

Aus der Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung von Expression und Regulation der kardialen neutralen
Endopeptidase an drei Modellen der experimentellen Herzinsuffizienz

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Albrecht

aus Magdeburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Willenbrock
2. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
3. Prof. Dr. med. E. Schwinger

Datum der Promotion: 23.04.2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Chronische Herzinsuffizienz	5
1.1.1	Begriffsbestimmung	5
1.1.2	Pathophysiologie	5
1.1.2.1	Frank- Starling- Mechanismus und Laplace'sches Gesetz	5
1.1.2.2	Neurohumorale Aktivierung	6
1.2	Das System der natriuretischen Peptide	7
1.2.1	Synthese und Sekretion der natriuretischen Peptide	8
1.2.2	Biologische Wirkungen von ANP und BNP	8
1.2.2.1	Renale Wirkungen	9
1.2.2.2	Kardiovaskuläre Wirkungen	9
1.2.2.3	Parakrine Wirkungen	10
1.2.2.4	Interaktion mit anderen neurohumoralen Systemen	10
1.2.3	Expression von ANP und BNP	11
1.2.3.1	ANP- Expression	11
1.2.3.2	BNP- Expression	11
1.2.3.3	ANP- und BNP- Expression bei der chronischen Herzinsuffizienz	12
1.2.4	C- Typ natriuretisches Peptid (CNP)	12
1.2.5	Dendroaspis natriuretisches Peptid (DNP)	13
1.2.6	Inaktivierung der natriuretischen Peptide	13
1.2.7	Rezeptoren der natriuretischen Peptide	14
1.2.7.1	Rezeptorsubtypen	14
1.2.7.2	Signaltransduktion	15
1.2.7.2.1	NPR- A und NPR- B	15
1.2.7.2.2	NPR- C	16
1.3	Neutrale Endopeptidase	16
1.3.1	Einordnung, Struktur	16
1.3.2	NEP- Expression	17
1.3.3	Substrate der NEP	17

1.3.4	Regulation der NEP	18
1.4	Fragestellung	20
2.	Methoden	21
<hr/>		
2.1	Modelle der experimentellen Herzinsuffizienz	21
2.1.1	Das Infarktmodell	21
2.1.2	Das thorakale Aortic- banding Modell	21
2.1.3	Das Shunt- Modell	22
2.1.4	Hämodynamische Charakterisierung der Herzinsuffizienzmodelle	23
2.2	Probenaufarbeitung	24
2.2.1	Proteinextraktion	24
2.2.2	Messung der Proteinkonzentration	25
2.3	Proteinexpressionsanalyse	25
2.3.1	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)	25
2.3.2	Western Blot	26
2.3.3	Detektion der Proteinbanden	28
2.3.3.1	Antikörperinkubation	28
2.3.3.2	Detektion durch Chemilumineszenz	29
2.3.4	Quantifizierung der Proteinbanden	30
2.4	Messung der Enzymaktivität	31
2.4.1	Enzymkinetik, Enzymaktivität	31
2.4.1.1	Michaelis- Menten- Kinetik, pH- Wert, Temperatur	31
2.4.2	NEP- Enzymaktivitätsassay	32
2.4.2.1	Das Prinzip der Fluoreszenz	32
2.4.2.2	Protokoll der Aktivitätsmessung	33
2.4.3	Auswertung des Enzymaktivitätsassays	33
2.4.3.1	Bearbeitung der Rohdaten	33
2.4.3.2	Bestimmung des Anstiegs des Fluoreszenzverlaufs	34
2.5	Quantifizierung der mRNA- Expression	34

2.6	Infusion von ANP	35
2.7	Messung der ANP- und cGMP- Plasmakonzentration	35
2.8	Statistische Auswertung der Messwerte	36
2.8.1	Ausreißeridentifizierung	36
2.8.2	Varianzanalyse	36
3.	Ergebnisse	37
<hr/>		
3.1	Einflüsse der Herzinsuffizienzmodelle auf Hämodynamik und kardiale Hypertrophie	37
3.1.1	Untersuchung des Infarktmodells	37
3.1.1.1	Hämodynamische Charakterisierung des Infarktmodells	37
3.1.1.2	Kardiale und pulmonale Auswirkungen des Infarkts	38
3.1.2	Untersuchung des Bandingmodells	38
3.1.2.1	Hämodynamische Charakterisierung des Bandingmodells	38
3.1.2.2	Kardiale und pulmonale Auswirkungen des thorakalen Aortenbandings	39
3.1.3	Untersuchung des Shuntmodells	40
3.1.3.1	Hämodynamische Charakterisierung des Shuntmodells	40
3.1.3.2	Kardiale und pulmonale Auswirkungen des aortocavalen Shunts	42
3.1.4	Zusammenfassung der Einflüsse der Herzinsuffizienzmodelle auf Hämodynamik und kardiale Hypertrophie	43
3.1.5	Aktivierung des natriuretischen Peptidsystems	45
3.2	Expression und Enzymaktivität der kardialen NEP	46
3.2.1	Ergebnisse des experimentellen Myokardinfarkts	46
3.2.1.1	Analyse der NEP- Proteinexpression	46
3.2.1.1.1	NEP- Proteinexpression im vitalen Myokardgewebe	46
3.2.1.1.2	NEP- Proteinexpression im Narbenareal	47
3.2.1.2	Analyse der Enzymaktivität	48
3.2.1.2.1	NEP- Enzymaktivität	48
3.2.1.2.2	ACE- Aktivität, kombinierte Enzymaktivität	49
3.2.1.2.3	Enzymaktivität in der Zytosolfraktion	49
3.2.1.3	Untersuchung der NEP- mRNA- Expression	50
3.2.2	Ergebnisse des aortalen Bandings	51

3.2.2.1	Analyse der NEP- Proteinexpression	51
3.2.2.2	Analyse der Enzymaktivität	52
3.2.3	Ergebnisse des aortocavalen Shunts	53
3.2.3.1	Analyse der NEP- Proteinexpression	53
3.2.3.2	Analyse der Enzymaktivität	54
3.2.3.2.1	NEP- Enzymaktivität	54
3.2.3.2.2	ACE- Aktivität, kombinierte Enzymaktivität	55
3.2.4	Einfluss der chronischen ANP- Infusion auf die kardiale NEP	56
3.2.4.1	NEP- Enzymaktivität	56
3.2.4.2	ACE- Aktivität, kombinierte Enzymaktivität	57
4.	Diskussion	58
4.1	Hämodynamische Charakterisierung der Modelle der CHI	59
4.2	Die kardiale NEP- Regulation in den untersuchten Modellen der CHI	60
4.2.1	Experimenteller Myokardinfarkt	60
4.2.1.1	NEP- Regulation im vitalen Myokardgewebe	60
4.2.1.2	NEP- Regulation in der Infarktnarbe	61
4.2.2	Aortales Banding	62
4.2.3	Aortocavaler Shunt	64
4.2.4	ANP- Infusionsversuch	65
4.2.5	Zusammenfassende Betrachtung der Versuchsergebnisse	65
4.3	Einfluss verschiedener Signalwege auf die NEP- Regulation	67
4.4	Zusammenfassung	68
	Referenzenliste	70
	Abbildungsverzeichnis	84
	Tabellenverzeichnis	86
	Abkürzungsverzeichnis	87
	Danksagung	88

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Aminosäurestruktur der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP. | 7 |
| 2 | Schematische Darstellung des Aufbaus der natriuretischen Peptidrezeptoren und der Signaltransduktion. | 15 |

Methoden

- | | | |
|----|--|----|
| 3 | Anlage eines aortocavalen Shunts zur Erzeugung einer experimentellen Herzinsuffizienz. | 22 |
| 4 | Dargestellt sind a) die Druckkurve des linken Ventrikels und b) die Aortendruckkurve, wie sie zur Druckquantifizierung verwendet wurden. | 23 |
| 5 | EKG eines Tieres der Infarktgruppe mit charakteristischen Q- Zacken als Hinweis auf einen abgelaufenen Myokardinfarkt. | 24 |
| 6 | Schematische Darstellung einer PAGE- Apparatur. | 26 |
| 7 | Aufbau einer semidry- Blotkammer zur Durchführung eines Western Blot. | 27 |
| 8 | Gelfärbung mit Coomassie Brilliantblau- Lösung nach der Durchführung eines Western Blot. | 28 |
| 9 | Ablauf der Chemilumineszenzreaktion unter Einsatz eines Peroxidasekonjugates. | 29 |
| 10 | Rekonstruktion eines Detektionsergebnisses mit der zugehörigen Membran und dem darauf sichtbaren Molekulargewichtsmarker. | 30 |
| 11 | Zur Bandenquantifizierung verwendeter Scan eines entwickelten Films. | 30 |
| 12 | Markierung der region of interest (ROI) von Bande und Umgebung zur Quantifizierung der Bandendichte. | 30 |

Ergebnisse

- | | | |
|----|--|----|
| 13 | Entwicklung des Gewichts der einzelnen Herzkammern im Bandingmodell. | 40 |
| 14 | Entwicklung von a) systolischem und b) diastolischem Blutdruck in Abhängigkeit von der Shuntgröße. | 41 |

15	Zentraler Venendruck des Shuntmodells nach 30 Tagen.	41
16	Entwicklung des Gewichts der einzelnen Herzkammern des Shuntmodells.	43
17	Relatives Herzgewicht der Tiere mit a) aortalem Banding, b) aortocavalem Shunt und c) Myokardinfarkt nach 30 Tagen.	43
18	Relatives Gewicht des linken Ventrikels der Tiere mit a) aortalem Banding, b) aortocavalem Shunt und c) Myokardinfarkt nach 30 Tagen.	44
19	dp/dt_{max} als Parameter der Kontraktilität in den drei untersuchten Modellen der Herzinsuffizienz.	44
20	Kardiale NEP- Proteinexpression 30 Tage nach Myokardinfarkt.	46
21	Detektionsergebnis eines Western Blot aus dem Infarktversuch.	47
22	Kardiale NEP- Proteinexpression im linken Ventrikel von Kontrolltieren, im vitalen Myokard von Tieren der Infarktgruppe und im Narbenareal des linken Ventrikels 30 Tage nach Myokardinfarkt.	47
23	Repräsentative Detektionsergebnisse von Proben von Kontrolltieren des Infarktversuchs, vitalem Myokard von Tieren der Infarktgruppe und des Narbenareals des linken Ventrikels 30 Tage nach Myokardinfarkt.	48
24	Kardiale NEP- Enzymaktivität 30 Tage nach Myokardinfarkt.	48
25	NEP- mRNA- Expression 30 Tage nach Myokardinfarkt.	50
26	Repräsentative Detektionsergebnisse von Proben des linken Ventrikels (links) und rechten Ventrikels (rechts) aus Kontroll- und Bandinggruppe 30 Tage nach aortalem Banding.	51
27	NEP- Proteinexpression 30 Tage nach aortalem Banding.	52
28	NEP- Enzymaktivität 30 Tage nach thorakalem Aortenbanding.	52
29	Kardiale NEP- Enzymaktivität von Tieren mit aortocavalem Shunt nach 30 Tagen.	54
30	NEP- Enzymaktivität nach 14 Tagen ANP- Infusion.	57

Tabellenverzeichnis

1	Herzfrequenz und arterieller Blutdruck 30 Tage nach Myokardinfarkt.	37
2	Zentraler Venendruck, LVEDP und dp/dt_{max} . 30 Tage nach Myokardinfarkt.	37
3	Körper-, Herz- und Lungengewicht 30 Tage nach Myokardinfarkt.	38
4	Herzfrequenz und arterieller Blutdruck 30 Tage nach thorakalem Aortenbanding.	39
5	Zentraler Venendruck, LVEDP und dp/dt_{max} . 30 Tage nach thorakalem Aortenbanding.	39
6	Körper-, Herz- und Lungengewicht 30 Tage nach thorakalem Aortenbanding.	39
7	LVEDP und dp/dt_{max} . 30 Tage nach Shuntanlage.	42
8	Körper-, Herz- und Lungengewicht 30 Tage nach Shuntanlage.	42
9	ANP- Plasmakonzentration 30 Tage nach Shuntanlage bzw. Myokardinfarkt.	45
10	ACE- und ACE- NEP- Enzymaktivität 30 Tage nach Myokardinfarkt.	49
11	ACE- und ACE- NEP- Enzymaktivität in der Zytosolfraktion von Myokardgewebe 30 Tage nach Myokardinfarkt.	50
12	ACE- und ACE- NEP- Enzymaktivität 30 Tage nach thorakalem Aortenbanding.	53
13	Kardiale NEP- Proteinexpression bei Tieren mit aortocavalem Shunt nach 30 Tagen.	53
14	ACE- Enzymaktivität bei Tieren mit aortocavalem Shunt nach 30 Tagen.	55
15	Enzymaktivität nach Inhibitor Kombination bei Tieren mit aortocavalem Shunt nach 30 Tagen.	56
16	ACE- und ACE- NEP- Enzymaktivität nach 14 Tagen ANP- Infusion.	57

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ACE	Angiotensin- Conversionsenzym
ADH	antidiuretisches Hormon
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AT1- R	Angiotensin II- Rezeptor 1
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	brain natriuretisches Peptid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHI	chronische Herzinsuffizienz
CNP	C- Typ natriuretisches Peptid
Ct	cycle threshold
DNP	Dendroaspis natriuretisches Peptid
ECE	Endothelin- Conversionsenzym
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
kD	Kilodalton
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAPK	mitogenassoziierte Proteinkinase
NEP	neutrale Endopeptidase
NO	Stickstoffmonoxid
NPR	natriuretischer Peptidrezeptor (A – D)
PKC	Proteinkinase C
RAAS	Renin- Angiotensin- Aldosteron- System
SEM	standard error of the mean

Danksagung

Zur Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift haben viele Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Willenbrock bzw. des Labors für experimentelle Herzinsuffizienz an der Franz- Volhard- Klinik Berlin- Buch beigetragen. Grundlegend war die Idee von Dr. Mathias Knecht zur Untersuchung der Regulation der NEP an drei Modellen der chronischen Herzinsuffizienz. Mit seiner Arbeit zur renalen NEP- Regulation gab er wesentliche Anregungen zur Methodik der vorliegenden Promotionsarbeit. Nach seinem Ausscheiden aus der Arbeitsgruppe war Dr. Ines Pagel eine wichtige Ansprechpartnerin, der ich an dieser Stelle besonders danken möchte. Nicht nur bei Auswertung der Versuchsergebnisse, sondern auch bei der Planung weiterer Versuche wie dem ANP- Infusionsversuch und der Erstellung der Promotionsschrift war sie von herausragender Bedeutung. Dr. Thomas Langenickel hat entscheidend zur mRNA- Quantifizierung beigetragen und somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis einer möglichen NEP- Regulation geleistet. Ohne die Mitarbeit der medizinisch- technischen Assistentinnen bei den Tieroperationen, hämodynamischen und molekularbiologischen Untersuchungen wären große und entscheidende Teile der vorliegenden Arbeit nicht durchführbar gewesen. Ihren Beitrag zur Arbeit möchte ich an dieser Stelle besonders hervorheben. Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Roland Willenbrock bin ich jedoch zu ganz besonderem Dank verpflichtet. Mit der Etablierung der untersuchten Herzinsuffizienzmodelle im Labor für experimentelle Herzinsuffizienz, der Organisation der notwendigen Infrastruktur zur Durchführung der Untersuchungen sowie der fachlichen Begleitung während der Erstellung der Promotionsarbeit hat er einen ganz besonders großen Anteil an der nun vorliegenden Arbeit. Insgesamt bedeutet die Promotion für mich somit nicht nur eine Erweiterung des geistigen Horizonts durch das Erlernen und Anwenden wissenschaftlichen Arbeitens, sondern auch die Erkenntnis, dass eine solche Arbeit nur als Teamleistung entstehen kann.

Erklärung

„Ich, Michael Albrecht, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Untersuchung von Expression und Regulation der kardialen neutralen Endopeptidase an drei Modellen der experimentellen Herzinsuffizienz‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Magdeburg, 26.06.2006

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.