

2. Methoden

2.1 Modelle der experimentellen Herzinsuffizienz

Für alle durchgeführten Versuche wurden Wistar- Ratten verwendet. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden jeweils dem gleichen Operationsprocedere unterzogen ohne Shunt, Infarkt oder Gefäßverengung (Banding) zu induzieren. Alle Tiere wurden 30 Tage nach der Operation nach Einleitung einer Anästhesie und hämodynamischer Evaluation getötet. Organe und Blut wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die weitere Aufbewahrung bis zur Durchführung der molekularbiologischen und biochemischen Experimente erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.1 Das Infarktmodell

Das Infarktmodell ist das am häufigsten genutzte Modell zur Untersuchung der experimentellen Herzinsuffizienz ^{87}. Der Eingriff wurde in einer Narkose mit Chloralhydrat durchgeführt. Nach medianer Thorakotomie und Präparation des Herzens wurde im Bereich nach der Aufzweigung des Stammes der Arteria coronaria sinistra eine Ligatur mit Ethibond Excel 7-0- Nahtmaterial (Ethicon Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) angelegt, wodurch der Ramus interventricularis anterior verschlossen wurde ^{88}. Der resultierende Myokardinfarkt entwickelte sich im Bereich der Vorderwand und betraf den linken Ventrikel. Eine erfolgreiche Ligatur stellte sich intraoperativ mit einer Abblassung des betroffenen Myokardareales dar. Die Entwicklung der CHI ist auf den Verlust von kontraktilem Gewebe zurückzuführen. Die Infarktnarbe wurde bei der Organentnahme 30 Tage nach dem Eingriff makroskopisch entfernt und getrennt aufbewahrt. Tiere der Kontrollgruppe wurden der gleichen Operation ohne Gefäßligatur unterzogen.

2.1.2 Das thorakale Aortic- banding Modell

Das Bandingmodell diente der Untersuchung der CHI, die durch eine chronische Druckbelastung des linken Ventrikels bedingt ist. Aufgrund eines verringerten Gefäßdurchmessers der Aorta im Bereich von Aorta ascendens und Aortenbogen kommt es zum Anstieg der Nachlast des linken Ventrikels. Eine konstante Gefäßverengung wurde durch die Verwendung eines Tantalum- Clips mit einem Innendurchmesser von 0,51 mm gewährleistet. Der Clip wurde in einer Operation

unter Narkose mit Chloralhydrat angelegt. Die erhöhte Nachlast des linken Ventrikels führte innerhalb des Versuchszeitraums von 30 Tagen zur Entwicklung einer stark ausgeprägten konzentrischen Hypertrophie. In der Kontrollgruppe wurde der gleiche Eingriff ohne Platzierung des Clips durchgeführt ^{89}.

2.1.3 Das Shunt- Modell

Zur Induktion eines aortocavalen Shunts wurde das Protokoll von Garcia und Diebold in abgewandelter Form angewendet ^{90}. In **Abbildung 3** ist die Anlage des aortocavalen Shunts grafisch dargestellt. Durch die Anlage eines infrarenalen Shunts zwischen Aorta abdominalis und Vena cava inferior wurde eine chronische Volumenbelastung des Herzens erzeugt. Die Operation erfolgte in einer Narkose mit Isofluran.

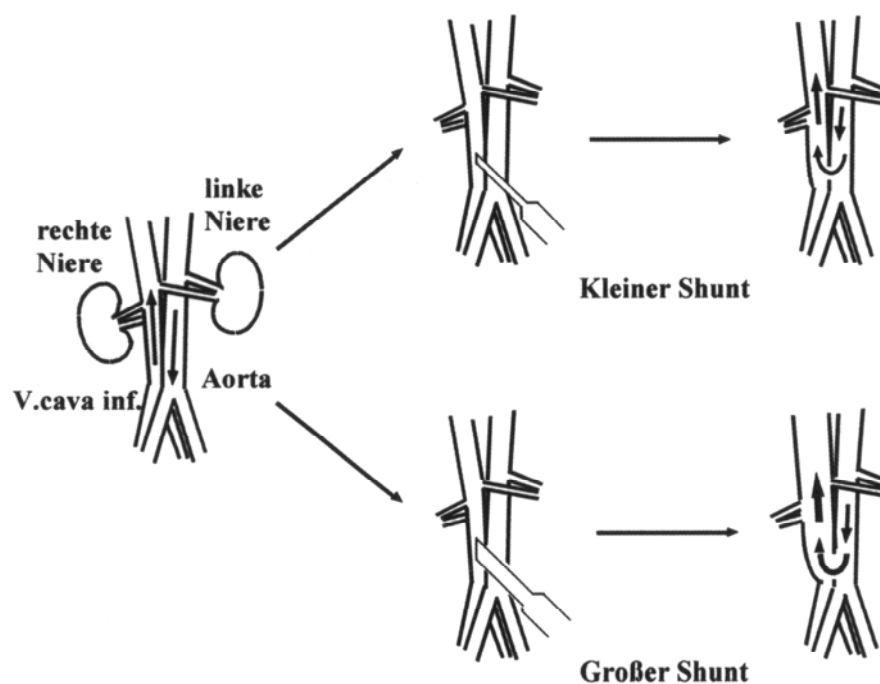


Abbildung 3: Anlage eines aortocavalen Shunts zur Erzeugung einer experimentellen Herzinsuffizienz.

Nach einer medianen Laparotomie wurde der Blutfluss in den betreffenden Gefäßabschnitten für die Dauer der Shuntanlage mit Bulldog- Klemmen und unter manueller Kompression unterbunden. Die Aorta abdominalis wurde distal des Abgangs der Nierenarterien mit einer Einmalkanüle (Braun Melsungen, Deutschland) punktiert. Der Shunt wurde durch das Verschieben der Kanüle bis zum benachbarten Abschnitt der Vena cava inferior erzeugt. Die

Punktionskanüle wurde umgehend wieder entfernt und die Einstichstelle der Aorta abschließend mit Cyanoacrylat- Gewebeklebstoff (Instant Crazy Glue, Borden Company, Willowdale, Ontario, Kanada) verschlossen. Kurze Zeit später wurde der Blutfluss freigegeben.

Zur Variation des Shuntvolumens und konsekutiv der Volumenbelastung des Herzens konnte die Shuntgröße verändert werden. Hierbei kamen Kanülen unterschiedlicher Durchmesser zum Einsatz. So wurden bei Tieren der Gruppe kleiner Shunt Kanülen mit einem Durchmesser von 1,2 mm verwendet. In der Gruppe großer Shunt betrug der Kanüldurchmesser 1,8 mm. Tiere der Kontrollgruppe wurden dem gleichen Eingriff mit Ausnahme der Gefäßpunktion unterzogen.

2.1.4 Hämodynamische Charakterisierung der Herzinsuffizienzmodelle

Die hämodynamische Evaluation der Versuchstiere erfolgte 30 Tage nach der modellspezifischen Operation in Narkose mit Isofluran. Die Druckmessung im venösen Gefäßteil erfolgte in der Vena cava superior nach Punktion der rechten Vena jugularis interna. Arterielle und linksventrikuläre Blutdruckwerte sowie der Quotient dp/dt des linken Ventrikels wurden nach Punktion der rechten Arteria carotidea gemessen. Zur Druckquantifizierung kamen ein Statham P23XL Pressure Transducer (Spectramed, Oxnard, USA) und ein Verstärker Gould AMP 4600 (Spectramed) zum Einsatz. Die Druckkurven wurden unter paralleler EKG-Registrierung aufgezeichnet und im Anschluss ausgewertet. Die **Abbildungen 4 und 5** zeigen beispielhaft eine Druckkurve aus Aorta und linkem Ventrikel sowie ein typisches EKG eines Tieres der Infarktgruppe.

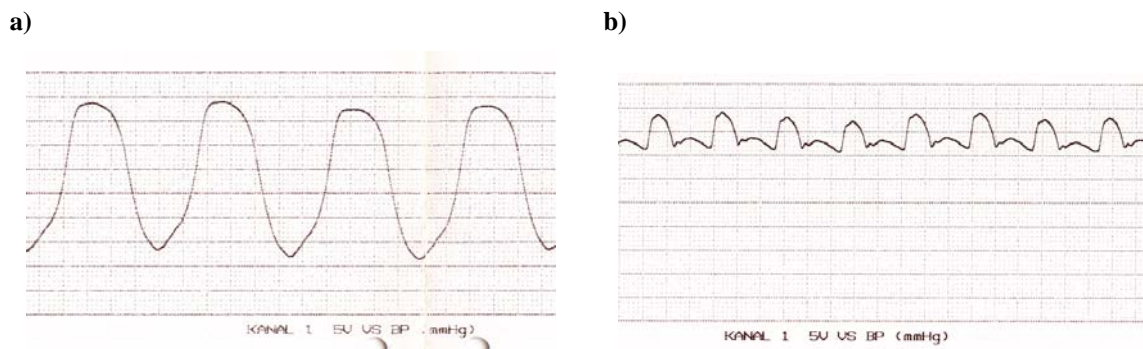


Abbildung 4: Dargestellt sind a) die Druckkurve des linken Ventrikels und b) die Aortendruckkurve, wie sie zur Druckquantifizierung verwendet wurden.

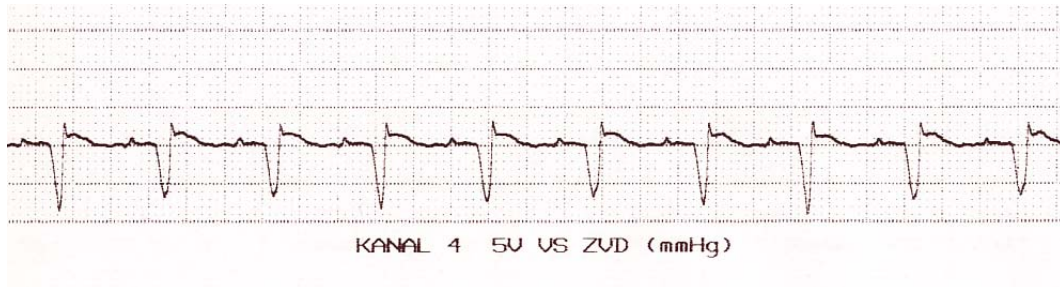


Abbildung 5: EKG eines Tieres der Infarktgruppe mit charakteristischen Q- Zacken als Hinweis auf einen abgelaufenen Myokardinfarkt.

2.2 Probenaufarbeitung

2.2.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte nach einem von Knecht und Mitarbeitern beschriebenen Protokoll ^{82}. Für die Untersuchung der kardialen neutralen Endopeptidase wurden von jedem Versuchstier des Shuntversuchs 100 mg Myokardgewebe pro Herzkammer verwendet. Aufgrund der hohen Proteinextraktion im Shuntversuch wurden von Versuchstieren des Infarkt- und Bandingversuchs jeweils 50 mg Herzmuskelgewebe entnommen. Die Abtrennung der entsprechenden Gewebemengen erfolgte auf Trockeneis.

Die abgewogenen Gewebemengen wurden in 1000 µl Puffer mit einem Xenox[®]-Homogenisierer (Xenox, Wecker, Deutschland) mechanisch aufgeschlossen. Der verwendete Puffer enthielt 20 mM TRIS (Roth, Karlsruhe), 2 mM MgCl₂ (Sigma- Aldrich, Schnellendorf), 0,25 M Saccharose (Sigma- Aldrich) und 1mM PMSF (Roth, Karlsruhe).

Weil es sich bei der NEP um ein membranständiges Enzym handelt, wurde aus den Homogenatproben die Membranfraktion isoliert. Unter Anwendung des Prinzips unterschiedlicher Sedimentationskoeffizienten der einzelnen Zellfraktionen wurden jeweils drei Zentrifugationsschritte mit einer Beckman[®] Optima TL Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Ziel des ersten Zentrifugationsschrittes mit 1000g für zehn Minuten war die Entfernung von Gewebsdebris. In zwei weiteren Schritten mit 1000 g für zehn Minuten gefolgt von 100.000g für 60 Minuten wurden Zytosol- und Membranfraktion separiert. Die Zentrifugation wurde bei 4 °C durchgeführt. Das Sediment der dritten Zentrifugation, das die Membranfraktion enthielt, wurde nach Dekantieren des Überstandes in 50 µl eines zweiten Puffers gelöst. Dieser enthielt 50 mM TRIS, 2 mM MgCl₂, 80 mM NaCl (Roth, Karlsruhe), 1%

Triton X₁₀₀ (Sigma- Aldrich) und 1 mM PMSF. Nach dem Resuspendieren des Sediments wurden die Proben aliquotiert und bei –80 °C aufbewahrt.

2.2.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration der einzelnen Gewebeprobe erfolgte nach dem von Bradford beschriebenen fotometrischen Verfahren ^{91}. Dieses wurde entsprechend den Herstellerangaben des Bradford Assay Kit (BioRad, München) modifiziert. Zur Erstellung der Standardkurve wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die fotometrische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm auf einem Tecan[®]- Polarion- Fotometer (Tecan- Deutschland, Crailsheim) durchgeführt. Der Einfluss des Lösungsmittels der Proben wurde durch die Messung ihrer optischen Dichte und Abzug bei jeder Probenmessung berücksichtigt.

2.3 Proteinexpressionsanalyse

Mit der Proteinexpressionsanalyse wurde die in einer Probe enthaltene Proteinmenge der NEP quantifiziert. Dazu wurden sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE), Western Blot, Detektion mittels Chemilumineszenz und eine Bandendichtemessung durchgeführt.

2.3.1 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

Zur Auftrennung des vorhandenen Proteingemisches der homogenisierten Gewebeproben wurde eine SDS- PAGE in einem 1 mm dicken Gel entsprechend einem Protokoll von Knecht et al. durchgeführt ^{82}. Das verwendete Gel wurde jeweils am Tag des Versuchs hergestellt und setzte sich aus einem Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel zusammen. Das Sammelgel enthielt einen Puffer (0,25 M TRIS, 0,5 M Glycin, pH 6,8), aqua dest., 5% Acrylamid, 0,2% Ammoniumperoxodisulfat (APS, Merck, Mannheim) und 0,1% Temed (Sigma- Aldrich). Das Trenngel unterschied sich hiervon hinsichtlich des Puffers (0,75 M TRIS, 1,5 M Glycin, 0,2% SDS, pH 8,8) und der Acrylamidkonzentration (7%).

Von jeder Probe wurden 10 µg Protein aufgetragen. Zu jedem Probenvolumen wurden das doppelte Volumen Ladepuffer (0,625 M TRIS- HCl pH 6,8, Glycerol, 1% Bromphenolblau, 5% 2- Mercaptoethanol, 2% SDS, aqua dest.) sowie aqua dest. zum Vermeiden unterschiedlicher

slot- Volumina hinzugefügt. Der Ladepuffer und eine fünfminütige Erhitzung der Proben im Wasserbad bei 90 °C garantierten eine ausreichende Denaturierung der Proteinproben.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde eine Apparatur der Firma Roth (Roth, Karlsruhe) verwendet. Eine schematische Darstellung der PAGE- Apparatur findet sich in **Abbildung 6**. In die Elektrophoresekammer wurden 800 ml Elektrophoresepuffer eingefüllt (5fach konzentriert: 0,1 M TRIS, 1,25 M Glycin, 0,1% SDS, 900 ml aqua dest.). Während der Durchführung wurde die Elektrophoresekammer durch eine Eisumschichtung gekühlt, um eine Erhitzung des wärmeempfindlichen Polyacrylamidgels zu vermeiden.

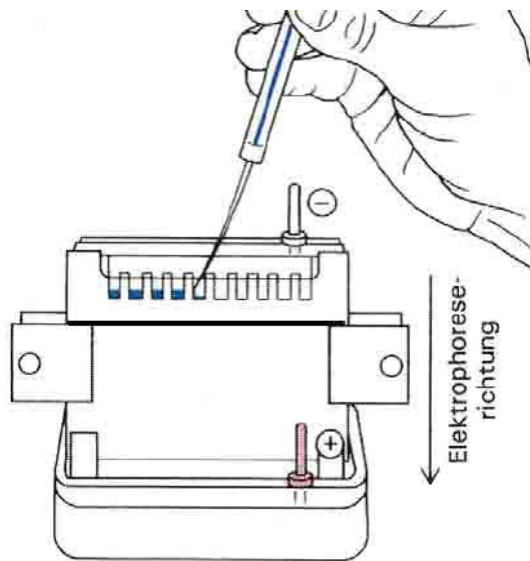


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer PAGE- Apparatur.

Die angelegte Spannung betrug während des Laufs im Sammelgel 80 V und wurde nach Eintreten der Proben in das Trenngel auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Laufmittelfront das Ende des Trenngels erreicht hatte.

2.3.2 Western Blot

Im Anschluss an die SDS- PAGE erfolgte mit Hilfe der semidry- Blot- Technik der Transfer der elektrophoretisch nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine PVDF[®]- Membran (Amersham Lifescience, Little Chalfont, England). In den durchgeführten Versuchen wurde eine Stromstärke von 120 mA für eine Blotdauer von 30 Minuten gewählt. **Abbildung 7** gibt einen Überblick über den Aufbau der verwendeten Blotkammer. Zum Einsatz kam eine Elektroblotkammer der Firma Roth (Karlsruhe).

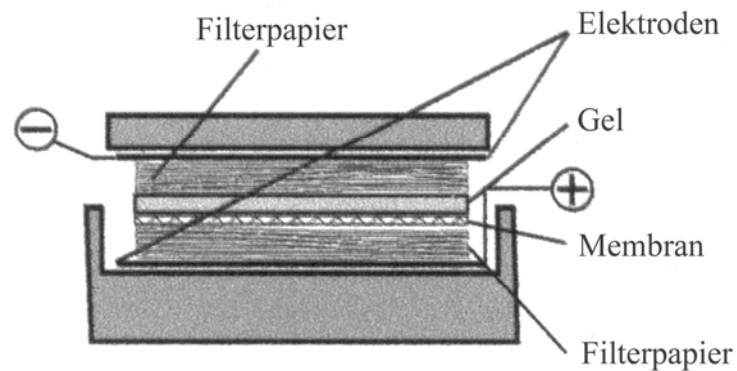


Abbildung 7: Aufbau einer semidry- Blotkammer zur Durchführung eines Western Blot.

Die elektrische Leitfähigkeit des verwendeten Filterpapiers wurde durch die Vorbehandlung mit einem Transferpuffer erreicht. Der Transferpuffer setzte sich aus 500 ml einer Lösung zusammen, die 0,1 M TRIS, 0,08 M Glycin und 0,37 g SDS enthielt. Nach Adjustierung auf pH 8,3 wurden 300 ml aqua dest. und 200 ml Methanol hinzugefügt.

Bei der verwendeten PVDF[®]- Membran (Amersham Lifescience) handelt es sich um eine Kunststoffmembran, die für die Untersuchung von Proteinen optimiert wurde. Sie zeichnet sich durch eine hohe Robustheit und eine hohe Proteinbindungskapazität aus. Vor der Verwendung wurde die Membran für eine Minute in Methanol und anschließend für 15 Minuten im Transferpuffer äquilibriert.

Nach Beendigung des Western Blot wurde die Membran für 15 Minuten in einem PBS- T- Puffer gewaschen, der 80 mM Na₂HPO₄ anhydros , 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl (jeweils Roth, Karlsruhe) und 1% Tween 20 (Sigma- Aldrich) enthielt. Mit diesem Schritt wurden Rückstände des Transferpuffers entfernt.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Proteinübertrags auf die Membran wurde das Trenngel nach Ende des Western Blot mit Coomassie Brilliantblau- Lösung (Sigma- Aldrich) gefärbt.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft ein gefärbtes Gel nach der Durchführung des Western Blot. Eine geringe Farbintensität spricht für einen geringen Proteingehalt und guten Transfer auf die Membran.

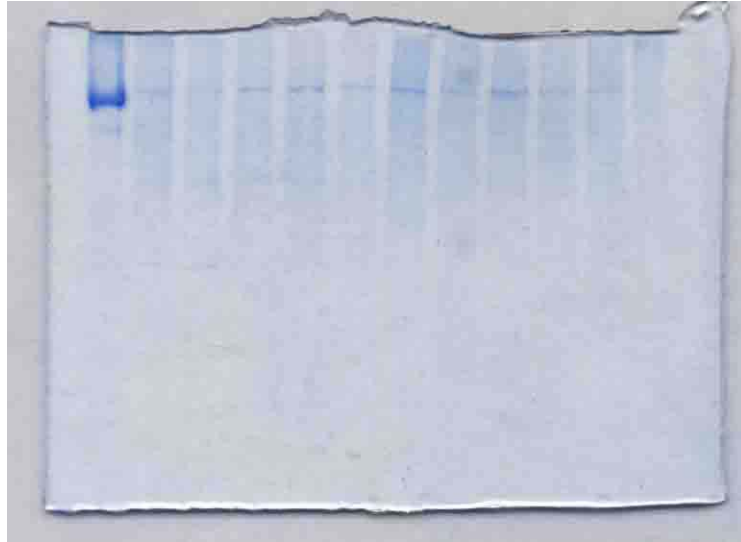


Abbildung 8: Gelfärbung mit Coomassie Brilliantblau- Lösung nach der Durchführung eines Western Blot

2.3.3 Detektion der Proteinbanden

Der Nachweis der NEP erfolgte durch ein Detektionsverfahren auf der PVDF[®]- Membran entsprechend einem Protokoll von Knecht et al. zum Nachweis der renalen NEP, das eine Antikörperinkubation und anschließende Chemilumineszenzreaktion umfasste^{82}.

2.3.3.1 Antikörperinkubation

Zur Untersuchung der kardialen NEP- Proteinexpression wurde ein spezifischer Primärantikörper verwendet, der in einem zweiten Inkubationsschritt mit einem Sekundärantikörper markiert wurde. Zu Beginn und im Verlauf des Nachweisprotokolls wurden vakante Proteinbindungsstellen der PVDF[®]- Membran durch einen 5% Magermilchpulver enthaltenden PBS- T- Puffer abgesättigt.

Die Inkubation mit dem spezifischen, polyklonalen Primärantikörper der Subklasse IgG (CD10, goat polyclonal IgG, sc-15908, Santa Cruz Biotechnology, USA) wurde in 10 ml Puffer (PBS- T, 5% Magermilchpulver) für 60 Minuten durchgeführt. Das Antikörperaliquot enthielt Anti- CD 10- IgG in einer Konzentration von 0,2 µg/µl in einem PBS- Puffer. Es wurden jeweils 5 µl der Primärantikörperlösung entsprechend einer Konzentration im Inkubationspuffer von 0,1 µg/ml eingesetzt.

Nach drei Waschschritten in PBS- T wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 20 Minuten inkubiert. Dabei handelte es sich um einen polyklonalen anti- goat IgG, der mit dem

Enzym Meerrettich- Peroxidase konjugiert war (A5420, Sigma- Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Das Antikörperaliquot enthielt anti- goat- IgG in einer Konzentration von 5 µg/ml. Der Sekundärantikörper wurde in einem Verdünnungsverhältnis von 1: 2000 im Inkubationspuffer eingesetzt.

2.3.3.2 Detektion durch Chemilumineszenz

Die Detektionsreaktion basierte auf dem Prinzip der Chemilumineszenz. Nach Zugabe des Reaktionsreagenz (Roti[®]- Lumin, P078.1, Carl Roth GmbH Karlsruhe) zur Membran, wird das Substrat durch die Meerrettich- Peroxidase des gebundenen Sekundärantikörpers umgesetzt. Durch diese Reaktion kommt es zur Emission von Licht, das durch einen aufgelegten Film (Hybond- P, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited) detektiert wird. Die Bandenschwärzung auf dem Film entspricht dabei der aufgenommenen Lichtintensität und ist abhängig von der gebundenen Antikörpermenge. Das Prinzip der Chemilumineszenzreaktion ist in **Abbildung 9** dargestellt.

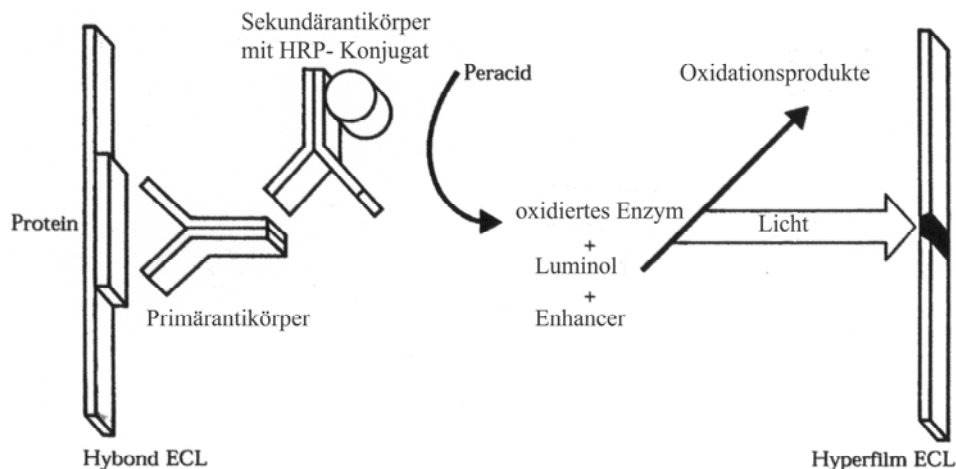


Abbildung 9: Ablauf der Chemilumineszenzreaktion unter Einsatz eines Peroxidasekonjugates.

HRP =

Meerrettich- Peroxidase

Abbildung 10 zeigt einen aus der Detektion als Ergebnis des Western Blot resultierenden Film mit der exemplarisch untergelegten Membran zur Zuordnung des Molekulargewichts. Die Detektionsbande der NEP liegt mit einem erwarteten Molekulargewicht von 94 kD im entsprechenden Bereich der Markerbanden. Die Filme mit den Proteinbanden wurden für die NEP- Proteinexpressionsanalyse verwendet.

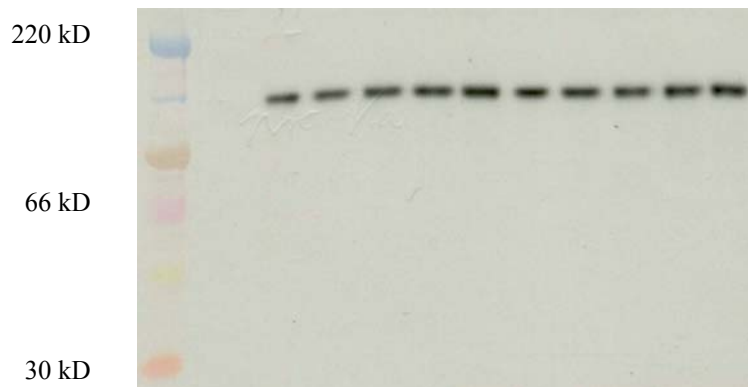


Abbildung 10: Rekonstruktion eines Detektionsergebnisses mit der zugehörigen Membran und dem darauf sichtbaren Molekulargewichtsmarker. Es wurden die den Farben entsprechenden Molekulargewichte ergänzt. Die Farbzunordnung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (Rainbow coloured protein molecular weight markers, Amersham Life Science, Braunschweig). kD = Kilodalton

2.3.4 Quantifizierung der Proteinbanden

Für die Quantifizierung der Banden auf dem entwickelten Film wurde das Auswertungsprogramm NIH Image verwendet. Dafür wurden die Filme gescannt und die resultierenden Dateien in NIH importiert. **Abbildung 11** zeigt einen zur Auswertung verwendeten Scan eines Films.

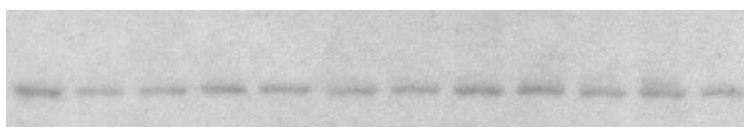


Abbildung 11: Zur Bandenquantifizierung verwendeter Scan eines entwickelten Films.

Das Programm vergibt 256 Graustufen im ganzzahligen Bereich von 1 bis 256. Im Programm besteht die Möglichkeit eine region of interest (ROI) festzulegen. Eine ROI wurde zum einen unmittelbar um die Bande gelegt, zum anderen um das weitere Umfeld der Bande. Das Vorgehen ist in **Abbildung 12** dargestellt.



Abbildung 12: Markierung der region of interest (ROI) von Bande und Umgebung zur Quantifizierung der Bandendichte.

Die ROI des Umfeldes diente der Quantifizierung des Grauwertes des Hintergrundes. Der Grauwert jeder ROI wurde jeweils als Modalwert durch das Programm bestimmt. Bei dem gemessenen Modalwert handelt es sich um den in der entsprechenden ROI am häufigsten auftretenden Grauwert. Der Messwert des Hintergrundes wurde vom zugehörigen Wert der Bande subtrahiert. Der erhaltene Zahlenwert wurde in Relation zu einem internen Standard gesetzt, der auf jedem Gel aufgetragen wurde. Aus den relativen Werten der einzelnen Proben wurden Mittelwert und Standardfehler der entsprechenden Versuchsgruppe berechnet. Die Bandenquantifizierung folgte damit einer für die renale NEP- Proteinexpression bereits etablierten Methode ^{82}.

2.4 Messung der Enzymaktivität

Die Messung der enzymatischen Aktivität der NEP wurde durchgeführt, um zusätzlich zur Bestimmung der Proteinmenge eine Aussage über den funktionellen Zustand des Enzyms treffen zu können. Es handelt sich um eine schnelle und spezifische Nachweismethode, die bereits geringe Enzymmengen nachweisen kann.

2.4.1 Enzymkinetik, Enzymaktivität

Die Enzymkinetik beschreibt Zusammenhänge der Reaktionsgeschwindigkeit von enzymkatalysierten Reaktionen. Die Enzymaktivität beschreibt die pro Zeiteinheit metabolisierte Stoffmenge und wird in „international unit“ (IU) angegeben, wobei 1 IU als 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ definiert ist. Messgröße ist somit die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion. Der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe soll eine Aussage über die vorhandene funktionelle Enzymmenge ermöglichen.

2.4.1.1 Michaelis- Menten- Kinetik, pH- Wert, Temperatur

Für das durchgeführte NEP- Aktivitätsassay wurde der Verlauf nach der Michaelis- Menten- Kinetik vorausgesetzt, die den Einfluss der Substratkonzentration auf Enzymreaktionen 1. Ordnung beschreibt. Die eingesetzte Menge des NEP- spezifischen Substrats N- Dansyl- D- Alanyl-glycyl- p- Nitrophenylalanyl-glycin (DAGNPG, N- Dansyl- D- Ala- Gly- p- Nitro- Phe- Gly, D2155, Sigma- Aldrich, Schnelldorf) von 50 μM übertraf den entsprechenden K_m - Wert der

NEP, sodass die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration war. Der pH- Wert und die Temperatur wurden in allen Versuchsansätzen bei 7,4 bzw. 37 °C konstant gehalten.

2.4.2 NEP- Enzymaktivitätsassay

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der NEP im Myokard wurde ein Aktivitätsassay angewendet, der von Florentin und Mitarbeitern 1983 beschrieben wurde ^{92}. Als Substrat diente ein synthetisch hergestelltes fluorogenes Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die spezifisch für das aktive Zentrum der NEP ist. Bei dem verwendeten Peptid handelte es sich um DAGNPG (N-Dansyl- D- Ala- Gly- p- Nitro- Phe- Gly, D2155, Sigma- Aldrich, Schnelldorf). Eine Spaltung des Peptids durch Aminopeptidasen und Dipeptidylpeptidasen wird durch die Dansyl- Gruppe sowie D- Alanin verhindert. Ein Abbau durch das Angiotensin- Conversionsenzym (ACE), eine Dipeptidylcarboxypeptidase, ist in begrenztem Ausmaß möglich ^{92}.

2.4.2.1 Das Prinzip der Fluoreszenz

Die angewendete Methode zur Quantifizierung der enzymatischen NEP- Aktivität basiert auf der von der Dansylgruppe des Substrats ausgehenden Fluoreszenz. Die Anregung des Moleküls mit Licht einer definierten Wellenlänge führt zur Aussendung von Licht. Im ungespaltenen Peptid werden die fluoreszierenden Eigenschaften der Dansylgruppe durch die enge räumliche Beziehung zur Phe(NO₂)- Gruppe unterdrückt. Dieser Effekt wird als Quenching bezeichnet. Durch Spaltung von DAGNPG in die beiden Produkte DAG und NPG kommt es zur Aufhebung des Quenching- Effekts und konsekutiv zur Zunahme der Fluoreszenz.

DAGNPG und DAG können mit Licht einer Wellenlänge λ von $\lambda_{\text{ex}} = 258 \text{ nm}$ oder $\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$ zur Fluoreszenz angeregt werden. Aufgrund einer besseren Sensitivität bei der Messung des Emissionsmaximums wurde der Assay mit einer $\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$ durchgeführt. Das Emissionsmaximum von DAGNPG und DAG befindet sich bei 562 nm. Die Fluoreszenz von DAG beträgt aufgrund des Quenching- Effekts das Fünffache der Fluoreszenz von DAGNPG. Die Stärke der Fluoreszenz korreliert bei den angegebenen Bedingungen mit der Enzymaktivität linear ^{92}.

2.4.2.2 Protokoll der Aktivitätsmessung

Zur Durchführung der Enzymaktivitätsmessung wurde ein Tecan- Polarion[®]- Fotometer (Tecan- Deutschland, Crailsheim) verwendet, das über eine geeignete Lichtquelle und zwei verschiedene Filter verfügte.

Die Hemmung der NEP erfolgte mit 1 μ M Thiorphan (DL- Thiorphan, (R-, S-)- 3- Mercapto-2- Benzylpropanoylglycin; Sigma- Aldrich, Schnelldorf), einem spezifischen und kompetitiven Inhibitor dieses Enzyms. Das Angiotensin- Conversionsenzym (ACE) wurde in einem separaten Ansatz mit 10 μ M Captopril (Sigma- Aldrich, Schnelldorf) gehemmt. Die kombinierte Hemmung setzte sich aus Zugabe beider Inhibitoren der genannten Konzentration zusammen.

Auf einer 96- well- Platte wurden von jeder Probe 60 μ g Protein pro Kavität aufgetragen und jeweils 50 μ l Puffer (50 mM TRIS- HCl, pH 7,4) hinzugefügt. Nach Applikation der Enzyminhibitoren wurden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar vor dem Start der Messung wurden 100 μ l einer DAGNPG- Lösung von 0,1 mM zu jeder Probe hinzugefügt. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte über 24 Stunden bei 37 °C. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz zum Zeitpunkt null und in folgenden 30- Minutenintervallen erfasst, sodass sich insgesamt 25 Messzeitpunkte ergaben. Es wurden von jeder Probe Gesamtaktivität, Aktivität bei Zugabe von Thiorphan, Aktivität bei Zugabe von Captopril und die Aktivität bei Zugabe beider Enzyminhibitoren gemessen.

2.4.3 Auswertung des Enzymaktivitätsassays

Die Auswertung des Enzymaktivitätsassays folgte einem Protokoll von Knecht et al. zur Bestimmung der Enzymaktivität aus dem maximalen Anstieg der Degradierungskurve ^{82}.

2.4.3.1 Bearbeitung der Rohdaten

Zur Auswertung der mit der Magellan[®]- Software des Tecan- Polarion[®]- Fotometers erfassten Rohdaten wurden diese in eine Datei von Microsoft Excel[®] exportiert. Die Rohdaten repräsentierten die gemessene Fluoreszenz. Die Fluoreszenz zum Zeitpunkt null (t_0) wurde gleich null gesetzt, um in allen vier verschiedenen Ansätzen einer Probe den gleichen Ausgangswert zu erreichen und somit die grafische Auswertung zu erleichtern. Es wurde zu jedem weiteren Messpunkt die Differenz mit dem Rohwert von t_0 gebildet ($y_x = t_x - t_0$). Die resultierenden Differenzen von t_0 bis t_{24} wurden in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen,

um den linearen Bereich der DAGNPG- Degradierung zu identifizieren. Dieser lag in der Zeit von 3,5 Stunden (t_7) bis 19 Stunden (t_{38}) nach Messungsbeginn. Die resultierenden Daten des Zeitraums t_7 bis t_{38} einer jeden Probe dienten der Erstellung einer Degradierungskurve.

2.4.3.2 Bestimmung des Anstiegs des Fluoreszenzverlaufs

Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde der Anstieg der Degradierungskurve von DAGNPG vom Zeitpunkt t_7 bis t_{38} bestimmt. Der Anstieg stellte hierbei die Änderung der Fluoreszenz zwischen den Intervallen dar. Zur Bestimmung des Anstiegs wurde eine lineare Ausgleichsgerade durch die einzelnen Grafen gelegt. Die Software berechnete die zugehörige Geradengleichung der Form $y = m \cdot x + n$, wobei m den Anstieg der Geraden ausdrückt.

Als Aktivität der NEP wurde die Differenz zwischen dem Anstieg m der Geradengleichung des Gesamtaktivitätsgrafens (GA) und des Thiorphangrafens (Thio) berechnet ($NEP = m_{GA} - m_{Thio}$). Aus den Aktivitätswerten der einzelnen Proben wurde ein Mittelwert gebildet, der zum Vergleich zwischen den Versuchsgruppen genutzt wurde. Die Aktivität für ACE und die Inhibitor Kombination wurde in analoger Weise bestimmt.

2.5 Quantifizierung der mRNA- Expression

Zur Bestimmung der mRNA- Konzentration wurde eine fluoreszenzbasierte real- time reverse Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion (real- time RT- PCR) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde unter Verwendung eines RNeasy midi- kit (Qiagen, Hilden) aus jeweils 122 – 154 mg Gewebe die mRNA isoliert. In den Proben enthaltene DNA wurde durch den Zusatz von DNase entfernt. Die isolierte mRNA wurde anschließend mit Hilfe einer reversen Transkriptase in die komplementäre DNA (cDNA) überführt. Die aus der vorhandenen NEP- mRNA resultierende cDNA konnte in der Polymerase- Kettenreaktion durch die Interaktion von Template, Sonde und Primer mit Hilfe von Fluoreszenz quantifiziert werden. Die Messung erfolgte mit einem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Perkin- Elmer, Boston, USA) unter Verwendung eines TaqMan- EZ RT- PCR Kit (Perkin- Elmer). Die Sequenz des verwendeten Primers für NEP lautete NEP forward: 5'-GGATCTTGTAAGCAGCCTCAGC-3' und NEP reverse: 5'-AGTTGGCACACCGTCTCCAG-3'. Durch die Bindung des Primers an die entsprechende Sequenz der cDNA, die auch als Template bezeichnet wird, wurde die Synthese durch das Enzym Polymerase ermöglicht.

Die entstehende Fluoreszenz ist auf den Einbau einer NEP- spezifischen Sonde (5'- Fam- TTCCGCAAGGCCCTTTACGGGA- Tamra- 3') in die Nukleinsäuresequenz und ihrer Hydrolyse durch die Polymerase zurückzuführen. Die Sonde enthält einen Quencher (TAMRA) und ein Fluorophor (FAM). Das von FAM ausgesandte Licht einer Wellenlänge λ von $\lambda = 518$ nm wird von TAMRA aufgenommen und Licht einer größeren λ emittiert. Beim Überschreiten eines definierten Schwellenwertes, dem cycle threshold (Ct), wurde die Fluoreszenz als Signal gewertet ^{93}.

Die Auswertung erfolgte nach der delta- delta- cycle threshold- Methode ($\Delta\Delta$ Ct). Hierbei wurde die Zeit bis zum Erreichen des cycle threshold gemessen. Ein großer Ct- Wert deutet auf eine geringe mRNA- Menge hin. Der Δ Ct- Wert ergibt sich als Differenz des Ct- Wertes von NEP und GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase). Dabei wurde von einer konstanten Expression der GAPDH in Kontroll- und Interventionsgruppe ausgegangen. Der $\Delta\Delta$ Ct- Wert gibt die Differenz zum Δ Ct- Mittelwert der Kontrollgruppe an. Die erhaltenen $\Delta\Delta$ Ct- Werte wurden jeweils als relativer Wert in Bezug auf die Kontrollgruppe ausgedrückt.

2.6 Infusion von ANP

Zur Untersuchung der NEP- Regulation bei chronisch erhöhten ANP- Plasmakonzentrationen wurde zehn Wistar- Ratten für 14 Tage nach einem Protokoll von Garcia und Mitarbeitern Ratten- ANP infundiert ^{94}. Zur Gewährleistung der chronischen Applikation wurden Alzet- Minipumpen Modell 2002 (Alzet, Cupertino, USA) verwendet, die den Tieren unter Narkose implantiert wurden. Die Infusion erfolgte über einen Polyethylenkatheter mit einem Durchmesser von 0,8 mm in die Vena jugularis sinistra. Die Infusionsrate der Pumpen betrug 0,48 μ l pro Stunde und entsprach einer ANP- Infusion von 100 ng pro Stunde bzw. 35 pmol pro Stunde. Auswirkungen auf den Blutdruck sind bei der gewählten Infusionsrate laut Protokoll nicht zu erwarten. Tiere der Kontrollgruppe erhielten 0,9% NaCl- Lösung als Vehikelinfusion. Die Untersuchung der kardialen NEP- Regulation erfolgte durch ein Enzymaktivitätsassay.

2.7 Messung der ANP- und cGMP- Plasmakonzentration

Die Blutproben zur ANP- und cGMP- Quantifizierung wurden am Tag der Organentnahme aus der Aorta in gekühlte Natrium- EDTA- Röhrchen entnommen. Das Plasma wurde durch eine

Zentrifugation mit 2000g bei 4 °C für 10 Minuten isoliert und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C aufbewahrt. ANP wurde nach einer von Gutkowska et al. beschriebenen reverse phase high performance liquid chromatography (RP– HPLC) in C18 Sep- Pak Säulen (Waters, Eschborn) aus den Plasmaproben extrahiert und in einem anschließenden Radioimmunassay quantifiziert ^{95}. Die Sep- Pak Säulen enthielten eine Lösung aus 0,2% Ammoniumacetat und Acetonitril. Nach dem Einfüllen der Plasmaproben wurden die Säulen mit Ammoniumacetat gewaschen, ANP mit Acetonitrilammoniumacetat aus der Säulenmatrix herausgelöst. Die Wiederfindungsrate für ANP betrug 80% und wurde bei der folgenden Quantifizierung berücksichtigt. Die cGMP- Isolierung erfolgte analog. Die Plasmakonzentration wurde mit einem von Willenbrock und Mitarbeitern beschriebenen Radioimmunassay gemessen ^{96}.

2.8 Statistische Auswertung der Messwerte

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte unter Verwendung der Statistikprogramme StatView[®] und Sigma Stat[®].

2.8.1 Ausreißeridentifizierung

Die Ergebnisse jedes Versuchs wurden vor der Durchführung einer Varianzanalyse auf Ausreißer untersucht. Dabei kam die Methode zur Ausreißeridentifizierung nach Tukey zur Anwendung. Zu jeder Versuchsgruppe wurden die Perzentilen obere Quartile Q_0 und untere Quartile Q_u bestimmt. Hieraus errechnete sich die FS- Spanne, die als Differenz $Q_0 - Q_u$ definiert ist. Werte, die nicht im Intervall $[Q_u - 1,5 FS, Q_0 + 1,5 FS]$ lagen, wurden als Ausreißer angesehen und bei der weiteren statistischen Analyse nicht berücksichtigt.

2.8.2 Varianzanalyse

Für die Varianzanalyse wurden der t- Test und die einfaktorische Varianzanalyse (One- Way- ANOVA) angewendet. Zur Auswertung des Shuntversuchs wurde nur ein ANOVA- Test aufgrund der Anzahl zu vergleichender Gruppen durchgeführt. Eine Signifikanz wurde in jedem Versuch bei Unterschreiten des p- bzw. t- Wertes von 0,05 angenommen.