, I.; Stypmann, J.; Kirchhof, P.; Sabrane, K.; Bubikat, A.; Voss, M.; Kuhn, M. (2004). "Hypervolemic hypertension in mice with systemic inactivation of the (floxed) guanylyl cyclase-A gene by alphaMHC-Cre-mediated recombination." Genesis **39**(4): 288-298.
- Smith, R. M. S., N.; Lacerda, L.; Opie, L. H.; Akira, S.; Chien, K. R.; Sack, M. N. (2004). "Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning." Cardiovasc Res **63**(4): 611-616.
- Soeki, T. K., I.; Okumura, H.; Tokudome, T.; Horio, T.; Mori, K.; Kangawa, K. (2005). "C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **45**(4): 608-616.
- Spiranec, K. C., W.; Werner, F., Nikolaev, V. O.; Naruke, T.; Koch, F.; Werner, A.; Eder-Negrin, P., Dieguez-Hurtado, R., Adams, R. H., Baba, H. A., Schmidt, H., Schuh, K.; Skryabin, B. V., Movahedi, K., Schweda, F., Kuhn, M. (2018). "Endothelial C-Type Natriuretic Peptide Acts on Pericytes to Regulate Microcirculatory Flow and Blood Pressure." Circulation.
- Stephanou, A. (2004). "Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury." J Cell Mol Med **8**(4): 519-525.
- Stingo, A. J. C., A. L.; Aarhus, L. L.; Burnett, J. C., Jr. (1992). "Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide." Am J Physiol **262**(1 Pt 2): H308-312.
- Stingo, A. J. C., A. L.; Heublein, D. M.; Wei, C. M.; Pittelkow, M. R.; Burnett, J. C., Jr. (1992). "Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma." Am J Physiol **263**(4 Pt 2): H1318-1321.
- Stypmann, J., K. Glaser, W. Roth, D. J. Tobin, I. Petermann, R. Matthias, G. Monnig, W. Haverkamp, G. Breithardt, W. Schmahl, C. Peters and T. Reinheckel (2002). "Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6234-6239.
- Sudoh, T., Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H. (1990). "C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain." Biochem Biophys Res Commun **168**(2): 863-870.

- Sudoh, T. K., K.; Minamino, N.; Matsuo, H. (1988). "A new natriuretic peptide in porcine brain." Nature **332**(6159): 78-81.
- Suga, S. I., H.; Komatsu, Y.; Ogawa, Y.; Hama, N.; Yoshimasa, T.; Nakao, K. (1993). "Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells." Endocrinology **133**(6): 3038-3041.
- Suga, S. I. I., H.; Komatsu, Y.; Ishida, H.; Jaki, T.; Yamashita, J.; Doi, K.; Chun, T. H.; Yoshimasa, T.; Tanaka, I.; Nakao, K. (1998). "Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages." Endocrinology **139**(4): 1920-1926.
- Suga, S. N., K.; Hosoda, K.; Mukoyama, M.; Ogawa, Y.; Shirakami, G.; Arai, H.; Saito, Y.; Kambayashi, Y.; Inouye, K. (1992). "Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide." Endocrinology **130**(1): 229-239.
- Suga, S. N., K.; Itoh, H.; Komatsu, Y.; Ogawa, Y.; Hama, N.; Imura, H. (1992). "Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system"." J Clin Invest **90**(3): 1145-1149.
- Suzuki, E. H., Y.; Hayakawa, H.; Omata, M.; Kojima, M.; Kangawa, K.; Minamino, N.; Matsuo, H. (1993). "Evidence for C-type natriuretic peptide production in the rat kidney." Biochem Biophys Res Commun **192**(2): 532-538.
- Tamura, N. D., L. K.; Hammer, R. E.; Shelton, J. M.; Richardson, J. A.; Garbers, D. L. (2004). "Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17300-17305.
- Thomas, L. (1998). "Labor und Diagnose (Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik)." **5. Auflage**.
- Tim O'Connell, Y. N. (2002). "Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart." 1-13.
- Tokudome, T. H., T.; Soeki, T.; Mori, K.; Kishimoto, I.; Suga, S.; Yoshihara, F.; Kawano, Y.; Kohno, M.; Kangawa, K. (2004). "Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways." Endocrinology **145**(5): 2131-2140.
- Tsuji, T. K., E.; Yasoda, A.; Inamoto, M.; Kiyosu, C.; Nakao, K.; Kunieda, T. (2008). "Hypomorphic mutation in mouse Nppc gene causes retarded bone growth due to impaired endochondral ossification." Biochem Biophys Res Commun **376**(1): 186-190.
- Tsutamoto, T., T. Hisanaga, A. Wada, K. Maeda, M. Ohnishi, D. Fukai, N. Mabuchi, M. Sawaki and M. Kinoshita (1998). "Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure." J Am Coll Cardiol **31**(2): 391-398.
- Tsutamoto, T. H., T., Wada, A.; Maeda, K.; Ohnishi, M.; Fukai, D.; Mabuchi, N.; Sawaki, M.; Kinoshita, M. (1998). "Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure." J Am Coll Cardiol **31**(2): 391-398.
- Vaandrager, A. B. H., B. M.; de Jonge, H. R. (2005). "Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II." Front Biosci **10**: 2150-2164.

- Vane, J. R. A., E. E.; Botting, R. M. (1990). "Regulatory functions of the vascular endothelium." N Engl J Med **323**(1): 27-36.
- Vogel, B. S., H.; Hofmann, U.; Frantz, S. (2015). "Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy." MethodsX **2**: 124-134.
- von Lueder, T. G. S., S. J.; Wang, B. H.; Kompa, A. R.; Atar, D.; Burnett, J. C., Jr.; Krum, H. (2013). "Renin-angiotensin blockade combined with natriuretic peptide system augmentation: novel therapeutic concepts to combat heart failure." Circ Heart Fail **6**(3): 594-605.
- Wang, W., W. Zhu, S. Wang, D. Yang, M. T. Crow, R. P. Xiao and H. Cheng (2004). "Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway." Circ Res **95**(8): 798-806.
- Wang, Y. d. W., M. C.; Sterner-Kock, A.; Stepan, H.; Schultheiss, H. P.; Duncker, D. J.; Walther, T. (2007). "Cardiomyocyte-restricted over-expression of C-type natriuretic peptide prevents cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction in mice." Eur J Heart Fail **9**(6-7): 548-557.
- Wei, C. M. H., D. M.; Perrella, M. A.; Lerman, A.; Rodeheffer, R. J.; McGregor, C. G.; Edwards, W. D.; Schaff, H. V.; Burnett, J. C., Jr. (1993). "Natriuretic peptide system in human heart failure." Circulation **88**(3): 1004-1009.
- Wu, C. W., F.; Pan, J.; Morser, J.; Wu, Q. (2003). "Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide." J Biol Chem **278**(28): 25847-25852.
- Wu, L. H. Z., Q.; Zhang, S.; Meng, L. Y.; Wang, Y. C.; Sheng, C. J. (2018). "Effects of gene knockdown of CNP on ventricular remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury through NPRB/Cgmp signaling pathway in rats." J Cell Biochem **119**(2): 1804-1818.
- Xia, Y. L., K.; Li, N.; Corbett, D.; Mendoza, L.; Frangogiannis, N. G. (2009). "Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload." Histochem Cell Biol **131**(4): 471-481.
- Yamasaki, R. W., Y.; McNabb, M.; Greaser, M.; Labeit, S.; Granzier, H. (2002). "Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes." Circ Res **90**(11): 1181-1188.
- Yamazaki, A. Y., H.; Yamazaki, M.; Honkawa, H.; Matsuura, I.; Usukura, J.; Yamazaki, R. K. (2003). "A critical role for ATP in the stimulation of retinal guanylyl cyclase by guanylyl cyclase-activating proteins." J Biol Chem **278**(35): 33150-33160.
- Yan, W. W., F.; Morser, J.; Wu, Q. (2000). "Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8525-8529.
- Yasoda, A. K., Y.; Chusho, H.; Miyazawa, T.; Ozasa, A.; Miura, M.; Kurihara, T.; Rogi, T.; Tanaka, S.; Suda, M.; Tamura, N.; Ogawa, Y.; Nakao, K. (2004). "Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway." Nat Med **10**(1): 80-86.
- Yasoda, A. O., Y.; Suda, M.; Tamura, N.; Mori, K.; Sakuma, Y.; Chusho, H.; Shiota, K.; Tanaka, K.; Nakao, K. (1998). "Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway." J Biol Chem **273**(19): 11695-11700.

Yasue, H. O., 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." J Clin Invest **83**(1): 46-51.

Yoder, A. R. S., M. D.; Griffin, T. J.; Potter, L. R. (2010). "Mass spectrometric identification of phosphorylation sites in guanylyl cyclase A and B." Biochemistry **49**(47): 10137-10145.

Yu, X. G., L.; Niu, L.; Lian, X.; Ma, H.; Pang, L. (2018). "The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe?" Oxid Med Cell Longev **2018**: 8364848.

Zakeri, R. B., J. C. (2011). "Designer natriuretic peptides: a vision for the future of heart failure therapeutics." Can J Physiol Pharmacol **89**(8): 593-601.

Zakeri, R. S., S. J.; Sandberg, S. M.; Heublein, D. M.; Scott, C. G.; Burnett, J. C., Jr. (2013). "Urinary C-type natriuretic peptide: a new heart failure biomarker." JACC Heart Fail **1**(2): 170-177.

Zhao, L. C., G.; Jin, R.; Afzal, M. R.; Samanta, A.; Xuan, Y. T.; Girgis, M.; Elias, H. K.; Zhu, Y.; Davani, A.; Yang, Y.; Chen, X.; Ye, S.; Wang, O. L.; Chen, L.; Hauptman, J.; Vincent, R. J.; Dawn, B. (2016). "Deletion of Interleukin-6 Attenuates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction." Circ Res **118**(12): 1918-1929.

Zhu, W., Y. Zou, I. Shiojima, S. Kudoh, R. Aikawa, D. Hayashi, M. Mizukami, H. Toko, F. Shibasaki, Y. Yazaki, R. Nagai and I. Komuro (2000). "Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy." J Biol Chem **275**(20): 15239-15245.

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Längsschnitt des Herzens	- 1 -
Abb. 2	Darstellung einer Sarkomerstruktur.....	- 2 -
Abb. 3	Die Kontraktion führt zur Verkürzung des Sarkomers	- 3 -
Abb. 4	Schema der elektromechanischen Kopplung.....	- 5 -
Abb. 5	Formen kardialer Hypertrophie.....	- 8 -
Abb. 6	Biosynthese und Prozessierung des biologisch aktiven CNP (Zakeri 2013).	- 10 -
Abb. 7	Struktur des GC-B Rezeptor (Potter 2006).	- 12 -
Abb. 8	Versuchsaufbau zur arteriellen Blutdruckmessung an wachen Mäusen	- 20 -
Abb. 9	Nicht invasive Blutdruckmessungen.....	- 43 -
Abb. 10	Effekte von CNP auf die Nachlast des linken Ventrikels.....	- 44 -
Abb. 11	Effekte von CNP auf die makroskopische Herzhypertrophie	- 45 -
Abb. 12	Effekte von CNP auf die hypertensive TAC-induzierte Herzhypertrophie	- 46 -
Abb. 13	Effekte von CNP auf die TAC-induzierte Fibrose	- 47 -
Abb. 14	Effekte von CNP auf die linksventrikuläre Pumpfunktion des Herzens.....	- 49 -
Abb. 15	Effekte von CNP auf die Expression und Phosphorylierung von PLB und Titin	- 51 -
Abb. 16	Effekte von CNP auf die Expression inflammatorischer Proteine	- 52 -
Abb. 17	Genotypisierung der CM GC-B KO Mäuse	- 53 -
Abb. 18	Effekte von CNP auf den cGMP-Gehalt	- 54 -
Abb. 19	Effekte von CNP auf die Phosphorylierung von PLB und Titin in kultivierten Kardiomyozyten.....	- 55 -
Abb. 20	Nicht invasive Blutdruckmessungen.....	- 56 -
Abb. 21	Effekte des Alters auf die Entwicklung einer makroskopischen Herzhypertrophie	- 57 -
Abb. 22	Effekte des Alters auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie	- 58 -
Abb. 23	Effekte des Alters auf die linksventrikuläre Pumpfunktion.....	- 59 -
Abb. 24	Effekte des Alters auf die linksventrikuläre Phosphorylierung von Phospholamban	- 60 -
Abb. 25	Effekte des Alters auf die Entwicklung einer makroskopischen Herzhypertrophie	- 61 -
Abb. 26	Effekte des Alters auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie	- 62 -
Abb. 27	Effekte des Alters auf die linksventrikuläre Pumpfunktion.....	- 63 -
Abb. 28	Linksventrikuläre CNP mRNA Expression, basal und nach TAC in <i>C57Bl6</i> Mäusen.....	- 65 -
Abb. 29	Effekte der TAC auf die Nachlast in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 66 -
Abb. 30	Effekte der TAC auf die Entwicklung einer makroskopischen Herzhypertrophie in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 67 -

Abb. 31	Effekte der TAC auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 68 -
Abb. 32	Effekte der TAC auf die Länge der linksventrikulären Kardiomyozyten in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 69 -
Abb. 33	Effekte der TAC auf die linksventrikuläre interstitielle Fibrose in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 71 -
Abb. 34	Effekte der TAC auf die linksventrikuläre Pumpfunktion in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 72 -
Abb. 35	Effekte der TAC auf die linksventrikuläre Expression und Phosphorylierung von PLB und Titin in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 75 -
Abb. 36	Effekte der TAC auf die linksventrikuläre mRNA Expression von Zytokinen in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 77 -
Abb. 37	Effekte der TAC auf die Expression der NADPH Oxidase 4 in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 78 -
Abb. 38	Effekte der TAC auf die linksventrikuläre Phosphorylierung von STAT3 in Kontrolltieren und in CM GC-B KO Mäusen	- 79 -