

1. Einleitung

1.1 Chronische Herzinsuffizienz (CHI)

1.1.1 Begriffsbestimmung

Der Begriff Herzinsuffizienz beschreibt ein klinisches Syndrom, das durch Dyspnoe und Erschöpfung während körperlicher Belastung oder in Ruhe gekennzeichnet ist und auf eine strukturelle oder funktionelle Herzerkrankung zurückgeführt werden kann. Eine ältere Definition geht von einem Zustand ungenügender kardialer Pumpleistung im Verhältnis zum Bedarf peripherer Organe aus ^{1}. Prinzipiell kann jede Herzerkrankung zur Herzinsuffizienz führen. Die häufigsten Ursachen in Europa und den USA sind koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie und Erkrankungen der Herzklappen ^{1}.

Es werden zwei Entitäten der CHI unterschieden. Die diastolische Herzinsuffizienz ist durch ein hypertrophiertes Myokard mit eingeschränkter Relaxation und erhaltener systolischer Funktion gekennzeichnet. Charakteristika der systolischen Herzinsuffizienz sind die verminderte Ejektionsfraktion und das dilatierte Myokard ^{1,2}.

1.1.2 Pathophysiologie

Eine initiale Myokardschädigung leitet die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ein. Ätiologisch kann es sich hierbei zum Beispiel um eine Myokardischämie, entzündliche Myokarderkrankungen oder genetische Aberrationen handeln. Die Einschränkung der kardialen Pumpfunktion wird zum einen durch adaptive Prozesse des Myokards in Form von Hypertrophie und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix kompensiert. Zum anderen führt die eingeschränkte kardiale Funktion zur Aktivierung verschiedener neurohumoraler Systeme wie dem Renin- Angiotensin- Aldosteron- System (RAAS), dem sympathischen Nervensystem, dem Endothelinsystem und dem natriuretischen Peptidsystem ^{1,3,4}.

1.1.2.1 Frank- Starling- Mechanismus und Laplace'sches Gesetz

Eine Zunahme des Schlagvolumens durch erhöhte enddiastolische myokardiale Dehnung entsprechend dem Frank- Starling- Mechanismus wie sie beim gesunden Myokard erfolgt, ist aufgrund der initialen Myokardschädigung nur begrenzt möglich. Für das gleiche

Schlagvolumen benötigt der insuffiziente Herzmuskel höhere Füllungsdrücke. Hieraus resultieren kontinuierlich erhöhte enddiastolische Volumina, die nach dem Laplace'schen Gesetz zur vermehrten Wandspannung führen. Die adaptiven Prozesse in Form von myokardialer Hypertrophie und Vermehrung der extrazellulären Matrix sind daher als Anpassungsreaktion des Myokards zur Verminderung der Wandspannung aufzufassen ^{4}.

1.1.2.2 Neurohumorale Aktivierung

Die Aktivierung neurohumoraler Systeme zielt auf eine Verbesserung der Perfusion peripherer Organe ab. Die persistierende Aktivierung von RAAS, sympathischem Nervensystem, Endothelinsystem und natriuretischem Peptidsystem geht mit dem Überwiegen vasokonstriktorischer Systeme einher. Die hiermit verbundene Zunahme von Vor- und Nachlast des vorgeschädigten Myokards bedeutet eine weitere Verschlechterung der kardialen Situation. Ferner sind für Noradrenalin, den Transmitter des aktivierten sympathischen Nervensystems, direkte kardiotoxische Wirkungen bekannt. Die Höhe der Plasmakonzentration korreliert mit Schwere und Prognose der Herzinsuffizienz. Angiotensin II (AT II) und Endothelin 1 werden mit mitogenen Wirkungen in Verbindung gebracht, die Relevanz im Hinblick auf kardiales und vaskuläres Remodeling erlangen. Wichtige Antagonisten der vasokonstriktorisches wirkenden Mediatoren sind das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das brain natriuretische Peptid (BNP), deren Plasmakonzentrationen bei der CHI erhöht sind. Die BNP- Konzentration korreliert mit kardialer Funktion und Prognose ^{1,3,4}. Neben der neurohumoralen Aktivierung lässt sich ferner eine Zunahme verschiedener Zytokine wie Interleukin 6 und TNF α nachweisen, deren Plasmakonzentration ebenfalls mit der Erkrankungsschwere korreliert. Die Zytokinfreisetzung wird auf Entzündungs- und Umbauvorgänge nach der initialen Myokardschädigung zurückgeführt ^{3,4}.

Die morphologischen und neurohumoralen Veränderungen, die initial der Verbesserung der kardiovaskulären Situation dienen, führen aufgrund ihrer Persistenz zur kardialen Maladaptation und Progression der CHI ^{3,4}. Eine Unterbrechung der vasokonstriktorisches Systeme und eine Unterstützung des natriuretischen Peptidsystems stellen daher mögliche therapeutische Angriffspunkte dar.

1.2 Das System der natriuretischen Peptide

Die Familie der natriuretischen Peptide wird von den Peptidhormonen atriales natriuretisches Peptid (ANP), brain natriuretisches Peptid (BNP), C- Typ natriuretisches Peptid (CNP) und dendroaspis natriuretisches Peptid (DNP) gebildet. Als Variante eines alternativ prozessierten ANP renalen Ursprungs gilt das Urodilatin (ANP-95-126). ANP und BNP werden aufgrund ihres bedeutendsten Syntheseortes auch als kardiale natriuretische Peptide bezeichnet ^{5,6,7}.

Allen natriuretischen Peptiden ist die natriuretische, diuretische und auf glatte Muskelzellen relaxierende Wirkung gemeinsam. Unterschiede bestehen hinsichtlich einer unterschiedlich starken Ausprägung der einzelnen Wirkungen. Neben einer vergleichbaren biologischen Wirksamkeit zeigen sie strukturelle Ähnlichkeiten auf genetischer Ebene und Peptidebene. Die Peptide weisen eine Ringstruktur auf, deren Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen natriuretischen Peptiden konserviert und sowohl für die Rezeptorerkennung als auch für die biologische Aktivität essentiell ist. Außerhalb der Ringstruktur besitzen die natriuretischen Peptide amino- und carboxyterminale Aminosäureketten, die sich in Länge und Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden ^{8,7}. In **Abbildung 1** ist die Aminosäurestruktur der natriuretischen Peptide grafisch dargestellt.

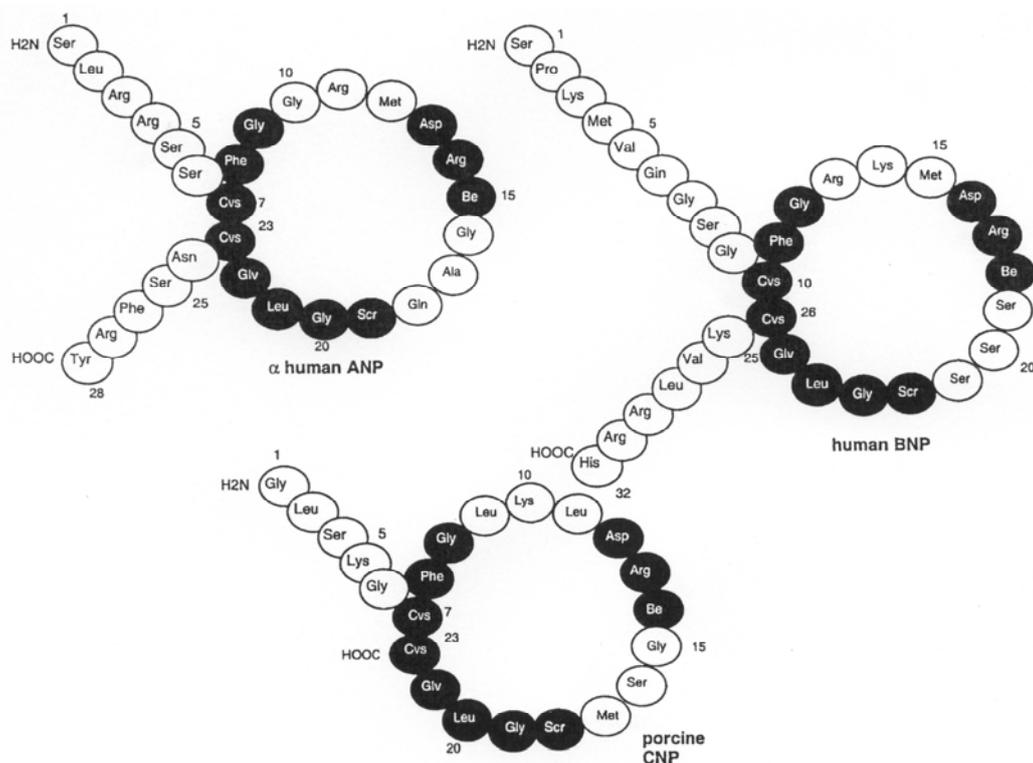


Abbildung 1: Aminosäurestruktur der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP, aus ^{9}.

1.2.1 Synthese und Sekretion der natriuretischen Peptide

Jedes natriuretische Peptid wird von einem eigenen Gen kodiert, die zum Teil auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Die Homologie der natriuretischen Peptide ist zwischen den Säugetierspezies am stärksten ausgeprägt. BNP zeigt diesbezüglich die größten Abweichungen zwischen den Spezies ^{10,7}. Der Ablauf der Synthese natriuretischer Peptide ist für ANP am besten untersucht. Die Translation der mRNA führt zur Bildung eines Präpro-Peptids mit einer speziesspezifischen Länge von 149 – 153 Aminosäuren, bestehend aus einem Signalpeptid und dem Pro- ANP. Nach einer posttranslationalen Modifikation wird Pro- ANP (ANP-1-126) in sekretorischen Granula gespeichert. Im Rahmen der Sekretion erfolgt die proteolytische Spaltung des Pro- ANP durch die Protease Corin in das biologisch aktive carboxyterminale ANP-98-126 und ANP-1-97. Die biologische Aktivität des aminoterminalen ANP-1-97 konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden ^{5,11}.

BNP und CNP durchlaufen einen analogen Syntheseweg, an dessen Ende die Freisetzung des biologisch aktiven carboxyterminalen Spaltprodukts steht. Die Länge des aktiven Peptids variiert zwischen 22 Aminosäuren (CNP), 28 Aminosäuren (ANP) und 32 Aminosäuren (BNP). Neben der 22 Aminosäuren- Form konnte für CNP auch ein 53 Aminosäuren zählendes carboxyterminalen Fragment identifiziert werden. Dieses enthält die kürzere CNP- Form, die als reifes CNP angesehen wird ^{7}.

Die Freisetzung der einzelnen natriuretischen Peptide erfordert unterschiedliche Stimuli. Für ANP stellt die Dehnung des atrialen Myokards den adäquaten Stimulus dar, für BNP dominieren endokrine Faktoren wie AT II und Endothelin 1. Verschiedene Zytokine, wie TGF- β , TNF α oder Interleukin 1 α , werden neben der Freisetzung auch mit der Synthese von CNP in Verbindung gebracht ^{12,5,13}.

1.2.2 Biologische Wirkungen von ANP und BNP

ANP und BNP sind aufgrund ihrer renalen und kardiovaskulären Wirkungen im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz von zentraler Bedeutung. Außerdem werden ANP und BNP auf parakriner Ebene mehrere biologische Effekte zugeschrieben. Das Wirkspektrum beider natriuretischer Peptide ist weitgehend identisch, weil der gleiche natriuretische Peptidrezeptor A (NPR- A) stimuliert wird. Die Agonistenbindung an den NPR- A hat intrazellulär die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zur Folge, dem second messenger der

natriuretischen Peptide. Die Wirkung von ANP scheint jedoch aufgrund der im Vergleich zum BNP höheren Rezeptoraffinität zum NPR- A im Vordergrund zu stehen ^{12,13,7}.

1.2.2.1 Renale Wirkungen

Die physiologischen renalen Wirkung von ANP lassen sich in glomerulär bedingte Effekte und modulierende Einflüsse am Sammelrohr unterteilen. Es resultiert eine natriuretische und diuretische ANP- Wirkung. Glomerulär kann dies auf eine Dilatation des Vas afferens bei gleichzeitiger Konstriktion des Vas efferens zurückgeführt werden. Die Folge ist ein Anstieg des hydrostatischen Drucks in den glomerulären Kapillaren mit konsekutiver Zunahme der glomerulären Filtrationsrate. In den Sammelrohren konnte eine Hemmung der Natriumresorption auf ANP zurückgeführt werden, die ebenfalls Natriurese und Diurese erklären kann ^{12,5}. Urodilatin besitzt im Vergleich zu ANP bei systemischer Infusion äquimolarer Dosen eine stärkere diuretische und natriuretische Wirkung ^{5}.

Unabhängig von den direkten ANP- Wirkungen kommt es zur Antagonisierung des RAAS an verschiedenen Stellen des Nephrons. So werden die Sekretion der Protease Renin und die aldosteronabhängige Translokation von Natriumkanälen in die apikale Plasmamembran der Sammelrohre gehemmt. Natriumretinierende Effekte von AT II werden durch die vermehrte ANP- abhängige cGMP- Bildung antagonisiert. Die ADH- abhängige Wasserreabsorption in den Sammelrohren wird ebenfalls durch ANP gehemmt ^{5}.

1.2.2.2 Kardiovaskuläre Wirkungen

Allen bisher bekannten natriuretischen Peptiden ist eine vasodilatierende Wirkung gemeinsam. Für ANP und CNP sind außerdem negativ inotrope Eigenschaften bekannt, die für ANP auf eine Proteinkinase G- abhängige Hemmung von Ca^{2+} - Kanälen zurückgeführt werden ^{13}. Die blutdrucksenkende Wirkung der natriuretischen Peptide resultiert neben den vasodilatierenden Eigenschaften auch aus den renalen Wirkungen, die zu einer Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens und einer Inhibition vasokonstriktorischer Systeme führen ^{5,8}. Auf die dominierende Rolle des ANP unter den natriuretischen Peptiden bezüglich der Blutdruckregulation weist der Phänotyp eines ANP- knockout- Modells der Maus hin. Träger der homozygoten Deletion sind im Vergleich zur Kontrollgruppe durch eine salzsensitive Hypertonie gekennzeichnet ^{14}.

1.2.2.3 Parakrine Wirkungen

Das Wirkspektrum von ANP und BNP erstreckt sich zusätzlich auf die Kontrolle von Wachstum und Proliferation. Für ANP konnten antiproliferative und wachstumshemmende Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte und glomeruläre Mesangiumzellen demonstriert werden. Wachstumsmodulierende Wirkungen von ANP wurden unter anderem für Endothelzellen, Cardiomyocyten und kardiale Fibroblasten nachgewiesen ^{15,16,17}. Der Phänotyp von ANP-knockout- Mäusen zeigt neben der bereits genannten arteriellen Hypertonie eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie und unterstützt somit die Hypothese der wachstumshemmenden ANP-Wirkung. Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen und ventrikulären Cardiomyocyten der Ratte identifizierten die mitogenassoziierte Proteinkinase (MAPK)- Familie als möglichen intrazellulären Interaktionspartner von ANP ^{18,19,17}.

In Bezug auf das kardiale Remodeling, das heißt der Proliferation von kardialen Fibroblasten mit konsekutiver Synthese extrazellulärer Matrix, scheint BNP das dominierende kardiale natriuretische Peptid zu sein. Sowohl das knockout- Modell des von ANP und BNP gemeinsam genutzten Rezeptors NPR- A, als auch das BNP- knockout- Modell weisen eine kardiale Fibrose auf, die im entsprechenden ANP- Modell nicht auftritt ^{20}. BNP hemmt die Kollagenbildung und induziert die Expression von Matrixmetalloproteinasen über einen cGMP- abhängigen Proteinkinase G- gekoppelten Signalweg ^{21}. Untersuchungen an kardialen Fibroblasten belegen eine Hemmung der Kollagensynthese durch ANP *in vitro* ^{22}.

1.2.2.4 Interaktion mit anderen neurohumoralen Systemen

Interaktionen von natriuretischem Peptidsystem und RAAS lassen sich auch extrarenal nachweisen. ANP antagonisiert Aldosteron nicht nur auf Ebene der Sammelrohre, sondern hemmt das Wachstum Aldosteron- produzierender Zellen in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde ^{15}. *In vitro* Versuche zeigen außerdem eine verminderte AT II- induzierte Aldosteronbildung nach ANP- Applikation, die an die Aktivität der Guanylatcyclase gebunden ist ^{23,24}. Zentral führt ANP zu einer Hemmung des AT II- induzierten Durstgefühls und verhindert die ADH- Sekretion aus dem Hypophysenhinterlappen ^{8}. Nach intrazerebroventrikulärer ANP- Applikation kommt es zur Verminderung des Sympathikotonus, die sich in einer Abnahme von Herzfrequenz und Blutdruck ausdrückt ^{25}.

Interaktionen sind auch mit dem Endothelin- System bekannt. Endothelin 1 induziert die Bildung von ANP und BNP. Ferner antagonisiert es die proapoptischen und negativ inotropen Effekte

der natriuretischen Peptide. Andererseits hemmen ANP und BNP sowohl die Bildung als auch die Sekretion von Endothelin 1 ^{13}. Für ANP ist eine Endothelin 1- antagonistische Wirkung auf glomeruläre Mesangiumzellen der Ratte bekannt, in die Proteinkinase C (PKC) und MAPK-Familie involviert sind ^{17}.

1.2.3 Expression von ANP und BNP

Hauptbildungsort beider Peptide sind die Cardiomyocyten, wobei Unterschiede hinsichtlich des Ursprungskompartiments, der gebildeten Menge und der Expressionsregulation bestehen.

1.2.3.1 ANP- Expression

Unter physiologischen Bedingungen sind rechtes und linkes Atrium der Syntheseort mit der höchsten mRNA- und Proteinexpression des ANP ^{26,7}. Die mRNA- Expression von ANP ist im Ventrikelmyokard des Erwachsenen im physiologischen Zustand sehr gering ^{26,5}. Zur Induktion der ventrikulären Expression kommt es bei Zunahme der Wanddehnung und kann in Abhängigkeit hiervon lokal moduliert werden ^{27,7,28}. Erhöhte ANP- Plasmakonzentrationen können bei der CHI, Hypertonie und erhöhtem zentralvenösen Druck gemessen werden ^{9,29}. Nach einem Myokardinfarkt korreliert die Höhe der ANP- Plasmakonzentration mit der Höhe des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP), hingegen nicht mit dem zentralvenösen Druck und der Plasmanatriumkonzentration ^{30}.

Eine ANP- Bildung erfolgt auch im Nebennierenmark, den Nieren und verschiedenen ZNS-Arealen ^{5,31}.

1.2.3.2 BNP- Expression

BNP wurde erstmals aus dem ZNS isoliert, lässt sich dort jedoch nur in geringen Mengen nachweisen ^{10}. Von größerer Bedeutung ist die BNP- Synthese durch Cardiomyocyten. Neben einer atrialen Bildung erfolgt im Gegensatz zum ANP auch unter physiologischen Bedingungen eine ventrikuläre Synthese, die sich in einer höheren mRNA- Expression ausdrückt. Insgesamt ist die BNP- mRNA- Expression im Herzen im Vergleich zu ANP unter physiologischen Bedingungen geringer. Die messbaren BNP- Mengen in der Blutzirkulation sind folglich niedriger als für ANP ^{9}. BNP- Plasmakonzentrationen korrelieren bei kardiovaskulären Erkrankungen mit dem linksventrikulären Durchmesser und der linksventrikulären

Ejektionsfraktion ^{32}. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass in kardialen Fibroblasten ebenfalls eine BNP- Bildung erfolgt ^{21}.

1.2.3.3 ANP- und BNP- Expression bei der chronischen Herzinsuffizienz

ANP und BNP stellen bei der CHI eine wichtige Gegenregulation zu den wasser- und natriumretinierenden Systemen RAAS und sympathisches Nervensystem dar. Die Entwicklung einer CHI wird von einer Induktion der Synthese beider Peptide mit konsekutivem Anstieg der Plasmakonzentrationen begleitet ^{29,33,27,30}. ANP und BNP wirken einer Progression der CHI vom kompensierten zum dekompenzierten Stadium entgegen ^{21}.

ANP und BNP zeigen in Abhängigkeit von der Schwere der kardialen Funktionseinschränkung unterschiedliche Expressionsmuster. Die Messung der BNP- Plasmakonzentration kann zur Diagnostik, Risikostratifizierung und zum Monitoring von Patienten mit CHI genutzt werden. Der Anstieg der BNP- Expression ist im Vergleich zum ANP stärker, erfolgt schneller und korreliert besser mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz ^{34,33,27}. Expressionsverhalten und Expressionskinetik von BNP entsprechen einem primary response gene. Sie sind durch eine α_1 - agonistische Transduktion bedingt, an der PKC und MAPK- abhängige und - unabhängige Signalwege beteiligt sind ^{35}.

Im Rahmen der CHI induzieren verschiedene aktivierte neurohumorale Systeme die Bildung und Freisetzung der natriuretischen Peptide. AT II, Endothelin 1 und α_1 - agonistische Katecholamine sind als Induktoren von ANP und BNP bekannt ^{13,36}. Die Signaltransduktion unter Beteiligung der PKC ist für die Induktion der Synthese sowohl von ANP als auch BNP von zentraler Bedeutung. Die PKC ist nicht nur an der BNP- Synthese sondern auch an dessen Sekretion beteiligt, wogegen für ANP zusätzlich ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration notwendig ist ^{36}.

1.2.4 C- Typ natriuretisches Peptid (CNP)

CNP wurde als drittes natriuretisches Peptid 1990 von Sudoh und Mitarbeitern aus dem Gehirn von Schweinen isoliert. Es besitzt vasodilatierende Eigenschaften wie ANP und BNP, verfügt hingegen nur über eine gering ausgeprägte natriuretische Wirkung ^{37}. Die höchste CNP- Expression wurde in Endothelzellen nachgewiesen. In der Zirkulation lassen sich sowohl unter physiologischen Zuständen wie auch bei der Herzinsuffizienz nur geringe Konzentrationen nachweisen. Deshalb wird CNP im Gefäßsystem mit einer autokrinen und parakrinen Wirkweise

in Verbindung gebracht ^{9}. Interaktionspartner sind dabei CNP- bildende Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen. Eine Induktion von CNP durch TGF- β zeigt eine Wachstumshemmung des sezernierten CNP auf die Gefäßmuskelzellen ^{38}. CNP wird eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung der Atherosklerose zugeschrieben ^{39}.

Neben vaskulären sind auch kardiale Wirkungen des CNP bekannt. Auf Cardiomyocyten zeigt es negativ inotrope und proapoptotische Effekte ^{13,40}. Im ZNS, aus dem CNP ursprünglich isoliert wurde, wird CNP mit neuronalen Regulationsvorgängen in Verbindung gebracht ^{9}. Als Rezeptor des CNP konnte der NPR- B identifiziert werden, der für CNP eine wesentlich höhere Spezifität als für ANP und BNP aufweist ^{41}.

1.2.5 Dendroaspis natriuretisches Peptid (DNP)

DNP wurde 1992 aus dem Gift der grünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) isoliert. Das biologisch aktive Peptid besteht aus 38 Aminosäuren und besitzt mit 15 Aminosäuren einen längeren C- Terminus als ANP, BNP oder CNP ^{42,6}. Die Infusion von DNP zeigte bei der experimentellen Herzinsuffizienz von Hunden vasodilatatorische, diuretische und natriuretische Effekte mit konzentrationsabhängigen hämodynamischen Veränderungen ^{43}. Es konnten agonistische Wirkungen des DNP an den NPR und eine Aktivierung des cGMP- Signalweges demonstriert werden. Ob DNP nur Agonist des NPR- A oder auch von anderen Rezeptoren ist, konnte durch die bisherigen Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden ^{42}.

DNP wurde in Plasmaproben und atrialen Cardiomyocyten von Patienten mit CHI immunologisch nachgewiesen ^{44}. Ein DNP- kodierendes Gen konnte bisher im humanen Genom nicht isoliert werden, sodass die Existenz eines vierten natriuretischen Peptids beim Menschen nicht gesichert ist.

1.2.6 Inaktivierung der natriuretischen Peptide

Für die Inaktivierung der natriuretischen Peptide sind der natriuretische Peptidrezeptor C (NPR- C) und die enzymatische Degradierung bekannt ^{45,46,47}. Als Hauptabbauenzym der natriuretischen Peptide wurde die neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) identifiziert ^{47}.

Unter physiologischen Bedingungen überwiegt die Inaktivierung durch den NPR- C. Der rezeptorassoziierte Abbau erfolgt als Recycling des Rezeptors und intrazelluläre lysosomale Degradierung des natriuretischen Peptids ^{48,9}. Bei erhöhten Konzentrationen der natriuretischen Peptide, wie sie bei der CHI auftreten, nimmt die Bedeutung des enzymatischen Abbaus zu ^{46}.

Dies kann auf eine verminderte NPR- C- Expression zurückgeführt werden, die für die Entwicklung der kardialen Hypertrophie beim aortocavalen Shuntmodell beschrieben ist ^{49}. *In vitro* Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte zeigten eine ANP-, BNP- und CNP- abhängige, cGMP- vermittelte Herabregulation des NPR- C ^{50}. Außerdem führen die erhöhten Plasmakonzentrationen der natriuretischen Peptide zu einer Abnahme freier NPR- C- Bindungsstellen mit konsekutiver Zunahme der enzymatischen Spaltung ^{46}.

Die enzymatische Spaltung erfolgt bei allen natriuretischen Peptiden unter Aufbruch der Ringstruktur. ANP und BNP werden unterschiedlich stark von NEP degradiert, wobei BNP eine größere Resistenz gegenüber dem Abbau durch NEP aufweist ^{51}. Die längere carboxyterminale Aminosäurekette wird als hierfür ursächlich angesehen. Diese Annahme wird durch die Resistenz von DNP unterstützt, das eine längere C- terminale Kette als BNP aufweist ^{42}.

1.2.7 Rezeptoren der natriuretischen Peptide

1.2.7.1 Rezeptorsubtypen

Bisher sind vier verschiedene Rezeptoren der natriuretischen Peptide bekannt, die als natriuretischer Peptidrezeptor A (NPR- A), natriuretischer Peptidrezeptor B (NPR- B), natriuretischer Peptidrezeptor C (NPR- C) und natriuretischer Peptidrezeptor D (NPR- D) bezeichnet werden. Der NPR- A und der NPR- B bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Rezeptoranteil. Der intrazelluläre Abschnitt weist eine kinaseähnliche Domäne und eine Domäne mit Guanylatcyclase- Aktivität auf. NPR- C und NPR- D weisen nur einen kurzen intrazellulären Anteil auf, der weder eine kinaseähnliche Domäne noch eine Guanylatcyclase- Aktivität besitzt ^{52,9}.

Die einzelnen Rezeptoren unterscheiden sich außer in ihrer Morphologie auch hinsichtlich der Ligandenaffinität, Regulation und Gewebeverteilung. ANP und BNP binden an den NPR- A, wobei die Rezeptoraffinität für ANP und die resultierende Guanylatcyclase- Aktivität größer sind ^{41}. Renale ANP- Wirkungen werden ausschließlich über diesen Rezeptor vermittelt ^{53}. Der NPR- B besitzt die größte Affinität für CNP und soll nur eine geringe Aktivität nach ANP- und BNP- Bindung aufweisen ^{41}. BNP hat für NPR- A und NPR- B eine vergleichbare Rezeptoraffinität ^{9}.

Durch den NPR- C, der auch als Clearancerezeptor bezeichnet wird und die größte Population der myokardialen NPR darstellt, können alle bekannten natriuretischen Peptide gebunden werden ^{49}. Es besteht jedoch eine abnehmende Affinität von ANP über CNP zu BNP ^{9}. Neben der

Clearancefunktion vermittelt der NPR- C unterschiedliche biologische Wirkungen. Untersuchungen deuten auf eine Hemmung der Adenylatcyclase- Aktivität und wachstumsregulierende Eigenschaften hin ^{54}. **Abbildung 2** illustriert den Aufbau der natriuretischen Peptidrezeptoren und die im folgenden Abschnitt erläuterte Signaltransduktion.

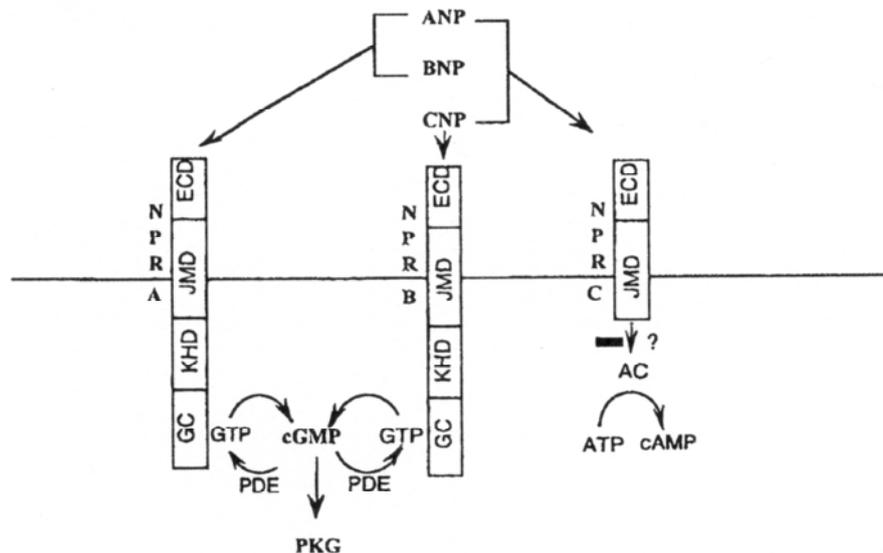


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der natriuretischen Peptidrezeptoren und der Signaltransduktion, aus ^{9}. ECD = extrazelluläre Domäne, JMD = Transmembrandomäne, KHD = Kinase-homologe Domäne, GC = Guanylatcyclase- Aktivität, AC = Adenylatcyclase- Aktivität, PDE = Phosphodiesterase

1.2.7.2 Signaltransduktion

1.2.7.2.1 NPR- A und NPR- B

Die Ligandenbindung an den NPR- A und NPR- B führt zur Aktivierung der zyttoplasmatischen Guanylatcyclase- Aktivität des Rezeptors. Voraussetzung für eine Agonistenbindung ist die vorherige Dimerbildung oder Oligomerisation des NPR- A oder NPR- B. Die Dimer- und Oligomerbildung unterschiedlicher NPR- Subtypen kann mit einer veränderten Rezeptoraffinität verbunden sein ^{55}.

Die Bindung von ANP an der extrazellulären Domäne des NPR- A hat eine Konformationsänderung der kinaseähnlichen Domäne zur Folge. Dies ermöglicht die Bindung von ATP an der kinaseähnlichen Domäne, wodurch die Guanylatcyclase- Aktivität zunimmt und die Bindungsaffinität von ANP an der extrazellulären Domäne vermindert wird ^{9}. Die Guanylatcyclase- Aktivität ermöglicht die Umwandlung von GTP in cGMP, dem second

messenger der natriuretischen Peptide. cGMP aktiviert die Proteinkinase G, eine Serin/Threonin- Kinase, von der bisher zwei Isoformen bekannt sind. Die zytoplasmatische Form konnte z. B. in Cardiomyocyten nachgewiesen werden. Eine membrangebundene Isoform wurde unter anderem in der Niere gefunden. Über die Funktion der Proteinkinase G gibt es bisher nur wenige Informationen. Sie wird mit der Regulation von Ionenkanälen und Phosphodiesterasen in Verbindung gebracht ^{56}.

1.2.7.2.2 NPR- C

Der aus 37 Aminosäuren bestehende zytoplasmatische Anteil des NPR- C kann mit G- Proteinen vom inhibitorischen Typ G_i interagieren. Verantwortlich hierfür ist ein 17 Aminosäuren langer Anteil aus dem mittleren Abschnitt, der von einem C- terminalen Aminosäurenmotiv reguliert wird. G- Protein- abhängig kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C und zur Hemmung der Adenylatcyclase ^{54,57}.

1.3 Neutrale Endopeptidase (NEP)

1.3.1 Einordnung, Struktur

Die neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11, Enkephalinase) gehört zur Gruppe M13 der Metalloendopeptidasen. Neben NEP werden zur Gruppe M13 das Kell- Antigen, PEX (phosphate- regulating gene with homologies to endopeptidases, on the X- chromosome), SEP (soluble secreted endopeptidase) und die beiden Endothelin- Conversionsenzyme ECE- 1 und ECE- 2 gezählt. Die SEP entspricht dem bei der Ratte isolierten Enzym NEP II ^{58,59,60}. Gemeinsame Charakteristika der genannten Enzyme sind die strukturelle Homologie zu Thermolysin, einem bakteriellen Enzym, sowie die hochkonservierte Konsensussequenz HEXXH zur Bindung des Cofaktors Zink ^{61}.

Biochemisch handelt es sich bei NEP um ein Glykoprotein vom Typ II mit einem Molekulargewicht der reifen, glykosilierten Form von 94 kD ^{62}. Es werden eine C- terminale extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne sowie eine kurze, zytoplasmatische N- terminale Domäne unterschieden. Der Transmembranabschnitt verankert die NEP in der Plasmamembran ^{63}. Das für die humane NEP kodierende Gen besteht aus über 80 Kilobasen

und besitzt 24 Exons ^{64}. Die Aminosäuresequenz der humanen NEP zeigt eine hohe Homologie mit der NEP anderer Spezies ^{65}.

1.3.2 NEP- Expression

Die NEP kann in vielen Geweben des Organismus nachgewiesen werden. Erstmals wurde die NEP aus der Bürstensaummembran proximaler Tubuli isoliert ^{66}. Unter der Bezeichnung CALLA bzw. CD 10 wurde die NEP als Oberflächenbestandteil von Prä- B- Zellen beschrieben. Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen wurde NEP in zum Teil zellpopulationsspezifischer Expressionsstärke nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Niere, Schilddrüse, Lunge, im Gastrointestinaltrakt und der Prostata nachgewiesen ^{67}. Die höchsten Konzentrationen von NEP findet man in den proximalen Tubuli der Niere. Außerdem kann eine hohe Expression in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Geringere Mengen lassen sich auf Cardiomyocyten und Endothelzellen arteriellen und venösen Ursprungs nachweisen ^{66,68}.

Durch alternatives Splicing können vier verschiedene Transkripte exprimiert werden und ermöglichen eine gewebs- und entwicklungspezifische Genexpression ^{69}. In der Niere lassen sich drei der vier bekannten Transkriptformen in den proximalen Tubulusepithelzellen nachweisen. Im ZNS kann eine zell- und regionenspezifische Expression einzelner Transkripte nachgewiesen werden, die in der Entwicklung des ZNS relevant sein können ^{68}. Eine Expressionsregulation auf Promoterebene kann unter anderem durch Methylierung erfolgen ^{70}. Genetische Polymorphismen der Promoterregion scheinen keinen Einfluss auf die Genexpression zu haben ^{71}.

1.3.3 Substrate der NEP

In Abhängigkeit von der Lokalisation und dem Vorkommen weiterer Enzyme werden viele verschiedene Substrate von der NEP metabolisiert. Für *in vitro* Versuche ist die Spaltung von Enkephalinen, AT I und AT II, Substanz P, Bradykinin, ANP und vielen anderen Peptiden beschrieben ^{66}. *In vivo* gelten Enkephaline, Amyloid- β , Substanz P, Bradykinin und ANP als wichtige Substrate. Aufgrund der Fähigkeit Enkephaline zu spalten, ist die Bezeichnung der Enkephalinase verbreitet. Die Spaltung der einzelnen Peptide erfolgt jeweils an der NH₂- Gruppe hydrophober Aminosäuren, wobei die maximale Substratgröße mit 3 kD angegeben wird. Damit können im Vergleich zum Angiotensin- Conversionsenzym (ACE) mit einer maximalen

Substratgröße von 1,2 kD größere Peptide metabolisiert werden ^{66}. Von essentieller Bedeutung für die katalytische Aktivität der NEP ist die Aminosäure Histidin in Position 583 und 587, deren Substitution zum Verlust von Zinkbindung und Enzymaktivität führt ^{61}.

Von wesentlicher Bedeutung in Bezug auf die chronische Herzinsuffizienz ist die Beteiligung der NEP am Metabolismus der natriuretischen Peptide, von Bradykinin, AT II und Endothelin 1. Dadurch ist die NEP einerseits am Metabolismus vasodilatierender, kardioprotektiver und antiproliferativer Substanzen beteiligt, andererseits von Bedeutung für vasokonstriktorisch und proliferativ wirkende Mediatoren ^{12}. Die natriuretischen Peptide sind in Abhängigkeit von der Länge ihrer C- terminalen Aminosäurenkette partiell resistent gegenüber dem Abbau durch NEP. Die Möglichkeit der enzymatischen Degradierung nimmt von CNP über ANP nach BNP ab ^{7}. Die initiale Spaltung erfolgt zwischen Cystein und Phenylalanin und führt zum Aufbruch der Ringstruktur ^{45}. DNP scheint kein Substrat der NEP zu sein ^{42}. Bradykinin wird im Myokard durch ACE und NEP inaktiviert, wobei der größte Anteil der interstitiellen Bradykinindegradierung auf die NEP zurückgeführt wird ^{72}. Die NEP ist am Endothelin 1- Abbau beteiligt ^{73}. AT II wird durch die NEP zu AT-(1-7) umgesetzt, das mit einer vasodilatierenden und antiproliferativen Wirkung assoziiert ist ^{66,74}.

1.3.4 Regulation der NEP

Ergebnisse von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen deuten darauf hin, dass Proteinkinase A und Proteinkinase C (PKC) von wesentlicher Bedeutung für die Regulation der NEP sind. Die Aktivierung der PKC führt zur verminderten NEP- Enzymaktivität und mRNA- Expression in Fibroblasten, Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten ^{75,76,77}. Humane Endothelzellen reagieren mit einer erhöhten NEP- Proteinexpression und NEP- Enzymaktivität bei Aktivierung des Proteinkinase A- oder PKC- Signalweges ^{78,79}. Humane glatte Gefäßmuskelzellen weisen eine Zunahme der NEP- mRNA- Konzentration nach Behandlung mit Dexamethason oder PKC- Aktivatoren auf ^{80}. Für Thrombin, einen endogenen PKC- Aktivator, sind sowohl eine Abnahme von NEP- Aktivität, mRNA- und Proteinexpression in Mesangiumzellen als auch eine Zunahme der NEP- Enzymaktivität in Endothelzellen beschrieben ^{81,78}.

Ein regulierender Einfluss auf die NEP- Expression wird neben den genannten intrazellulären Kaskaden dem cGMP- Signalweg zugeschrieben, dessen Aktivierung in glomerulären Mesangium- und Epithelzellen zur erhöhten NEP- Expression führt ^{75}. Hinsichtlich der NEP- Regulation kann jedoch eine Diskrepanz zwischen der Aktivierung von zytosolischer und membrangebundener Guanylatcyclase postuliert werden. Die Aktivierung der zytosolischen

Guanylatcyclase durch Stickstoffmonoxid hat *in vitro* keinen Einfluss auf die endotheliale NEP-Expression ^{75,79}.

Die kardiale Regulation der neutralen Endopeptidase ist bisher wenig erforscht. Die experimentelle Herzinsuffizienz wird bei der Ratte von einer erhöhten renalen NEP-Enzymaktivität und NEP-Expression begleitet ^{82}. Spontan hypertensive Hamster weisen ebenfalls eine erhöhte renale NEP-Enzymaktivität bei gleichzeitig verminderter kardialer NEP-Aktivität auf ^{83}. Für Patienten mit CHI unterschiedlicher Ätiologie ist eine Zunahme der myokardialen NEP-mRNA-Expression und Enzymaktivität beschrieben ^{84}. Eine neurohumorale Interaktion besteht zwischen der NEP und dem RAAS. Ein Anstieg der enzymatischen NEP-Aktivität im Narbenareal nach akutem Myokardinfarkt kann *in vivo* durch eine AT1-Rezeptorblockade unterdrückt werden ^{85}. Ratten mit einer genetisch determinierten hohen ACE-Aktivität weisen eine verminderte NEP-Aktivität auf ^{74}. Über den zugrundeliegenden Regelkreis liegen bisher keine Daten vor.

Die bisher bekannten Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sind zum Teil widersprüchlich, deuten jedoch auf eine zell- und gewebspezifische Regulation der NEP hin, die außerdem speziesspezifische Unterschiede aufweisen könnte.

1.4 Fragestellung

Die chronische Herzinsuffizienz (CHI) ist durch die Aktivierung verschiedener neurohumoraler Systeme gekennzeichnet. Trotz steigender Plasmakonzentrationen von ANP und BNP nimmt die Wirksamkeit des natriuretischen Peptidsystems im Verlauf der CHI ab ^{29,86}. Für verschiedene Modelle der experimentellen CHI ist eine zunehmende renale Expression und Aktivität der NEP, dem Hauptabbauenzym der natriuretischen Peptide, bekannt ^{82}. Die NEP wird auch im Myokard exprimiert und kann von Bedeutung für die Regulation der parakrinen Wirkung von kardial synthetisiertem ANP und BNP sein, die mit einer Hemmung des pathologischen kardialen Remodelings assoziiert sind ^{21,66,22}. Bisher ist nicht bekannt, ob bei der experimentellen CHI eine Regulation der kardialen NEP erfolgt. Mit der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kommt es bei der experimentellen Herzinsuffizienz zur Regulation der kardialen NEP?
2. Kann eine veränderte Expression oder Enzymaktivität den Wirkverlust der natriuretischen Peptide bei der CHI erklären?
3. Bestehen Unterschiede zwischen Proteinexpression und Enzymaktivität der kardialen NEP?
4. Differiert die NEP- Regulation in den einzelnen Herzkammern oder zwischen den untersuchten Modellen der experimentellen CHI?
5. Kann anhand der eigenen Ergebnisse unter Berücksichtigung publizierter Daten auf einen bestimmten Regulationsmechanismus geschlossen werden?