

Einfluss von myokardialer Hypertrophie und neurohumoralen  
Faktoren auf das Kontraktionsverhalten isolierter ventrikulärer  
Herzmuskelzellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Korkusuz, Hüdayi  
aus Kirchen/Sieg

Gießen, 2006

Aus dem Physiologischen Institut  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Professor Dr. Dr. H. M. Piper

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachterin: Frau PD Dr. Michel-Behnke

Tag der Disputation: 02.10.2006

Meinen Eltern Osman und Zahide Korkusuz  
Meinen Brüdern Ali, Ufuk und Yücel Korkusuz

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Pathophysiologie der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Adrenerge Induktion einer Myokardzell-Hypertrophie</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Rolle von Angiotensin II und TGF-<math>\beta</math> bei der Myokardhypertrophie</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Aufgabenstellung</b>	<b>4</b>
<b>2. Material</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Medien</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Puffer</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Geräte und Laborbedarf</b>	<b>9</b>
2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur	9
2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion	9
2.4.3 Sonstige Geräte	10
2.4.4 Verbrauchsmaterialien	10
2.4.5 Software	10
<b>3. Methoden</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Präparation isolierter Herzmuskelzellen und deren Inkubation</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Messung von Myokardzell-Kontraktion im elektrischen Feld</b>	<b>12</b>
3.2.1 Probenvorbereitung	12
3.2.2 Elektrische Stimulation der Myokardzell-Kontraktion	13
3.2.3 Messung der Kontraktionsparameter	14
3.2.4 Messprotokoll	16
<b>3.3 Statistik</b>	<b>16</b>

---

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Akutwirkung von Phenylephrin auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmuskelzellen</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Einfluss chronischer Phenylephrin-Exposition auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen unter visköser Last</b>	<b>19</b>
4.2.1 Abhängigkeit von der Medienviskosität	20
4.2.2 Zellverkürzung unter lastfreien Bedingungen und unter Last	21
4.2.3 Zellverkürzungsgeschwindigkeit unter lastfreien Bedingungen und unter Last	22
4.2.4 Relaxationsgeschwindigkeit unter lastfreien Bedingungen und unter Last	23
<b>4.3 Einfluss der Hemmung der Proteinkinase C-Aktivierung mittels Bisindolylmaleinid auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin</b>	<b>24</b>
<b>4.4 Einfluss der Hemmung der PI3-Kinase mittels Wortmanin auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Einfluss der Hemmung der p42 MAP-Kinase mittels PD98059 auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin</b>	<b>28</b>
<b>4.6 Einfluss der externen Calcium-Konzentration auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzelle bei chronischer Exposition mit Phenylephrin</b>	<b>30</b>
<b>4.7 Einfluss chronischer Exposition von Phenylephrin auf die maximale beta-adrenerg induzierbare Konzentrationsfähigkeit der Herzmuskelzellen</b>	<b>31</b>
<b>4.8 Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen aus transgenen Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form der Akt-Kinase myokardial exprimieren</b>	<b>32</b>
4.8.1 Zellverkürzung der Herzmuskelzellen	33
4.8.2 Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen	34

---

<b>4.9</b>	<b>Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen aus spontanhypertensiven Ratten</b>	<b>35</b>
4.9.1	Zellverkürzung unter lastfreien und Lastbedingung	36
4.9.2	Relaxationsgeschwindigkeit	37
4.9.3	Kontraktionsgeschwindigkeit	38
<b>4.10</b>	<b>Charakterisierung des Kontraktionsverhaltens isolierter Herzmuskelzellen aus transgenen TGF-beta überexprimierenden Mäusen und ihren nicht transgenen Geschwistern</b>	<b>39</b>
4.10.1	Kontraktionsverhalten und Zelllänge	40
4.10.2	$\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit	42
4.10.3	Veränderung der $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit nach Behandlung mit Telmisartan, eines TGF- $\beta$ Antagonisten oder Metoprolol	43
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Relevanz des Modells im Hinblick auf die Fragestellung</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Kontraktile Dysfunktion nach alpha-adrenerger Hyperthrophiestimulation</b>	<b>45</b>
<b>5.3</b>	<b>Einfluss phänotypischer Veränderungen auf die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>Kontraktionsverhalten und <math>\beta</math>-adrenerge Ansprechbarkeit isolierter Herzmuskelzellen aus transgenen TGF-<math>\beta</math> überexprimierenden Mäusen und ihren nicht transgenen Geschwistern</b>	<b>48</b>
<b>5.5</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>52</b>

---

<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>59</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>60</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Pathophysiologie der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz**

Die myokardiale Hypertrophie wird hervorgerufen durch neurohumorale Faktoren, durch hämodynamische Belastung im Sinne einer chronischen Erhöhung der Druck-Volumen-Arbeit oder durch das Zusammenspiel beider Faktoren. Die Myokardhypertrophie ist ein primär kompensatorisches Dickenwachstum von Kardiomyozyten. Die Verdickung erfolgt durch Hypertrophie einzelner Kardiomyozyten und nicht durch Mitosen (Schwarzfeld & Jacobsons, 1981).

Nach Überschreiten des „kritischen Herzgewichtes“ (Linzbach, 1947) verliert die Hypertrophie ihren adaptiven Charakter, die Eigenversorgung des Herzens kann dann nicht mehr gewährleistet werden und es kommt zu einer strukturellen Schädigung. Die durch die Hypertrophie erzielte Verminderung der Wandspannung reicht nicht mehr aus und es kommt zu einer Dilatation der Herzkammern. Dies führt zu einer funktionellen Dekompensation, d.h. das Herz ist nicht mehr in der Lage, die peripheren Organe ausreichend mit Blut zu versorgen. Die Myokardhypertrophie gilt als Prädiktor für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz mit erhöhter Morbidität und Mortalität (Levy et al., 1990).

Die Herzhypertrophie geht häufig mit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, einer erhöhten Sympathikusaktivierung und einer verstärkten Expression von Wachstumsfaktoren einher. Dadurch verändert sich das neurohumorale Milieu, das wiederum Hypertrophievorgänge beeinflussen kann. Hierzu gehört die gesteigerte Proteinsynthese, die Vergrößerung des Myozytenquerschnitts und die veränderte Expression myokardialer Proteine.

### **1.2 Adrenerge Induktion einer Myokardzell-Hypertrophie**

Die erhöhte Sympathikusaktivierung führt zur Freisetzung von Katalcholaminen (Adrenalin und Noradrenalin) aus transmuralen Nervenendigungen, welche  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren stimulieren.

Anhand von Zellkulturmodellen isolierter Kardiomyozyten adulter Ratten konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation zu einer Hypertrophie-Induktion führt (Schlüter &



Piper, 1992). Diese wird dann ausschließlich über  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren vermittelt, da die Existenz des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Subtyps an isolierten Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden konnte (Buxton & Brunton, 1985). So kann eine druckinduzierte Myokardhypertrophie durch Prazosin, einem Inhibitor der  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren, wirksam unterdrückt werden (Morgan et al., 1991). Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass eine selektive Stimulation  $\alpha_{1A}$ -adrenerger Rezeptoren unter lastfreien Bedingungen über eine Aktivierung der Proteinkinase C, des PI 3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges und der Aktivierung der transkriptionellen Aktivität und Kapazität innerhalb von 24 Stunden zu einer etwa 20%-igen Zunahme der Myokardmasse führt (Pönicke et al.; 2001). Kardiomyozyten, die eine konstitutiv aktivierte Form der Akt myokardial exprimieren, zeigen ebenfalls eine deutliche Myokardhypertrophie aber auch eine verbesserte Zellfunktion (Shioi et al., 2002).

In Modellen neonataler Kardiomyozyten führt die Stimulation der  $\beta$ -Adrenorezeptoren ebenfalls zur Induktion einer Hypertrophie, an spontan kontrahierenden neonatalen Kardiomyozyten führt die  $\beta$ -adrenerge Stimulation zu einer Steigerung der Kontraktionsfrequenz (Simpson, 1985). Es konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -adrenerge Hypertrophie-Induktion an adulten Kardiomyozyten über  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt wird (Zhou et al., 1996).

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Stimulation führt zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen die miteinander interferieren (Schäfer et al., 2001).

### **1.3 Rolle von Angiotensin II und TGF- $\beta$ bei der Myokardhypertrophie**

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) hat eine wichtige Rolle bei der Hypertrophieentstehung (Lee et al.; 1993). Beim RAS handelt es sich um ein humorales System, dessen aktive Komponente Angiotensin II darstellt. Klinisch betrachtet ist die Hemmung des RAS durch Angiotensin Rezeptorblocker und durch Hemmung des ACE (Angiotensin-Converting-Enzym) die wichtigste therapeutische Intervention einer druckinduzierten Myokardhypertrophie (Carr et al., 1996). Angiotensin II bewirkt selbst keine direkte Steigerung der Proteinsynthese in adulten Herzmuskelzellen (Wada et al., 1996). Andererseits ist bekannt, dass Angiotensin II die TGF- $\beta$  Expression in verschiedenen Zelltypen aktiviert (Moruguchi et al., 1999). Der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist ein bedeutender Wachstumsfaktor, da er im hypertrophierten Myokard im Übergang von der kompensierten zur dekompenzierten Form der Myokardhypertrophie vermehrt exprimiert

wird (Villarreal et al., 1992; Boluyt et al., 1994). In vitro-Studien haben gezeigt, dass TGF- $\beta$  eine cAMP-abhängige Ansprechbarkeit der PI 3-Kinase durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation induziert (Schlüter et al., 1995; 1999). Aus diesen Gründen liegt die Vermutung nahe, dass TGF- $\beta$  in vivo die hypertrophieinduzierende Wirkung adrenerger Stimulation beim Übergang von Hypertrophie zur Insuffizienz beeinflusst.

#### **1.4 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie**

In der vorgelegten Arbeit wurde das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte untersucht. Die Zellen wurden dazu über Nacht mit den jeweiligen Agenzien vorinkubiert. Vorausgehende Arbeiten an diesem Modell haben bereits gezeigt, dass es dabei zu keinen signifikanten Veränderungen hinsichtlich der basalen Proteinsyntheserate kommt, dass aber der Zeitraum ausreichend ist, eine maximale Myokardhypertrophie zu induzieren, die sich quantitativ und qualitativ nicht von komplexeren Systemen unterscheidet. Die einzige messbare Veränderung hinsichtlich der basalen Funktion ist eine Beeinträchtigung der Frequenz-Kontraktions-Beziehung, d.h., die Zellen im nicht behandelten Zustand zeigen eine Abnahme der basalen Zellverkürzung bei Zunahme der Frequenz.

Formell ist dies mit der negativen Kraft-Frequenz-Beziehung des insuffizienten menschlichen Herzens vergleichbar. Allerdings sind die Zellen der Ratte insofern nicht direkt mit humanen Systemen vergleichbar, als dass diese auch basal eine negative Frequenz-Verkürzungsbeziehung im Bereich von 0,5 bis 1 Hz zeigen können.

Grundsätzlich gelten also für die hier vorgestellten Untersuchungen speziesbedingte Vorbehalte hinsichtlich einer direkten Übertragbarkeit auf das humane System. Auf der anderen Seite ist das Rattenzellsystem der Herzmuskelzellen das am besten untersuchte Modell und zeigt hinsichtlich der Signaltransduktion und Entwicklung einer Myokardhypertrophie viele Parallelen zu den humanen Systemen.

Die Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen erlauben eine Detailanalyse der maximalen Zellkontraktion und der Verkürzungsdynamik. Dies wird durch eine hohe Aufnahmezeit von 500 Hz erreicht, so dass die Dynamik der Zellkontraktion sehr exakt erfasst werden kann. In der vorliegenden Arbeit sind zur Vermeidung individueller Unterschiede in den Präparationen Zellen aus jeweils 2 Herzen gemeinsam isoliert worden. Die Ergebnisse aus mindestens vier verschiedenen Präparationen wurden zusammengefasst, so dass auch hier die zufallsbedingte Variabilität durch die Präparation weitgehend ausgeglichen werden konnte.

## 1.5 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, auf zellulärer Ebene die Kausalverknüpfung von Hypertrophie und kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen zu untersuchen.

Adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte wurden isoliert und für 24 Stunden mit Phenylephrin inkubiert. Phenylephrin hat eine hypertrophe Wirkung auf die Zellen, indem es eine Steigerung der Proteinsyntheserate durch eine Aktivierung PKC als auch des PI-3-Kinase/Akt-Kinase-Signalweges bewirkt. Daneben kommt es durch eine Aktivierung der p42-MAP Kinase zu phänotypischen Veränderungen. Hierbei sollte geklärt werden:

- 1.) inwiefern eine  $\alpha$ -adrenerg vermittelte Hypertrophie Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzelle, unter Basalbedingungen, unter Steigerung der externen Last gegen die sich die Herzmuskelzelle kontrahiert und bei Veränderung der Schlagfrequenz hat,
- 2.) inwiefern die verschiedenen Protein-Kinasen (PKC, MAPK, PI-3-Kinase) eine Rolle spielen,
- 3.) welchen Einfluss die externe Calcium-Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten hat.

Die Übertragbarkeit dieser Befunde auf Herzmuskelzellen aus hypertrophen Herzen wurden nachfolgend analysiert. Dazu wurden drei verschiedene Modelle verwendet.

Modell 1: Herzmuskelzellen aus transgenen Mäusen, die eine myokardiale Expression konstitutiv aktivierter Akt besitzen, wurden isoliert. Dieses Modell entspricht einer Hypertrophie ohne erkennbare phänotypische Veränderungen, die durch MAP-Kinasen induziert werden.

Modell 2: Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten wurden isoliert. Diese Tiere zeigen in vivo eine druckinduzierte Myokardhypertrophie, wahrscheinlich basierend auf einer Aktivierung sowohl des sympathischen Nervensystems als auch des Renin-Angiotensin-Systems. Phänotypische Veränderungen sind hier wahrscheinlich.

Modell 3: Herzmuskelzellen aus TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen wurden isoliert. TGF- $\beta$  wird als Endpunkt einer Angiotensin II-Wirkung verstanden, welche anschließend durch eine veränderte Ankopplung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren zu einer Myokardhypertrophie beiträgt. In dem hier verwendeten Modell kann dieser Teil der postulierten Kausalkette (Angiotensin II - TGF- $\beta$  -  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren) von den Eigeneffekten des Angiotensin II entkoppelt werden. Hierbei sollte geklärt werden:

- 4.) ob Herzmuskelzellen aus TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen im Hinblick auf die Zellkontraktion eine veränderte Ansprechbarkeit auf  $\beta$ -adrenerge Rezeptorstimulation zeigen und ob dies durch Antagonisten (auf jeder der drei Ebenen der Kausalkette) gegen Angiotensinrezeptoren, TGF- $\beta$  oder  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren korrigiert werden kann.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Angiotensin-II	Sigma, Taufkirchen
Bisindolylmaleimid	Calbiochem-Novobiochem, Bad Solen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
FCS	PAA Laboratories
Laminin	Roche Laboratories
Glukose	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
HEPES	Roche Applied Science, Mannheim
Isoprenalin	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kollagenase Typ CLSII (332 U/mg)	Biochrom, Berlin
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199 / Earl`s Salts	Invitrogen, Eggenstein
Metoprolol	Sigma, Taufkirchen
Methylcellulose M <sub>D</sub> 40.000	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Noradrenalin	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Eggenstein
PD98059	Sigma, Taufkirchen
Phenolrot	Sigma, Taufkirchen
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
SB 202190	Calbiochem, Bad Soden
TGF- $\beta$ R-Fc	Calbiochem, Bad Soden
Telmisartan	Sigma, Taufkirchen
Wortmannin	Calbiochem-Novobiochem, Bad Solen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt

## 2.2 Medien

### *Calciumchlorid-Stammlösung:*

CaCl <sub>2</sub>	100 mmol/l
-------------------	------------

### *CCT-Kulturmedium:*

M 199 Hepes gepuffert	x ml
Kreatin	5 mmol/l
Karnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 IU/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	100 µmol/l

### *M 199-Hepes gepuffert:*

Medium 199 / Earl`s Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mmol/l
pH	7,4

### *Powell-Medium:*

NaCl	110 mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	25 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
Glukose	11 mmol/l

*Vorinkubationsmedium:*

M 199-HEPES gepuffert	X ml
FCS	4 % (vol/vol)
Laminin	1g/ml
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid wurde zur Hemmung der Proliferation verbliebener Nicht-Herzmuskelzellen zugesetzt. Alle Medien wurden sterilfiltriert, bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt und vor dem Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

**2.3 Puffer***Kollagenasepuffer:*

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25 mg
Calciumchlorid-Stammlösung	12,5 µl

*PBS-Puffer:*

NaCl	150 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mmol/l
NaHPO <sub>4</sub>	5 mmol/l
pH	7,4

*Rezirkulationspuffer:*

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	30 mg

*TBS-Puffer:*

TRIS-HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
pH	7,4

*Zellkontraktionspuffer-Stammlösung:*

NaCl	125 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mmol/l
Glukose	10 mmol/l
HEPES	10 mmol/l
pH	7,4

*Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung:*

Zellkontraktions-Stammlösung	100 ml
Adenosin-Desaminase	20 µl

**2.4 Geräte und Laborbedarf****2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur**

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Aperatur	Eigenbau des Physiologischen Institutes
Gewebehacker	Havard Scientific, Holliston, MA, USA
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan

**2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion**

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg



---

Stimulator

Physiologie Institut der J.-L.-U. Giessen

### 2.4.3 Sonstige Geräte

Glasgeräte

Schott, Mainz

Heizrührer

Janke & Kunkel, Staufen

pH-Meter

WTW, Weilheim

Pipetten

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Wasserbad

Julabo, Seelback

Wasserdemineralisierungsanlage

Millipore, Eschborn

### 2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen (Typ Falcon 3001)

Becton Dickinson, Heidelberg

Kulturschalen (Typ Falcon 3004)

Becton Dickinson, Heidelberg

Pipettenspitzen

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Reaktionsgefäße

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)

Schleicher & Schuell, Dassel

### 2.4.5 Software

Excel

Microsoft

MUCEL

Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

SPSS

SAS Software-Version 6.11

### 3. Methoden

#### 3.1 Präparation isolierter Herzmuskelzellen und deren Inkubation

Zu Beginn der Präparation von  $\text{Ca}^{++}$ -toleranten Herzmuskelzellen wurde eine Langendorff-Apparatur zunächst mit Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (KRB-Puffer) gespült und danach mit dem gleichen Puffer luftblasenfrei gefüllt. Während der gesamten Herzzellisolierung wurde die Perfusionslösung weiter mit Carbogen begast.

Zur Isolierung von ventrikulären Myokardzellen wurden

- a) ca. 12 Wochen alte, 300-400 g schwere, männliche Wistar-Ratten
- b) ca. 12 Wochen alte, 300-400 g schwere, männliche spontan hypertensive Ratten (SHR)
- c) ca. 10 Wochen alte, 100-200 g schwere männliche und weibliche transgene Mäuse, die eine myokardiale Expression konstitutiv aktivierter Akt besitzen
- d) ca. 10 Wochen alte, 100-200 g schwere männliche und weibliche transgene TGF- $\beta$  überexprimierende Mäuse

aus dem Tierstall der Inneren Medizin Köln, Universität zu Köln

mit Diethylether narkotisiert und thorakotomiert. Die Herzen wurden mit eiskalter 0,15 M NaCl-Lösung stillgestellt und oberhalb des Aortenbogens abgetrennt, danach die Lungenflügel entfernt und die Aorta freipräpariert. Bei langsam laufender Perfusion mit dem KRB-Puffer (ca. 30 Tropfen/min) wurden die Herzen mit der freipräparierten Aorta an die Langendorff-Apparatur angehängt und mit 40 ml pro Herz blutfrei perfundiert. Anschließend wurde für 30 min mit Kollagenasepuffer (2-3 ml/min) rezirkulierend perfundiert. Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewebe mit einem Gewebehacker (Tissue Chopper 1086, Bachofer, Reutlingen) bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Im Kollagenasepuffer mit 1 % Albumin wurde das Gewebe während eines 15-20 minütigen wiederholten Ansaugens mit einer 10 ml Pipette aufgetrennt.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur durch ein Nylonnetz mit 200  $\mu\text{m}$  Porengröße filtriert, um Bindegewebestücke abzutrennen. Das Filtrat wurde für 3 min bei 400 Upm zentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode/Harz), um Zelltrümmer und kleinere Zellen, wie z.B. Endothelzellen, von intakten Myozyten zu trennen. Das Sediment wurde im KRB-Puffer + 0,2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und erneut bei 400 Upm für 3 min zentrifugiert. Intakte  $\text{Ca}^{++}$ -tolerante Myozyten wurden durch Sedimentation durch ein Medium hoher Dichte aufkonzentriert. Hierfür wurden hohe Reagenzgläser bis zur Hälfte

mit dem KRB-Puffer + 4 % Albumin + 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  gefüllt und die Zellsuspension mit einer gebogenen Pasteurpipette vorsichtig überschichtet. Zur beschleunigten Sedimentation wurden diese Reagenzgläser bei 300 Upm für 30 Sekunden zentrifugiert (Sigma 4K-1; Sigma, Taufkirchen). Dabei wanderten Aggregate aus vorwiegend intakten Zellen auf den Boden der Reagenzgläser und bildeten dort ein lockeres Sediment.

Das zu ca. 80 % aus intakten stabförmigen Zellen bestehende Sediment wurde für Kurzzeitkulturen in modifiziertem Kulturmedium 199 (CCT-Medium) resuspendiert.

35 mm-Gewebekulturschalen (Falcon Nr. 3004) wurden am Vorabend mit 1,0-1,5 ml modifiziertem Kulturmedium 199 [ CCT plus 4 % (v/v) FCS ] beschichtet und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Ostrode/Harz) vorinkubiert. Diese 15 bis 20-stündige Vorinkubation der Kulturschalen war für eine effektive Anheftung der Zellen nach der Präparation notwendig. Unmittelbar vor dem Ausplattieren der im Kulturmedium resuspendierten isolierten Zellen wurde das alte Inkubationsmedium von den Kulturschalen abgesaugt. Pro 35 mm-Schale wurden dann jeweils 1 ml der Zellsuspension ausplattiert und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Diese Kurzzeitkultur im CCT-Medium bewirkte eine energetische Erholung der Zellen nach der Präparation. Während der 2-stündigen Kurzzeitkultur werden die intakten Myozyten zusätzlich aufgereinigt. Im Gegensatz zu den geschädigten und lysierten Zellen sedimentieren die stäbchenförmigen, intakten Myozyten und heften sich am Boden der vorinkubierten Plastik-Kulturschale an. Die runden und isolierten Zellen flotieren im überstehenden Medium und konnten somit zu Versuchsbeginn abgesaugt werden. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese über Nacht mit unterschiedlichen Reagenzien inkubiert (siehe Versuchsprotokolle im Ergebnisteil).

Die Mäuseherzen wurden entsprechend der kleineren Größe mit geringerem Volumen pro Minute mit den Puffer- und Kollagenaselösungen perfundiert. Die Vorinkubation der Gewebekulturschalen erfolgte bei den Mäusemyozyten mit Laminin.

## **3.2 Messung von Myokardzell-Kontraktion im elektrischen Feld**

### **3.2.1 Probenvorbereitung**

Bei der Messung von Myokardzell-Kontraktion wurde mit Übernachtskulturen von isolierten Kardiomyozyten gearbeitet. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden (mit unterschiedlichen Reagenzien, siehe Kapitel 4) wurden bei den Myozyten die Kontraktionsparameter entweder ohne weitere Zugabe von Reagenzien oder unter Zugabe von

---

Isoprenalin zur Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren oder unter Anlegen einer äußeren Last durch Kontraktion in hoch viskösem Medium gemessen.

### 3.2.2 Elektrische Stimulation der Myokardzell-Kontraktion

Die Kulturschale wurde auf den Objektisch eines Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel verschlossen. In diesen Deckel waren vier Löcher gebohrt worden, die so angeordnet waren, dass sie annähernd die Eckpunkte des Quadrats bildeten, welches den Kreis des Deckels maximal ausfüllt.

Der Draht, der später an die Kathode des Elektrostimulators angeschlossen wurde, war durch eines dieser Löcher in das Innere des Deckels geführt worden, so dass er in das Medium in der Kulturschale eintauchen konnte. Durch ein benachbartes Loch wurde dieser wieder nach außen geführt. Dabei war er so gebogen, dass er annähernd senkrecht in das Medium eintauchte, dann abknickte und horizontal durch das Medium verlief, darauf wieder abknickte und senkrecht das Medium verließ. Mit dem Draht, der später an die Anode angeschlossen wurde, verfuhr man auf die gleiche Weise. In der mit diesem Deckel geschlossenen Kulturschale lagen sich also zwei horizontal verlaufende Drähte gegenüber, die beide in den Puffer eintauchten. Die beiden Drähte stellten Kathode und Anode in der Schale dar. Wurden sie an den Stimulator angeschlossen, baute sich zwischen ihnen ein elektrisches Feld auf, das aufgrund der Form des Drahtes einem homogenen Feld angenähert war und so zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss durch die Zellen zwischen den beiden Drähte führte.

Die Zellen wurden mit biphasischen Stromstößen, die von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils 0,5 Millisekunden dauerten, zur Kontraktion stimuliert. Zeitweise auftretende Spontankontraktionen in unregelmäßiger Frequenz wurden durch die Stimulation vereinheitlicht, indem der Stimulator ihnen seine Stromfrequenz als Kontraktionsfrequenz aufzwang. Zellen, welche die vorgegebene Frequenz nicht annahmen, wurden in den Experimenten nicht berücksichtigt. Man konnte nun den Myokardzellen verschiedene Frequenzen vorgeben, indem man die Stimulationsfrequenz änderte.

### 3.2.3 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg erfasst. Während der Stimulation der Zellen befand sich die Kulturschale auf dem Objektisch eines Mikroskops. Durch das Mikroskop war es möglich, die Zellen bei ihren Kontraktionen zu beobachten.

An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen. Die eine Kamera war eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor. Bei der anderen handelte es sich um eine Zeilenkamera, die in der Lage war, Zellgrenzen zu erkennen, da sie verschiedene Helligkeiten wahrnehmen konnte, so auch den Hell-Dunkel-bzw. Dunkel-Hell-Übergang an der Grenze zwischen Zelle und Hintergrund.

Um nun eine Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste man die Zeilenkamera so positionieren, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dazu bewegte man die Kulturschale so, dass sich die zu untersuchende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand und drehte dann die Zeilenkamera, bis man am Videobild sehen konnte, dass sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden.

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde nicht auf einem Monitor, sondern über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker auf 5 V/div geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert, so dass man ein stehendes Bild erhielt. Wenn nun die Zeilenkamera verschiedene Helligkeiten wahrnahm, wurden diese auf dem Oszillographen als verschieden starke y-Auslenkung dargestellt. Diejenigen Amplituden, welche die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung indentifiziert werden. Es war also möglich, die Zellkontraktion auf dem Oszillographen zu beobachten.

Der Oszillograph wurde als Zwei-Kanal-Oszillograph betrieben. Am zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wurde sie abgelesen, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde sie nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert und zwar auf folgende Weise:

Man setzte einen Triggermarker des Interface, der ebenfalls vom Interface auf dem Oszillograph durch eine Amplitude sichtbar gemacht wurde, vor eine Amplitude des Zellbildes. Erreichte nun die ansteigende Spannung des Zellbildes (sichtbar durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar durch die Amplitude des Triggermarkers), so begann der Oszillograph, die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe. Veränderte nun die Amplitude des Zellbildes im Zuge der Kontraktion ihre Position, so veränderte sich auch die Position, an welcher der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild sah man, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Man konnte also die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen beobachten. An der anderen Zellkante verfuhr man analog.

Die Information Interface-Spannung an bzw. Interface-Spannung aus wurde vom Oszillograph an das Interface weitergegeben, welche sie wiederum an einen Computer weiterleitete.

Auf diesem PC lief das Programm Mucell der Firma Scientific Instruments GmbH. Dieses Programm registrierte aus der Information Spannung *an* bzw. Information Spannung *aus* – die Länge der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Anhand der Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Zeit darstellte, also eine Kurve welche die Kontraktion der Zelle darstellte. Das Programm erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Er nahm 5 Kontraktionen auf und ermittelte folgende Werte als Mittelwerte aus den jeweiligen 5 Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometern
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometern
3. Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion („Time-to-Peak“) in Millisekunden
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde
6. Die Zeit von der 10 %-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden („T10-to-Peak“)

7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90 % der Zellverkürzungsstrecke („R90-Wert“)

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

1. Der Quotient  $\Delta L/L$ : Man bildete die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge ( $\Delta L$ ). In Prozent ausgedrückt zeigt die  $\Delta L/L$  an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
2. Die  $Con_{max}$  als Ratenkonstante für maximale Kontraktionsgeschwindigkeit: Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Zellverkürzung bestimmt und in  $\mu\text{m/s}$  angegeben.
3. Die  $Rel_{max}$  als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Relaxation bestimmt und in  $\mu\text{m/s}$  angegeben.

### 3.2.4 Messprotokoll

Jede Zelle wurde auf die oben beschriebene Weise bei einer Frequenz von 1 Hz viermal ausgemessen, wobei zwischen zwei Messungen jeweils 15 Sekunden verstrichen. Die so erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurde in das Programm Excel übertragen und weiter verarbeitet: Aus diesen jeweiligen ersten vier Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt. Danach änderte man die Frequenz und maß die Zelle noch einmal bei 0,5 Hz und bei 2 Hz aus.

### 3.3 Statistik

Die Einzelkontraktionen wurden jeweils aus verschiedenen Präparationen zusammengefasst und der Mittelwert aus diesen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler. Bei Vergleichen zwischen Gruppen wurde ein konventioneller T-Test herangezogen. Wurden mehr als zwei Gruppen in einem Experiment verglichen, wurde zunächst eine Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA) und anschließend ein Student-Neumann-Keuls-Test als post hoc Test verwendet. Daten mit  $p < 0,05$  wurden als voneinander statistisch signifikant unterschiedlich bezeichnet.

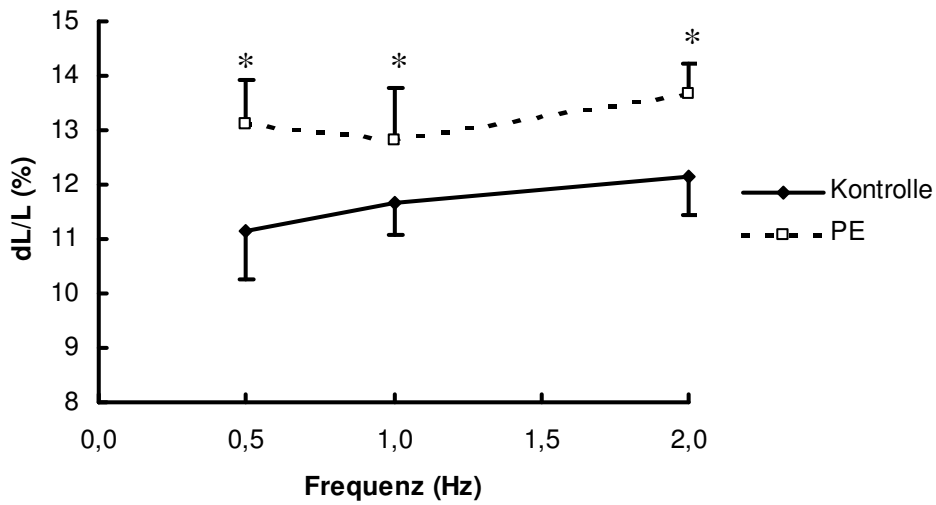
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Akutwirkung von Phenylephrin auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmuskelzellen

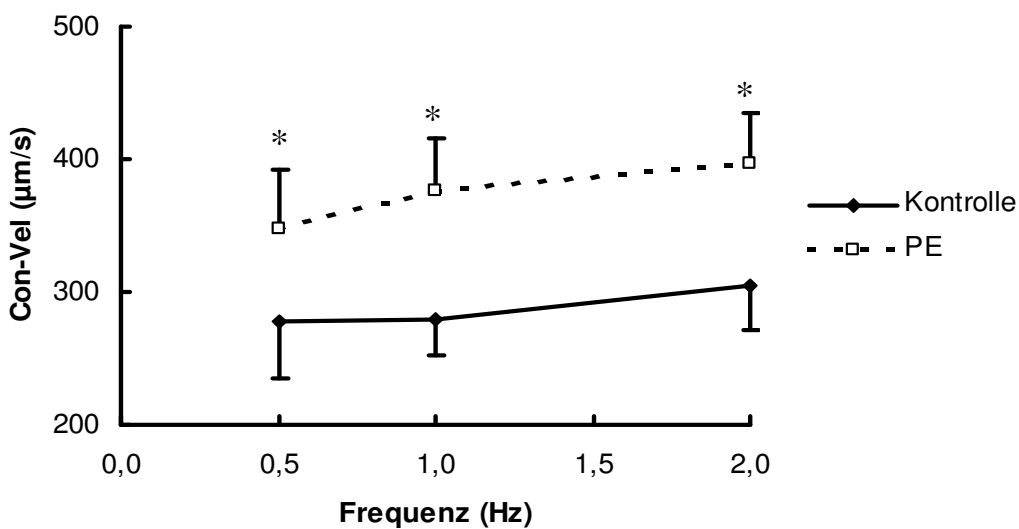
Um den Einfluss einer akuten adrenergen Stimulation auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte zu untersuchen, wurden die Kulturschalen mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht einer nominell weitgehend lastfreien Verkürzung. Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurden deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (dL/L in %) und die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) gemessen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Frequenzen von 0.5, 1 und 2 Hz stimuliert, wobei eine Frequenz von 0.5 Hz für die Herzmuskelzelle der Ratte unphysiologisch niedrig ist, aber der Zelle eine starke Verkürzung erlaubt.

Die unbehandelten Kulturen zeigten eine positive Verkürzungs-Frequenz-Beziehung, entsprechend einer Frequenzinotropie. Die Stimulation mit Phenylephrin führte im gesamten Frequenzbereich zu signifikant stärkerer Zellverkürzungen (Abb. 4.1.1). Unter Phenylephrin war die Kontraktionsgeschwindigkeit isolierter Herzmuskelzellen im gesamten Frequenzbereich signifikant größer als die der unbehandelten Kulturen (Abb. 4.1.2).





**Abb. 4.1.1:** Einfluss einer akuten Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung in Abhängigkeit von der Frequenz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus  $n = 70$  Zellen. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.



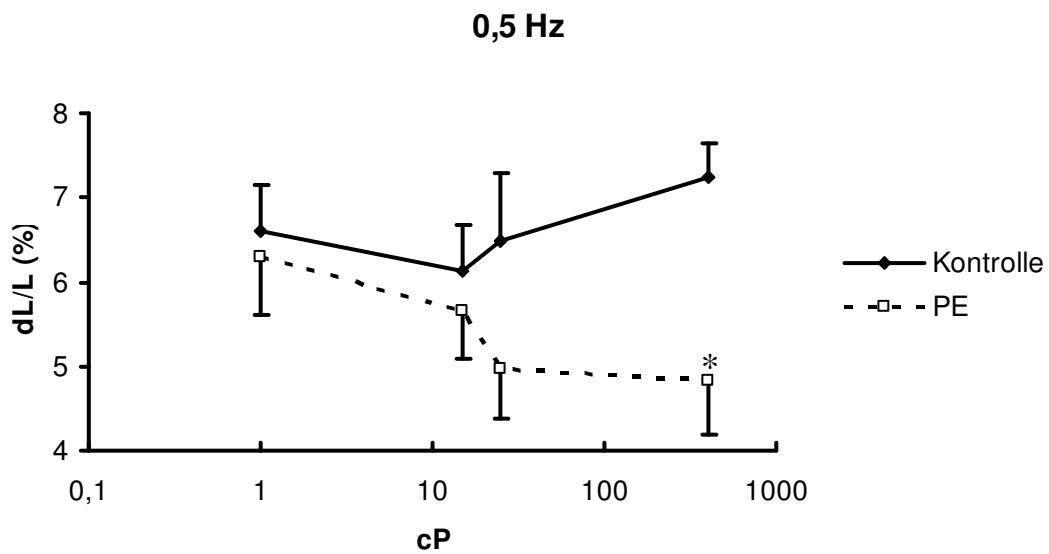
**Abb. 4.1.2:** Einfluss einer akuten Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Kontraktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Frequenz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus  $n = 70$  Zellen. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

## 4.2 Einfluss chronischer Phenylephrin-Exposition auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen unter visköser Last

Um den Einfluss einer chronischen adrenergen Stimulation auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen zu messen, wurden adulte Herzmuskelzellen der Ratte mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht nominell weitgehend lastfreien Bedingungen (nominell 1 cP) sowie unter externer Last (nominell 15 cP, 25 cP, 400 cP durch Zugabe von Methylcellulose mit unterschiedlichen Polymerisationsgrad). Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurden deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (dL/L in %), die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) gemessen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Frequenzen von 0.5, 1 und 2 Hz stimuliert.

Die unbehandelten Kulturen zeigten eine stärkere Zellverkürzung als Herzmuskelzellen, die mit Phenylephrin inkubiert wurden. Bei größter Viskosität (400 cP) sank die relative Zellverkürzung signifikant auf 4,82 % (Abb. 4.2.1).

#### 4.2.1 Abhängigkeit von der Medienviskosität



**Abb. 4.2.1: Einfluss einer chronischen Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung bei 0.5 Hz unter lastfreien Bedingungen und unter Last. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 32$  Zellen. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.**

#### 4.2.2 Zellverkürzung unter lastfreien Bedingungen und unter Last

Lastfrei (1cP) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Phenylephrin stimulierten Zellen (Abb. 4.2.2a). Unter Last (400 cP) zeigten Phenylephrin stimulierte Zellen bei einer Frequenz von 0.5 Hz eine signifikant geringere Zellverkürzung. Mit zunehmender Frequenz wurde dieser Verlust zum Teil ausgeglichen (Abb. 4.2.2b).

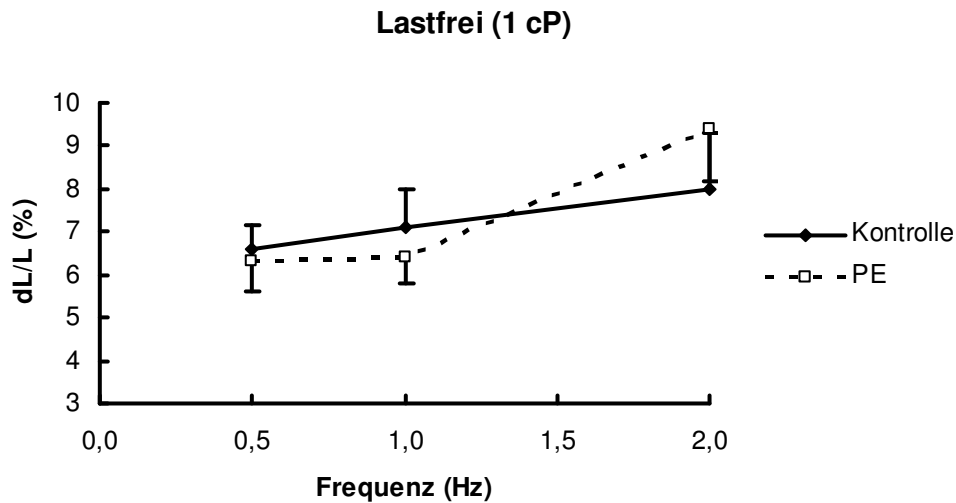


Abb. 4.2.2a: Einfluss einer chronischen Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung bei 0,5, 1 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 32$  Zellen.

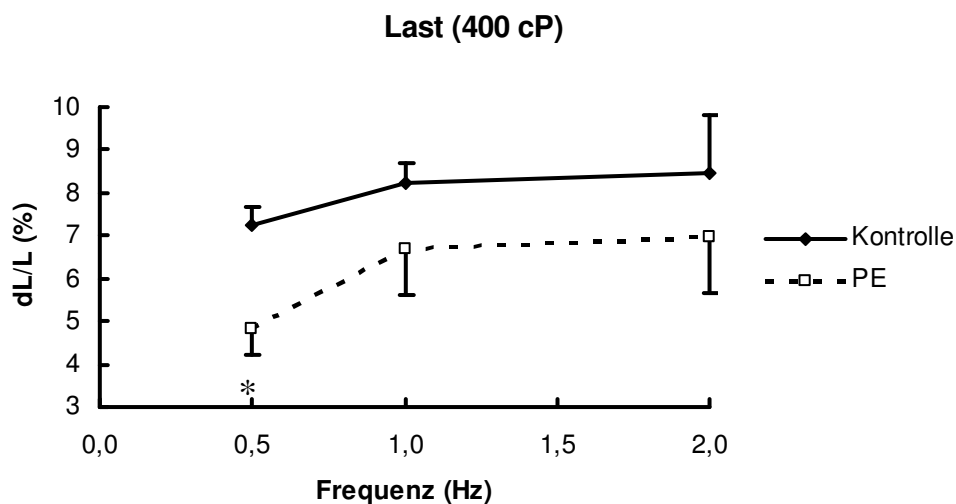
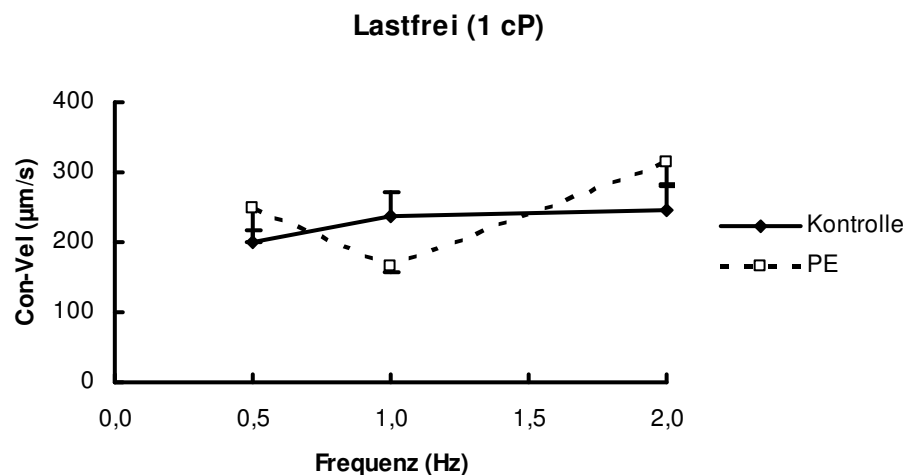


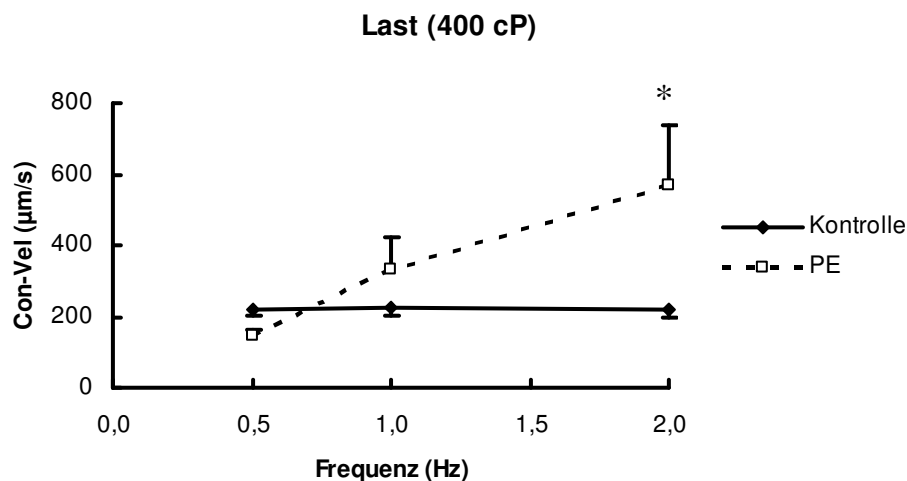
Abb. 4.2.2b: Einfluss einer chronischen Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung bei 0,5, 1 und 2 Hz unter Last. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 32$  Kulturen. \* =  $p < 0,05$  vs. Zellen.

### 4.2.3 Zellverkürzungsgeschwindigkeit unter lastfreien Bedingungen und unter Last

Unter lastfreien Bedingungen (1cP) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Phenylephrin inkubierten Zellen (Abb.4.2.3a). Unter Last (400 cP) stieg die relative Kontraktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Frequenz bei den Phenylephrin inkubierten Zellen, während bei den Kontrollzellen die relative Kontraktionsgeschwindigkeit frequenzunabhängig konstant blieb (Abb.4.2.3b).



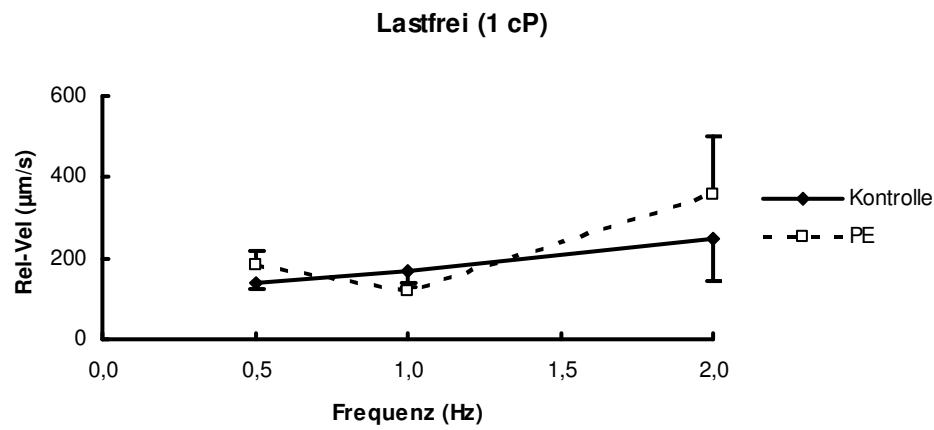
**Abb. 4.2.3a:** Einfluss einer chronischen Phenylephrin-Exposition (PE, 10 µmol/l) auf die relative Kontraktionsgeschwindigkeit bei 0,5, 1 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 32 Zellen.



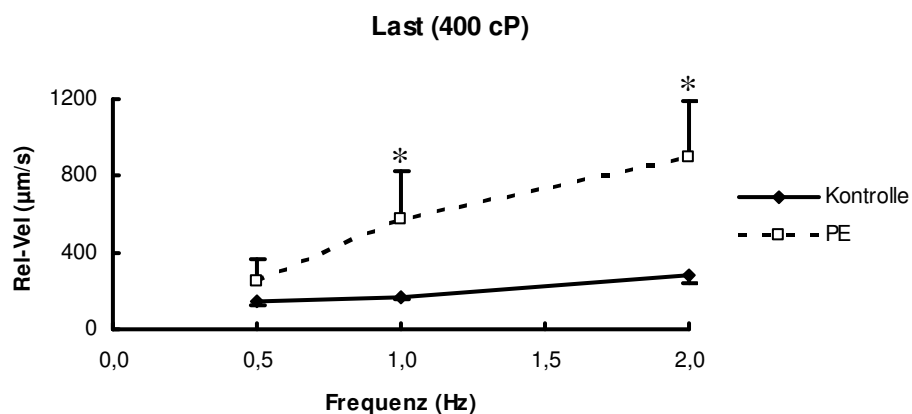
**Abb. 4.2.3b:** Einfluss einer chronischen Phenylephrin-Exposition (PE, 10 µmol/l) auf die relative Kontraktionsgeschwindigkeit bei 0,5, 1 und 2 Hz unter Last. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 32 Zellen. \* = p < 0,05 vs. Kontrolle.

#### 4.2.4 Relaxationsgeschwindigkeit unter lastfreien Bedingungen und unter Last

Unter lastfreien Bedingungen (1cP) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Phenylephrin inkubierten Zellen (Abb.4.2.4a). Unter Last (400 cP) stieg die relative Relaxationsgeschwindigkeit mit zunehmender Frequenz bei den Phenylephrin inkubierten Zellen signifikant auf 579  $\mu\text{m/s}$  bei 1 Hz und auf 897  $\mu\text{m/s}$  bei 2 Hz, während bei den Kontrollzellen die relative Relaxationsgeschwindigkeit frequenzabhängig leicht anstieg (Abb.4.2.4b).



**Abb. 4.2.4a:** Einfluss einer chronischen Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Relaxationsgeschwindigkeit bei 0,5, 1 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 32$  Zellen.



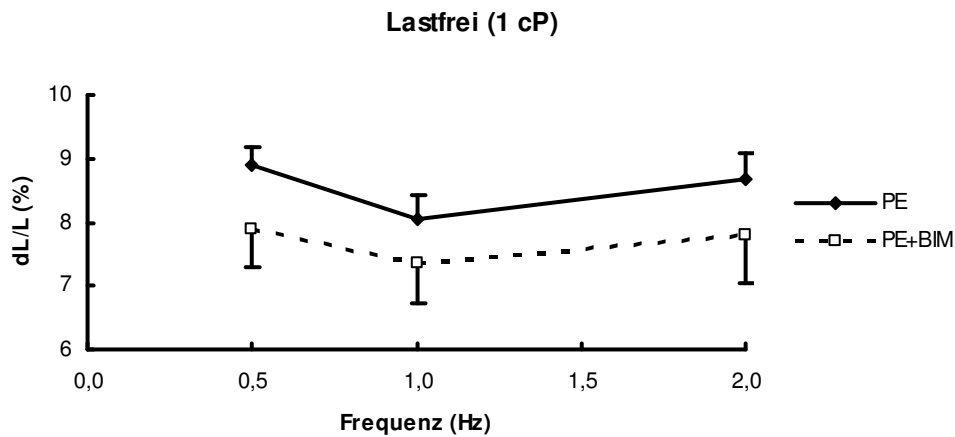
**Abb. 4.2.4b:** Einfluss einer chronischen Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Relaxationsgeschwindigkeit bei 0,5, 1 und 2 Hz unter Last. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 32$  Zellen. \* =  $p < 0,05$ .

---

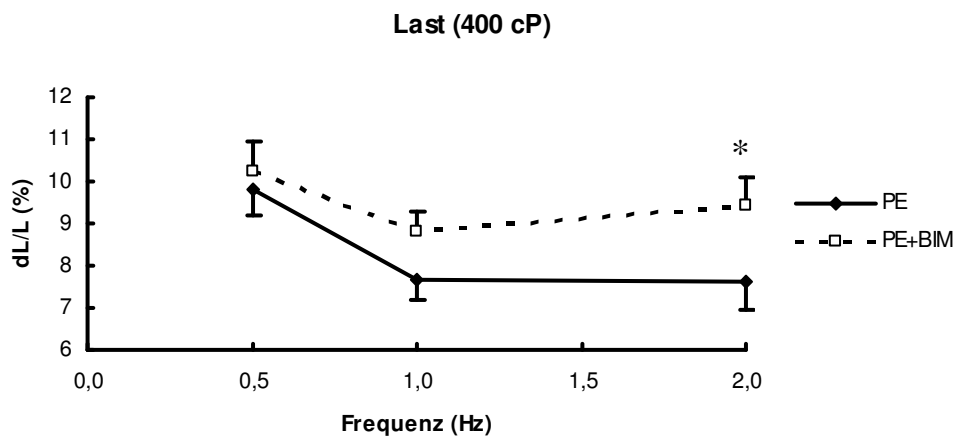
### **4.3 Einfluss der Hemmung der Proteinkinase C-Aktivierung mittels Bisindolylmaleimid auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin**

Um den Einfluss der Proteinkinase C (PKC) auf das durch Phenylephrin veränderte Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen zu charakterisieren, wurden Experimente durchgeführt, in denen die Aktivierung der PKC mit Phenylephrin durch Vorinkubation (15 min) mit Bisindolylmaleimid (BIM, 5  $\mu\text{mol/l}$ ) verhindert wurde. Die Zellen wurden wie unter 4.2 behandelt.

Die Hemmung der PKC durch BIM bewirkte, dass die relative Zellverkürzung unter lastfreien Bedingungen (1cP) nach chronischer Phenylephrin-Exposition im gesamten Frequenzbereich niedriger war als ohne Hemmung durch BIM (Abb. 4.3.1). Unter Last (400 cP) bewirkte BIM eine stärkere Zellverkürzung im gesamten Frequenzbereich. Bei 2 Hz betrug die relative Zellverkürzung signifikant 9,41 % (Abb. 4.3.2).



**Abb. 4.3.1:** Einfluss der Hemmung der PKC-Aktivierung mittels BIM (5  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung der Herzmuskelzellen bei 0,5, 1 und 2 Hz nach chronischer Exposition mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 35$  Zellen.



**Abb. 4.3.2:** Einfluss der Hemmung der PKC-Aktivierung mittels BIM (5  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung der Herzmuskelzellen bei 0,5, 1 und 2 Hz nach chronischer Exposition mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) unter Last. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 35$  Zellen. \* =  $p < 0,05$ .

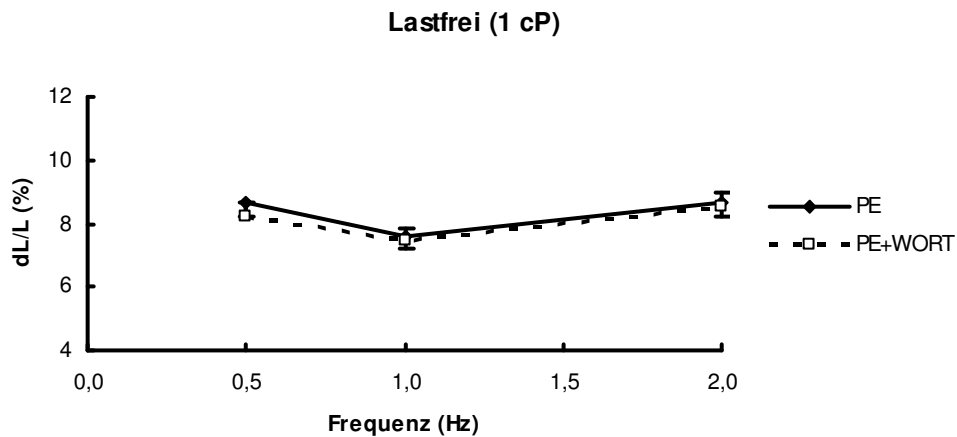


---

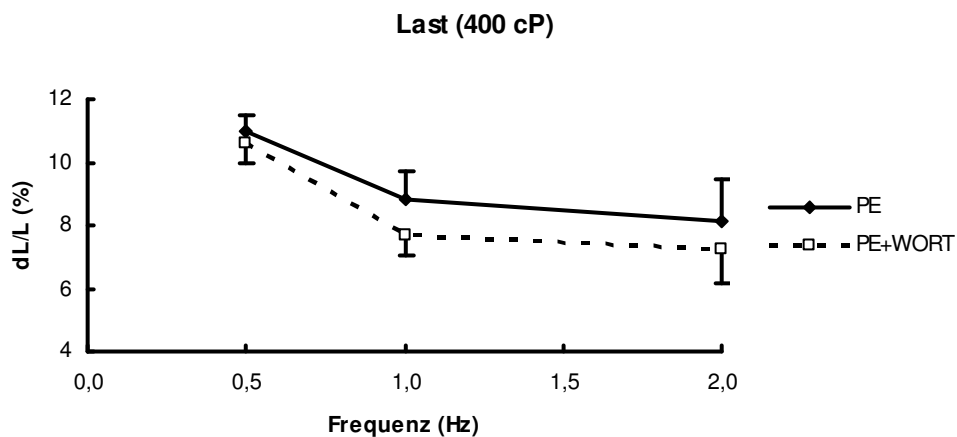
#### **4.4 Einfluss der Hemmung der PI3-Kinase mittels Wortmannin auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin**

Es wurde überprüft, ob die Hemmung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) mittels Wortmannin (WORT, 100 nmol/l) Einfluss auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu$ mol/l) hat. Die Zellen wurden mit WORT vorinkubiert (15 min) und wie unter 4.2 behandelt.

Wortmannin hatte keinen Einfluß auf die relative Zellverkürzung isolierter Herzmuskelzellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen unter lastfreien Bedingungen (1 cP). Im gesamten Frequenzbereich gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.4.1). Unter Last (400 cP) sank die relative Zellverkürzung mit steigender Frequenz bei behandelten und Kontrollzellen (Abb. 4.4.2).



**Abb. 4.4.1:** Einfluss der Hemmung der PI3-Kinase mittels WORT (100 nmol/l) auf die relative Zellverkürzung der Herzmuskelzellen bei 0,5, 1 und 2 Hz nach chronischer Exposition mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu$ mol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 30 Zellen.



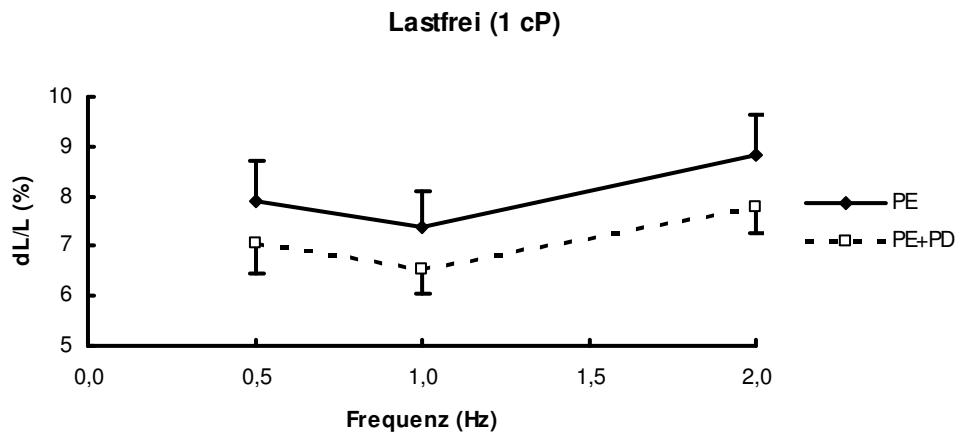
**Abb. 4.4.2:** Einfluss der Hemmung der PI3-Kinase mittels WORT (100 nmol/l) auf die relative Zellverkürzung der Herzmuskelzellen unter Last (400 cP) bei 0,5, 1 und 2 Hz nach chronischer Exposition mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu$ mol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 30 Zellen.

---

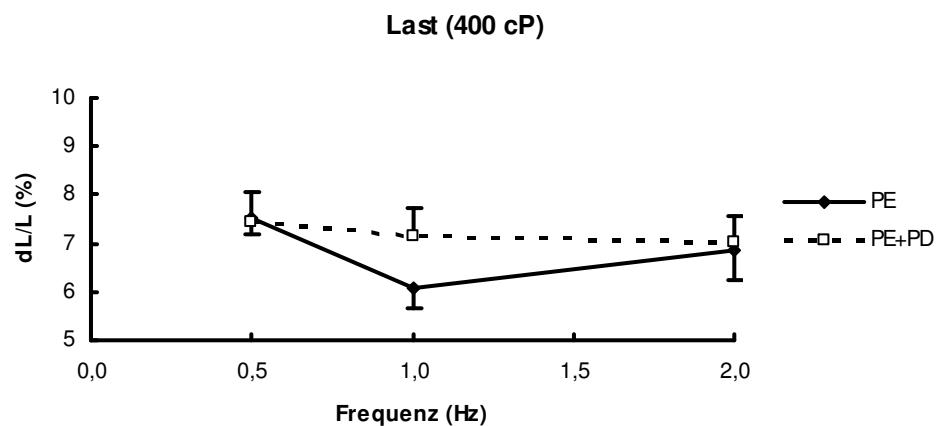
#### **4.5 Einfluss der Hemmung der p42 MAP-Kinase mittels PD98059 auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin**

Um den Einfluss der p42 MAP-Kinase auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen zu charakterisieren, wurden Experimente durchgeführt, in denen die Aktivierung der p42 MAP-Kinase mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) durch Vorinkubation (15 min) mit PD98059 (PD, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) verhindert wurde. Die Zellen wurden wie unter 4.2 behandelt.

Die Hemmung der p42 MAP-Kinase durch PD98059 bewirkte, dass die relative Zellverkürzung unter lastfreien Bedingungen (1cP) nach chronischer Phenylephrin-Exposition im gesamten Frequenzbereich niedriger war als ohne Hemmung durch PD98059 (Abb. 4.5.1). Unter Last (400 cP) bewirkte PD98059 eine geringere relative Zellverkürzung bei 1 Hz (Abb. 4.5.2).



**Abb. 4.5.1:** Einfluss der Hemmung der p42 MAP-Kinase mittels PD98059 (PD, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung der Herzmuskelzellen bei 0,5, 1 und 2 Hz nach chronischer Exposition mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 30$  Zellen.

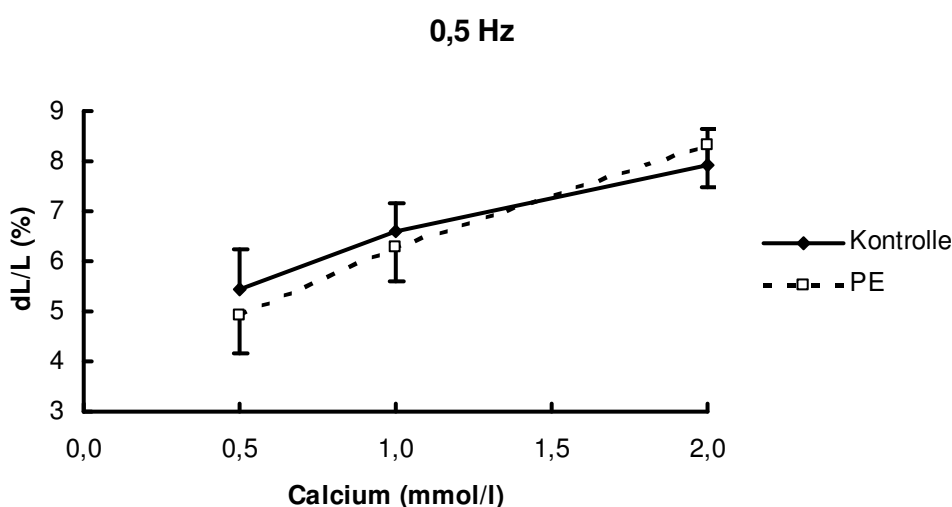


**Abb. 4.5.2:** Einfluss der Hemmung der p42 MAP-Kinase mittels PD98059 (PD, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Zellverkürzung der Herzmuskelzellen unter Last (400 cP) bei 0,5, 1 und 2 Hz nach chronischer Exposition mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 30$  Zellen.

#### 4.6 Einfluss der externen Calcium-Konzentration auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzelle bei chronischer Exposition mit Phenylephrin

Um den Einfluss der externen Calcium-Konzentration auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei chronischer Exposition mit Phenylephrin zu messen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte über Nacht mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert und unter elektrischer Stimulation bei 0.5 Hz im modifiziertem Zellkulturmedium mit einer Calcium-Konzentration von 0.5, 1 und 2 mmol/l gemessen. Als Grad für die Kontraktion der Zellen wurden deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (dL/L in %) gemessen.

Während eine steigende Calcium-Konzentration (0.5 , 1 und 2 mmol/l) zu einer stärkeren relativen Zellverkürzung führte, war diese nach einer chronische Phenylephrin-Exposition nicht signifikant verschieden von der unbehandelten Kulturen (Abb.4.6).



**Abb. 4.6:** Einfluss der externen Calcium-Konzentration (0.5 , 1, 2 mmol/l) auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen bei 0.5 Hz nach chronischer Phenylephrin-Exposition (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 36 Zellen.

#### 4.7 Einfluss chronischer Exposition von Phenylephrin auf die maximale $\beta$ -adrenerg induzierbare Konzentrationsfähigkeit der Herzmuskelzellen

Um den Einfluss einer chronischen Exposition von Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die maximale  $\beta$ -adrenerg induzierbare Konzentrationsfähigkeit der Herzmuskelzellen zu messen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte über Nacht mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert und unter elektrischer Stimulation in Gegenwart von Isoprenalin (ISO, 100  $\text{nmol/l}$ ) im Frequenzbereich von 0.5 bis 2 Hz im unmodifizierten Zellkulturmedium gemessen. Als Grad für die Kontraktion der Zellen wurde deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (dL/L in %) gemessen.

Im Bereich von 0.5 bis 2 Hz zeigten mit Phenylephrin behandelte Herzmuskelzellen keine signifikante Steigerung der Isoprenalin-Stimulierbarkeit (ISO-Stimulierbarkeit). Bei den Kontrollzellen stieg die ISO-Stimulierbarkeit signifikant von 83,4 % bei 0.5 Hz auf 131,3 % bei 2 Hz (Abb. 4.7).

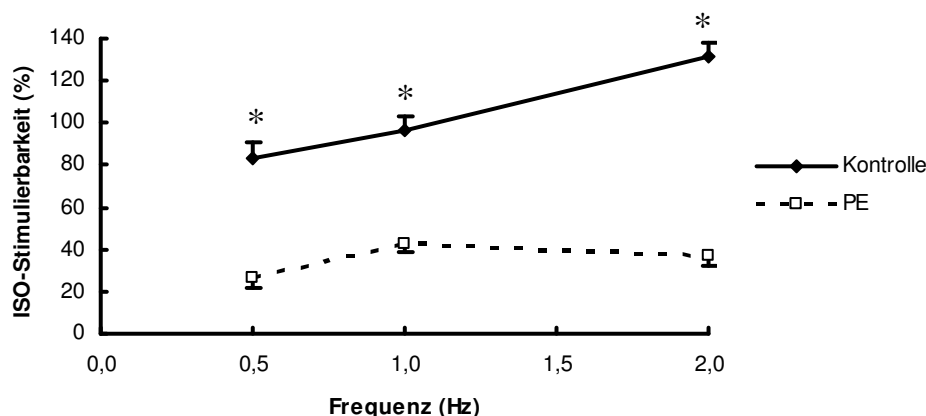


Abb .4.7: Einfluss chronischer Exposition von Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die maximale  $\beta$ -adrenerg induzierbare Konzentrationsfähigkeit der Herzmuskelzellen bei 0.5 Hz in Gegenwart von Isoprenalin (ISO, 100  $\text{nmol/l}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 31$  Kulturen. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

#### **4.8 Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen aus transgenen Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form der Akt-Kinase myokardial exprimieren**

Um das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen aus transgenen Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form der Akt-Kinase myokardial exprimieren, zu untersuchen, wurden ventrikuläre adulte Herzmuskelzellen aus transgenen Akt-exprimierenden Mäusen (TG) und ihren nicht transgenen Geschwistern (NTG) isoliert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation bei einer Frequenz von 5 Hz in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht nominell weitgehend lastfreien Bedingungen (nominell 1cP). In weiteren Versuchen wurde bei externer Last (nominell 400 cP, durch Zugabe von Methylcellulose) und nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l) gemessen. Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurden deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (dL/L in %), die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Re-Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) gemessen.

Unter lastfreien Bedingungen und unter Last ist die relative Zellverkürzung nicht transgener Herzmuskelzellen kleiner. Dieser Verlust der nicht transgenen Herzmuskelzellen (NTG) wird nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l) ausgeglichen. Lastfrei (1 cP) beträgt die Zellverkürzung transgener Herzmuskelzellen 12,23 % und sinkt auf 8,58 % (Abb. 4.8.1a). Der Funktionsdefizit unter Last ist bei nicht transgenen (NTG) und transgenen (TG) Herzmuskelzellen etwa gleich groß (Abb.4.8.1b).

#### 4.8.1 Zellverkürzung der Herzmuskelzellen

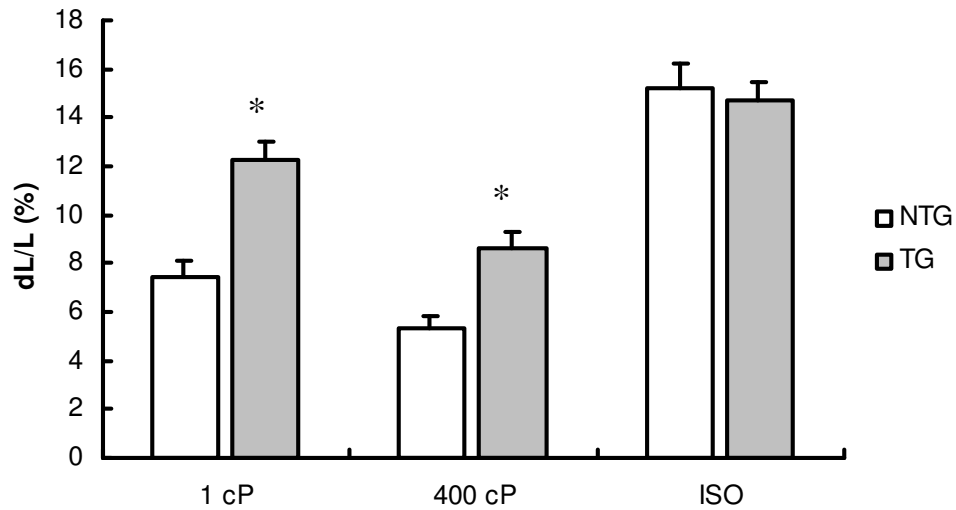


Abb .4.8.1a: Einfluss der Akt-Kinase auf die relative Zellverkürzung der Herzmuskelzellen unter lastfreien Bedingungen (1 cP), unter Last (400 cP) und nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 20 Zellen. \* = p < 0,05 vs. NTG

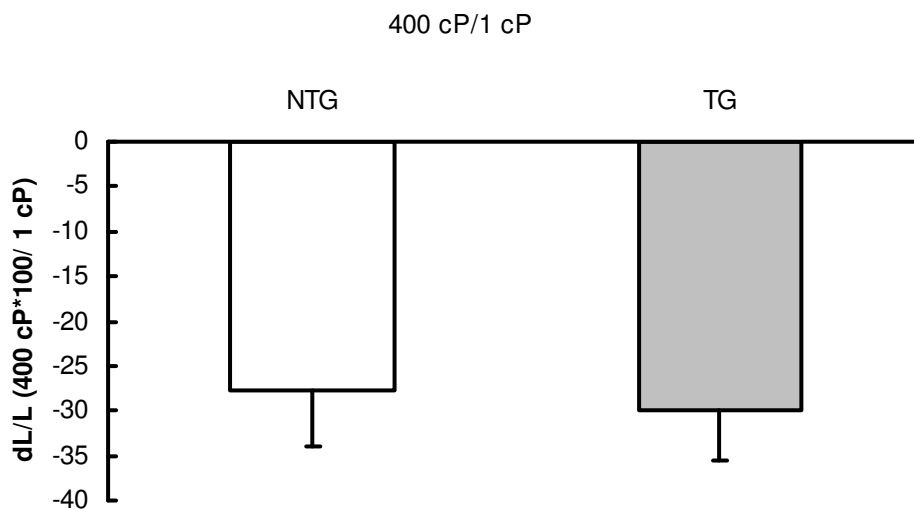
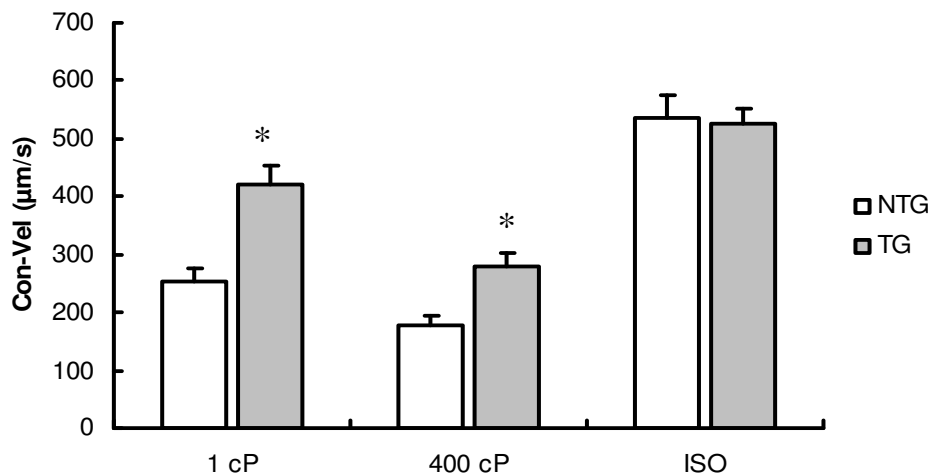


Abb .4.8.1b: Vergleich der relativen Zellverkürzung der Herzmuskelzellen unter lastfreien Bedingungen (1 cP) und unter Last (400 cP). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 20 Zellen. \* = p < 0,05 vs. NTG

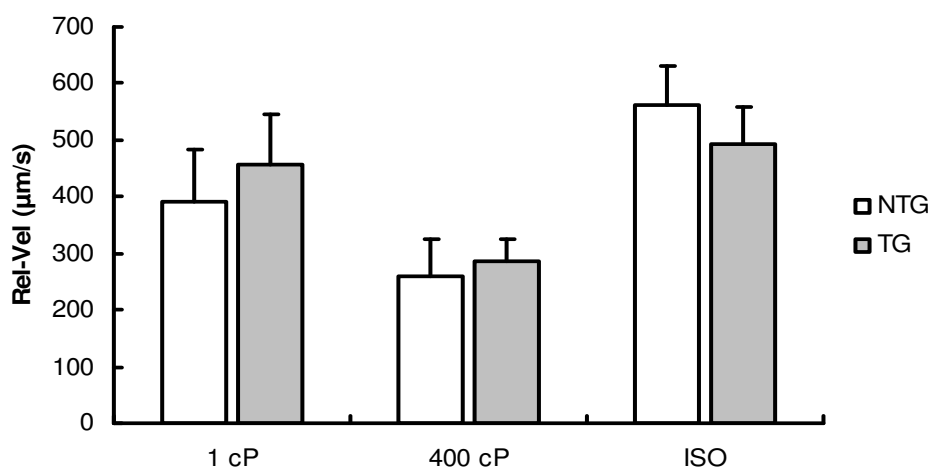


#### 4.8.2 Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen

Unter lastfreien Bedingungen und unter Last ist die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nicht transgener Herzmuskelzellen kleiner. Dieser Verlust der nicht transgenen Herzmuskelzellen (NTG) wird nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l) ausgeglichen. Lastfrei (1 cP) beträgt die Kontraktionsgeschwindigkeit transgener Herzmuskelzellen 422  $\mu\text{m/s}$  und sinkt unter Last (400 cP) auf 278  $\mu\text{m/s}$  (Abb. 4.8.2a und 4.8.2b).



**Abb .4.8.2a: Einfluss der Akt-Kinase auf die Kontraktionsgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ) der Herzmuskelzellen unter lastfreien Bedingungen (1 cP), unter Last (400 cP) und nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 20$  Zellen. \* =  $p < 0,05$  vs. NTG**



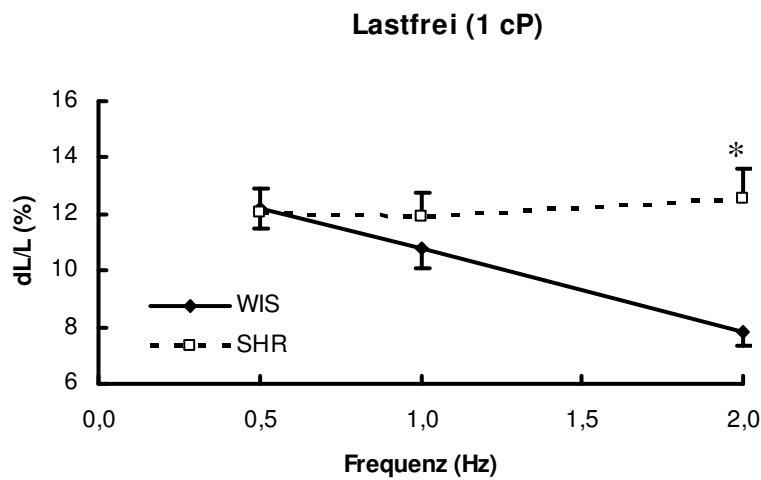
**Abb .4.8.2b: Einfluss der Akt-Kinase auf die Relaxationsgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ) der Herzmuskelzellen unter lastfreien Bedingungen (1 cP), unter Last (400 cP) und nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 20$  Zellen.**

#### **4.9 Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten**

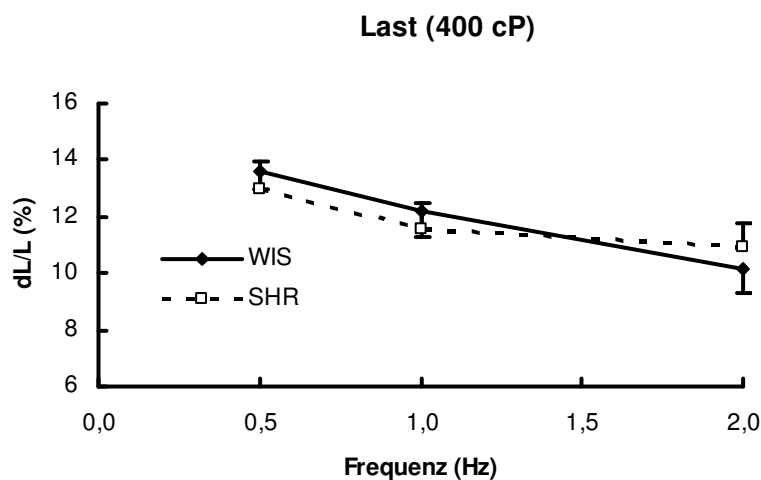
Um das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten (SHR) zu untersuchen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen isoliert und mit den isolierten Herzmuskelzellen männlicher Wistar-Ratten (WIS) verglichen. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation im Frequenzbereich von 0.5 Hz bis 2 Hz in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht nominell weitgehend lastfreien Bedingungen (nominell 1cP) sowie unter externer Last (nominell 400 cP durch Zugabe von Methylcellulose). Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurden deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (dL/L in %), die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Re-Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) gemessen.

Lastfrei (1cP) fiel die relative Zellverkürzung von Herzmuskelzellen der Wistar-Ratten (WIS) mit steigender Frequenz, während bei den spontan hypertensiven Ratten (SHR) die Zellverkürzung annähernd konstant blieb (Abb. 4.9.1a). Unter Lastbedingungen (400 cP) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen, bei beiden sank die Zellverkürzung mit steigender Frequenz (Abb. 4.9.1b).

#### 4.9.1 Zellverkürzung unter lastfreien und Lastbedingung



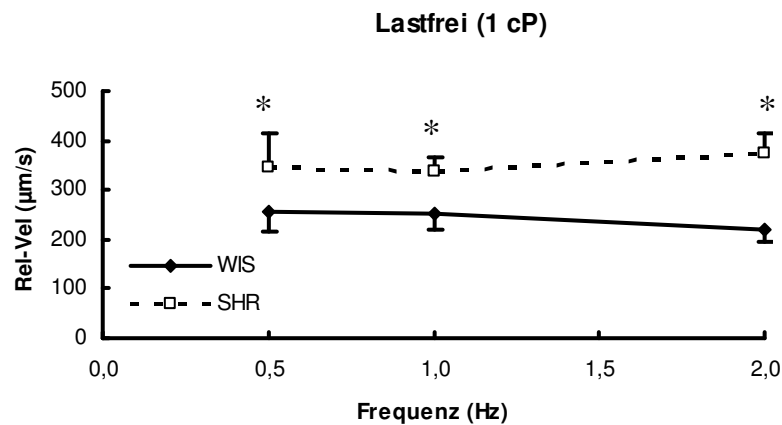
**Abb. 4.9.1a:** Vergleich der relativen Zellverkürzung zwischen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Ratten (WIS) unter lastfreien (1cP) Bedingungen im Frequenzbereich zwischen 0.5 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 24$  Zellen. \* =  $p < 0,05$  vs. WIS.



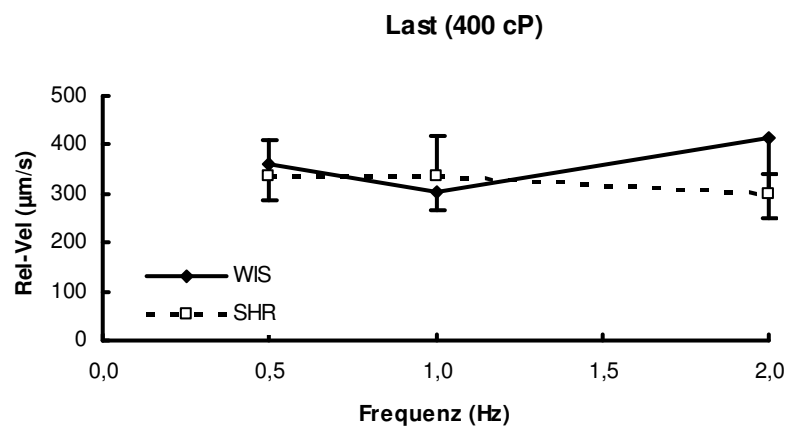
**Abb. 4.9.1b:** Vergleich der relativen Zellverkürzung zwischen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Ratten (WIS) unter Lastbedingungen (400 cP) im Frequenzbereich zwischen 0.5 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 24$  Zellen.

## 4.9.2 Relaxationsgeschwindigkeit

Die Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten (SHR) ist unter lastfreien Bedingungen im gesamten Frequenzbereich größer als die Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen aus Wistar-Ratten (WIS) (Abb. 4.9.2a). Unter Lastbedingungen (400 cP) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen (Abb. 4.9.2b). Eine Frequenzabhängigkeit ist in beiden Fällen nicht signifikant nachweisbar.



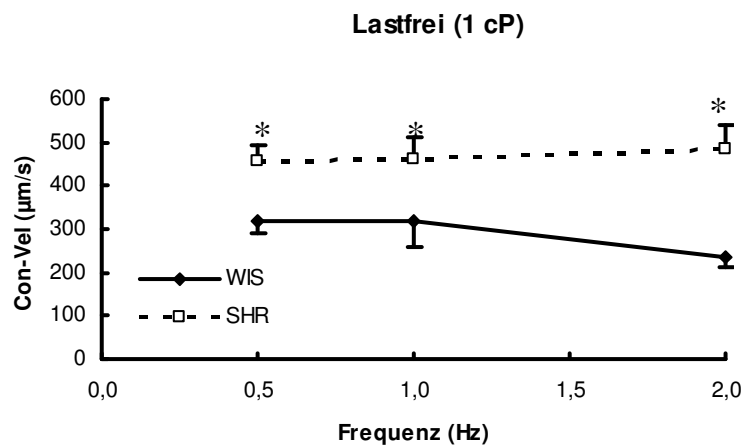
**Abb. 4.9.2a:** Vergleich der Relaxationsgeschwindigkeit zwischen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Ratten (WIS) unter lastfreien (1cP) Bedingungen im Frequenzbereich zwischen 0.5 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 24$  Zellen. \* =  $p < 0,05$  vs. WIS.



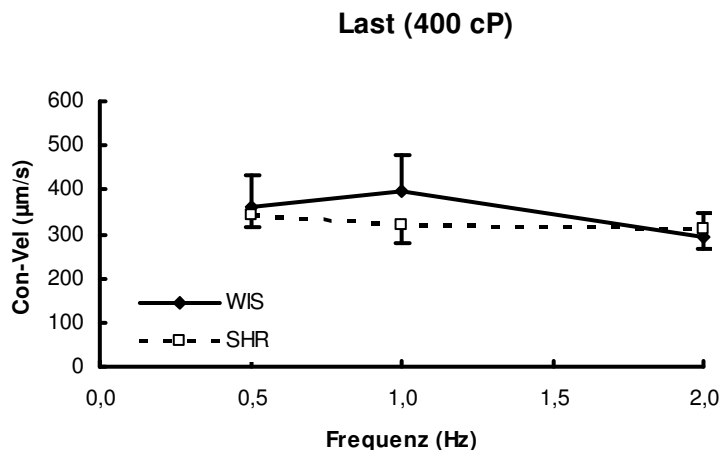
**Abb. 4.9.2b:** Vergleich der Relaxationsgeschwindigkeit zwischen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Ratten (WIS) unter Lastbedingungen (400 cP) im Frequenzbereich zwischen 0.5 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 24$  Zellen.

### 4.9.3 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten (SHR) ist unter lastfreien Bedingungen im gesamten Frequenzbereich signifikant größer als die Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen aus Wistar-Ratten (WIS) (Abb. 4.9.3a). Unter Lastbedingungen (400 cP) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen (Abb. 4.9.3b).



**Abb. 4.9.3a: Vergleich der Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Ratten (WIS) unter lastfreien (1cP) Bedingungen im Frequenzbereich zwischen 0.5 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 24 Zellen. \* = p < 0,05 vs. WIS.**



**Abb. 4.9.3b: Vergleich der Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Ratten (WIS) unter Lastbedingungen (400cP) im Frequenzbereich zwischen 0.5 und 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 24 Zellen.**

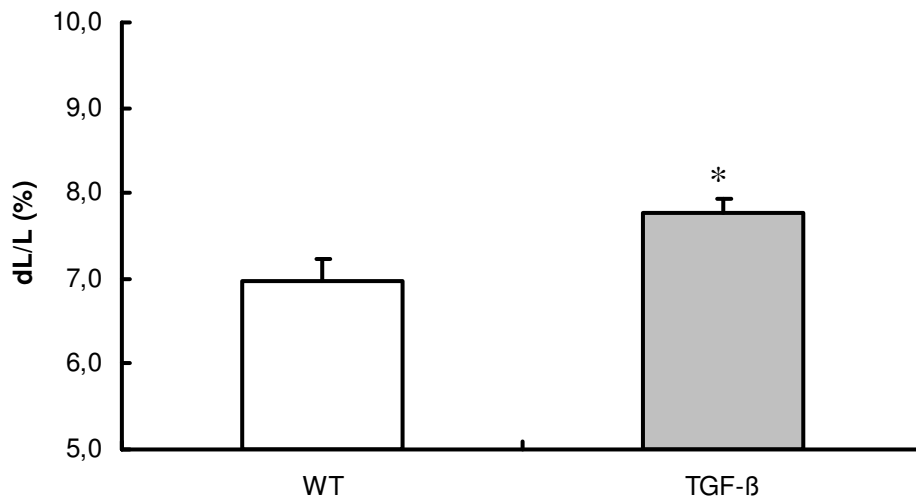
---

#### **4.10 Charakterisierung des Kontraktionsverhaltens isolierter Herzmuskelzellen aus transgenen TGF- $\beta$ überexprimierenden Mäusen und ihren nicht transgenen Geschwistern**

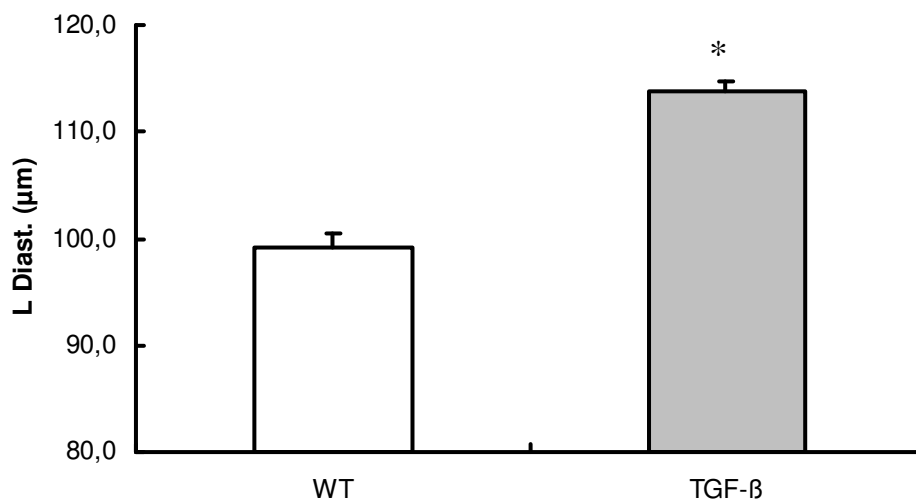
Ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden aus transgenen TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen (TGF- $\beta$ ) und ihren nicht transgenen Geschwistern (Wildtyp, WT) isoliert. Die Zellen wurden bei 5 Hz elektrisch stimuliert und das Kontraktionsvermögen der Zellen wurde unter Basalbedingungen und nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l) gemessen.

TGF- $\beta$  überexprimierende Herzmuskelzellen haben eine signifikant stärkere Zellverkürzung unter elektrischer Stimulation als ihre nicht transgenen Geschwister (Abb. 4.10.1a). Sie haben auch eine größere Zelllänge (Abb. 4.10.1b) und eine höhere Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 4.10.1c) als ihre nicht transgenen Geschwister (WT). Die Relaxationsgeschwindigkeit ist bei den TGF- $\beta$  Mäusen signifikant niedriger (Abb. 4.10.1d).

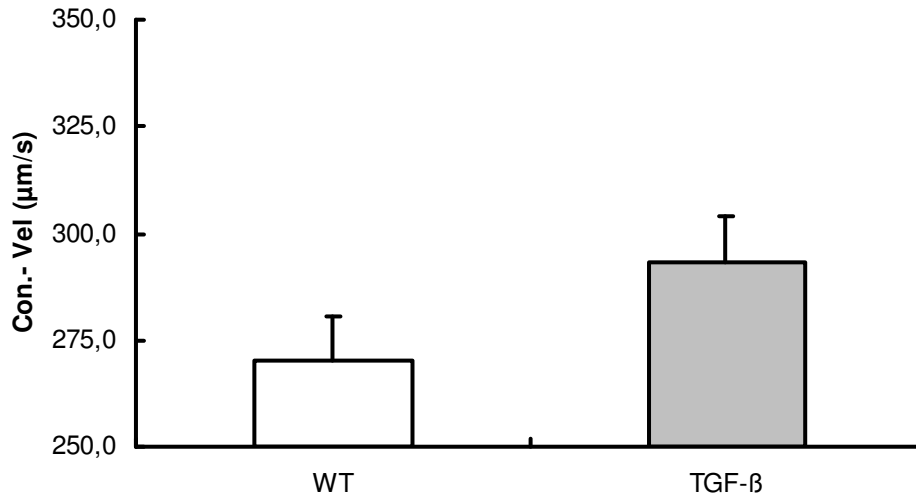
#### 4.10.1 Kontraktionsverhalten und Zelllänge



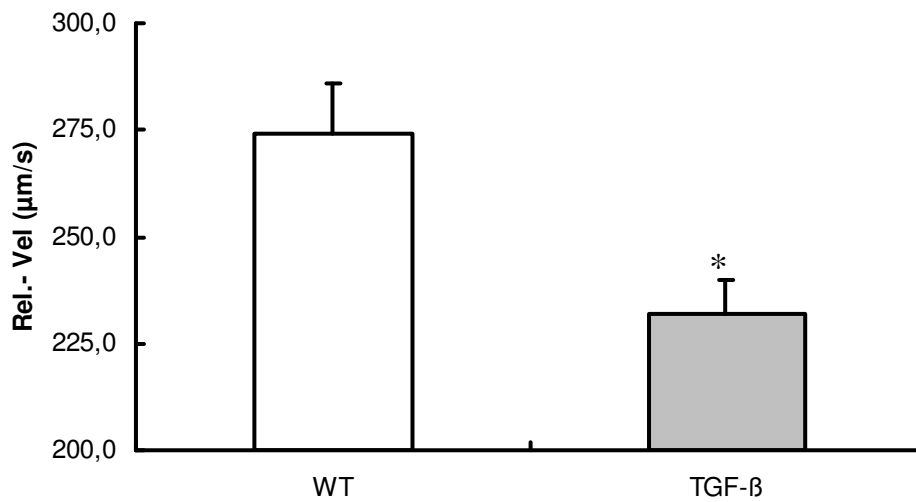
**Abb. 4.10.1a:** Vergleich der relativen Zellverkürzung TGF- $\beta$  überexprimierender Mäuse (TGF- $\beta$ ) und ihrer nicht transgenen Geschwister (WT) bei 5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 26$  Zellen  $*$  =  $p < 0,05$  vs. WT.



**Abb. 4.10.1b:** Vergleich der diastolischen Zelllänge ( $\mu\text{m}$ ) TGF- $\beta$  überexprimierender Mäuse (TGF- $\beta$ ) und ihrer nicht transgenen Geschwister (WT). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 26$  Zellen.  $*$  =  $p < 0,05$  vs. WT.



**Abb. 4.10.1c:** Vergleich der Kontraktionsgeschwindigkeit TGF- $\beta$  überexprimierender Mäuse (TGF- $\beta$ ) und ihrer nicht transgenen Geschwister (WT) bei 5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 26$  Zellen.

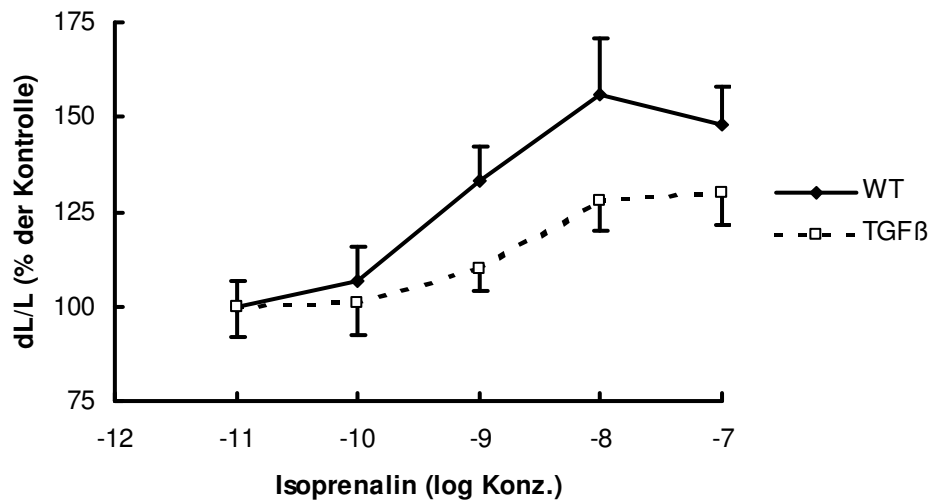


**Abb. 4.10.1d:** Vergleich der Relaxationsgeschwindigkeit TGF- $\beta$  überexprimierender Mäuse (TGF- $\beta$ ) und ihrer nicht transgenen Geschwister (WT) bei 5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus  $n = 26$  Zellen. \* =  $p < 0,05$  vs. WT.



#### 4.10.2 $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit

Mit steigender Isoprenalin-Konzentration steigt die relative Zellverkürzung TGF- $\beta$  überexprimierender Herzmuskelzellen und ihrer nicht transgenen Geschwister. Bei gleicher Konzentration ist die Ansprechbarkeit der nicht transgenen Herzmuskelzellen (WT) jedoch größer (Abb.4.10.2).

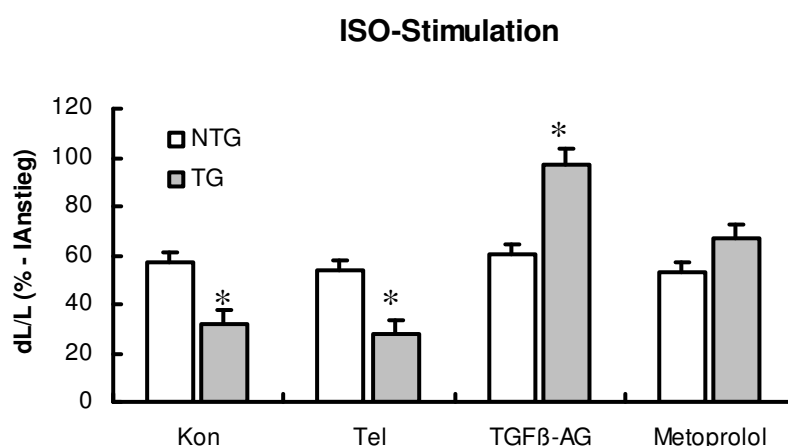


**Abb. 4.10.2:** Abhängigkeit der relativen Zellverkürzung TGF- $\beta$  überexprimierender Mäuse (TGF- $\beta$ ) und ihrer nicht transgenen Geschwister (WT) von der Isoprenalin-Konzentration. bei 5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 16 Zellen.

#### 4.10.3 Veränderung der $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit nach Behandlung mit Telmisartan, einem TGF- $\beta$ Antagonisten oder Metoprolol

Untersuchungen an transgenen TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen und ihren nicht transgenen Geschwistern, die entweder unbehandelt blieben oder einen TGF- $\beta$ -Antagonisten (soluble TGF- $\beta$ R-Fc s.c.), einen  $\beta$ -Blocker (Metoprolol) oder einen Angiotensin AT1-Rezeptorblocker (Telmisartan) oral über das Trinkwasser bekamen (5 Wochen Behandlung, n=6 je Gruppe), wurden durchgeführt. Im Alter von 8 Wochen wurden aus den Tieren ventrikuläre Herzmuskelzellen isoliert. Die Zellen wurden bei 5 Hz elektrisch stimuliert und das Kontraktionsvermögen der Zellen wurde unter Basalbedingungen und nach Zugabe von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l) gemessen.

Bei den nicht transgenen Geschwistern (NTG) gab es keine signifikanten Unterschiede in der Zellverkürzung nach Behandlung mit Telmisartan, einem TGF- $\beta$  Antagonisten oder mit Metoprolol. Bei den TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen (TG), die mit Telmisartan behandelt wurden, betrug die Zellverkürzung 27,9 %. Bei TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen die keine Behandlung bekommen hatten, betrug die Zellverkürzung 31,6 %. TGF- $\beta$  überexprimierende Mäuse, die eine Behandlung mit einem TGF- $\beta$  Antagonisten bekommen hatten, zeigten eine Veränderung der  $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit, bei ihnen betrug die Zellverkürzung 97,5 %. Auch die Behandlung mit Metoprolol steigerte die  $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit von TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen.



**Abb. 4.10.2: Vergleich der relativen Zellverkürzung TGF- $\beta$  überexprimierender Mäuse (TGF- $\beta$ ) und ihrer nicht transgenen Geschwister (WT) nach Behandlung mit Telmisartan, einem TGF- $\beta$  Antagonisten und mit Metoprolol, in Gegenwart von Isoprenalin bei 5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus n = 48 Zellen. \* = p < 0,05 vs. NTG.**

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Relevanz des Modells im Hinblick auf die Fragestellung

Die vorliegende Studie verfolgte das Ziel, auf zellulärer Ebene die Kausalverknüpfung von Hypertrophie und kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen zu untersuchen.

Die Myokardhypertrophie ist ein primär kompensatorisches Dickenwachstum von Herzmuskelzellen aus der sich heraus sich eine kontraktile Dysfunktion auf zellulärer Ebene entwickelt. Um die komplexen systemischen und hämodynamischen Interaktionen zu umgehen, wurde die Signaltransduktion und die kontraktile Funktion der adrenerg vermittelten myokardialen Hypertrophie anhand eines Zellkulturmodells isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten untersucht. In den verwendeten Kulturen waren die isolierten Kardiomyozyten von definierten Kulturmedien und Wirkstoff-Konzentrationen umgeben und durch elektrische Stimulation mechanisch aktiv. Der Einfluss der verwendeten Agentien auf die untersuchten Hypertrophie-relevanten Parameter konnte deshalb unabhängig von anderen humoralen Einflüssen untersucht werden. Hypertrophie-relevante Parameter, die in adulten Kardiomyozyten gefunden werden (Bell et al., 1995), entsprechen quantitativ den aus Biopsien des hypertrophierten Herzen bekannten Daten (Del Monte et al., 1995). Die Myokardhypertrophie ist klinisch vor allem im Erwachsenenalter relevant.

Aus den oben genannten Gründen stellt daher die Verwendung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Tiere ein sinnvolles Zellkulturmodell für Untersuchungen zur Signaltransduktion und kontraktile Funktion der adrenerg vermittelten Myokardzellhypertrophie dar.

## 5.2 Kontraktile Dysfunktion nach $\alpha$ -adrenerger Hypertrophiestimulation

Stimulation  $\alpha_{1A}$ -adrenerger Rezeptoren steigert die Proteinsynthese und die Myozytenquerschnittsfläche und verändert die Expression myokardialer Proteine. Phenylephrin hat eine starke hypertrophe Wirkung auf die Herzmuskelzelle. Es steigert die Proteinsynthese durch Aktivierung der Proteinkinase C und des PI 3-Kinase/Akt-Signalweges. Daneben kommt es durch eine Stimulation mitogen aktivierter Kinasen (p42-MAP Kinase) zu phänotypischen Veränderungen. In dieser Studie wurde untersucht, ob diese Veränderungen Einfluss auf die Funktion haben. Adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte wurden mit dem  $\alpha$ -adrenergen Rezeptor Agonisten Phenylephrin chronisch (24 h) stimuliert und untersucht, ob die hypertrophierten Herzmuskelzellen eine funktionelle Beeinträchtigung zeigen. Zum Vergleich wurden Zellkulturen aus den selben Tieren nach akuter Stimulation untersucht.

Unter Basalbedingungen (2 Hz, 1 mmol/l extrazelluläres Calcium, Viskosität 1 cp) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen hypertrophierten und nicht hypertrophierten Zellen. Stimulation unter unphysiologisch niedriger Frequenz (0,5 Hz) ergab für die hypertrophierten Zellen um eine verminderte Zellverkürzung, die durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentrationen kompensiert werden konnte. Eine signifikante kontraktile Dysfunktion der hypertrophierten Herzmuskelzellen wurde sichtbar, wenn durch Erhöhung der Medienviskosität die externe Last erhöht wurde. Bei physiologischen Frequenzen wurde dieser Funktionsdefekt teilweise kompensiert. Eine akute Phenylephrin-Exposition führte in physiologischen und unphysiologischen Frequenzen, zu einer verbesserten kontraktilen und diastolischen Funktion (Abb. 5.2.1).

Eine selektive zelluläre Stimulation der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren führte zu einer Verbesserung der Relaxationseigenschaften, was mit einer Heraufregulation des Calciums (Schreckenberget al., 2003) einhergeht. Dies verbessert die Möglichkeiten der Herzmuskelzellen auf eine Nachlasterhöhung adäquat zu reagieren.

Die selektive Hemmung der PKC und damit der Proteinsynthese (Anwar et al., 2005) über den oben genannten Signaltransduktionsweg zeigte, dass bei erhöhter Last (400 cp) und Frequenz (2 Hz) die diastolische Dysfunktion zunimmt während eine spezifische Hemmung der PI3-Kinase und der p42 MAP-Kinase keinen Einfluss hatte.

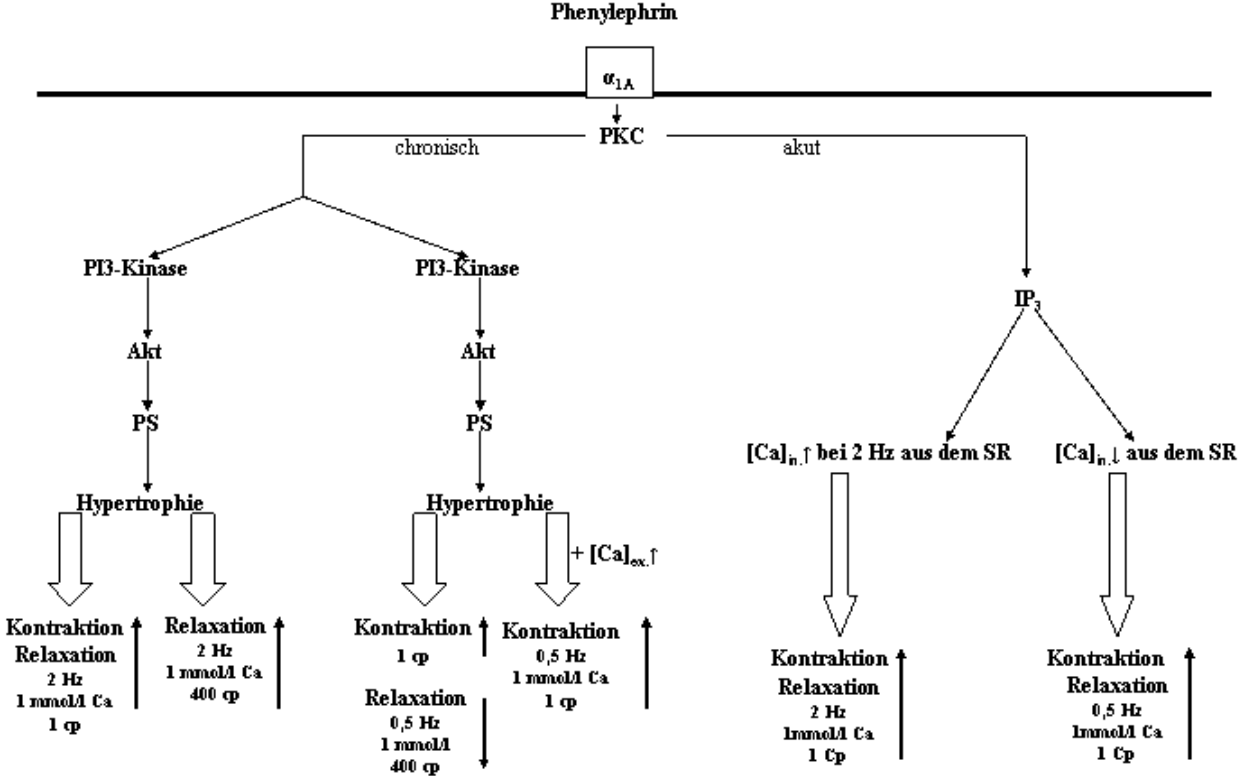


Abb. 5.2.1: Einfluss einer chronischen und akuten Phenylephrinexposition auf die relative Zellverkürzung und auf die relative Relaxationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Last, Calciumkonzentration und Frequenz.

### 5.3 Einfluss phänotypischer Veränderungen auf die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen

Die Übertragbarkeit der Befunde in 5.2 wurde auf Herzmuskelzellen aus hypertrophen Herzen übertragen. Hierzu wurden drei verschiedene Modelle verwendet. Zunächst wurden Herzmuskelzellen aus transgenen Mäusen isoliert, die eine myokardiale Expression einer konstitutiv aktivierten Akt besitzen. Dieses Modell entspricht einer Hypertrophie ohne erkennbaren phänotypischen Veränderungen, die durch MAP-Kinasen induziert werden. Als zweites wurden Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten isoliert. Diese Tiere zeigen in vivo eine druckinduzierte Myokardhypertrophie, wahrscheinlich basierend auf einer Aktivierung sowohl des sympathischen Nervensystems als auch des Renin-Angiotensin-Systems. Phänotypische Veränderungen sind hier wahrscheinlich. Die Wirkung natürlicher Katalcholamine unterscheidet sich wesentlich von der Wirkung einer selektiven Stimulation der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren. Dies ist in der Wechselwirkung der gleichzeitig stimulierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren begründet. Daher wurde der Einfluss chronischer Exposition von Phenylephrin auf die maximale beta-adrenerge induzierbare Konzentrationsfähigkeit mittels Isoprenalin auf Herzmuskelzellen überprüft.

Die Ergebnisse zeigen, dass die chronische Phenylephrin-Exposition zu einem Verlust der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit führt und dass dieser Verlust nicht durch eine Frequenzsteigerung ausgeglichen werden kann. Die  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit durch Isoprenalin, führt bei Herzmuskelzellen aus Akt-Kinase exprimierenden Mäusen zu einem Funktionsausgleich, dieser wird durch schnellere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit vermittelt.

Phänotypische Veränderungen bei Herzmuskelzellen, wie sie bei spontan hypertensiven Ratten zu erwarten sind, zeigen einen Funktionsverlust unter Last. Dieser Funktionsverlust wird nicht durch schnellere Relaxations- und Kontraktionsgeschwindigkeit ausgeglichen. Die Zellverkürzung ist bei diesen Herzmuskelzellen frequenzunabhängig.

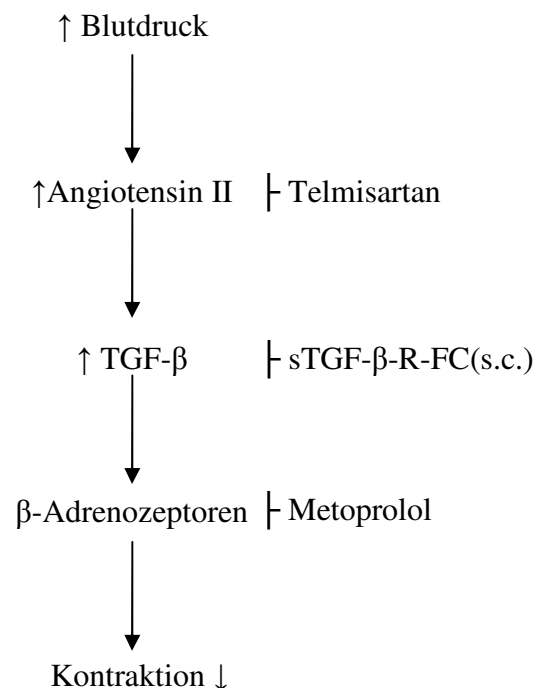
## 5.4 Kontraktionsverhalten und $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit isolierter Herzmuskelzellen aus transgenen TGF- $\beta$ überexprimierenden Mäusen und ihren nicht transgenen Geschwistern

TGF- $\beta$  ist ein Zytokin, dessen myokardiale Expression durch Angiotensin vermittelt wird (Wenzel et al., 2001) und das beim Übergang einer druckinduzierten Myokardhypertrophie zur Herzinsuffizienz kausal beteiligt zu sein scheint (Villarreal et al.; 1992). Es bewirkt an adulten ventrikulären Herzmuskelzellen Veränderungen in der postrezeptoriellen Signaltransduktion  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren (Schlüter et al., 2000). Es ist nicht bekannt, ob dies auch die Regulation der Zellkontraktion bei Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren beeinträchtigt. Transgene TGF- $\beta$  überexprimierende Mäuse sind ein geeignetes Modell um die Beziehung zwischen TGF- $\beta$  –abhängig erzielten Veränderungen in der Signalkaskade von solcher zu unterscheiden, die durch Hypertension oder Angiotensin II direkt vermittelt werden (Rosenkranz et al., 2002).

Es wurde überprüft, ob Herzmuskelzellen aus transgenen TGF- $\beta$  –überexprimierenden Mäusen im Hinblick auf die Zellkontraktion eine veränderte Ansprechbarkeit auf  $\beta$ -adrenerge Rezeptorstimulation zeigen und ob dies durch Antagonisten gegen Angiotensinrezeptoren, TGF- $\beta$  oder  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren korrigiert werden kann.

### Hintergrund

**Abb. 5.4.1: Arbeitshypothese zur verminderten Funktionskopplung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren als Folge chronischer Hypertonie. In der hier vorgestellten Studie wird die Hypothese überprüft anhand von transgenen TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen, die mit den  $\top$  gekennzeichneten Antagonisten behandelt wurden.**



Herzmuskelzellen aus transgenen TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäusen zeigen kein basales Funktionsdefizit aber eine verminderte Ansprechbarkeit auf  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren. Eine Blockade der AT-Rezeptoren beeinflusst in diesen Tieren nicht das Kontraktionsverhalten. Hemmung des endogenen TGF- $\beta$  durch einen neutralisierenden Antikörper konvertiert die verminderte Ansprechbarkeit. Hemmung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren hebt die TGF- $\beta$  – induzierte Funktionsveränderung wieder auf.

## **5.5 Schlussfolgerung**

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Bedeutung von TGF- $\beta$  für die verminderte inotrope Ansprechbarkeit  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren im Rahmen einer druckinduzierten Myokardhypertrophie. Sie zeigen, dass die Gabe von  $\beta$ -Blockern TGF- $\beta$  –induzierte funktionelle Veränderungen auf zellulärer Ebene korrigieren kann. Die hypertrophierten Herzmuskelzellen zeigen eine verbesserte Relaxation. Trotz verbesserter Relaxation zeigen Herzmuskelzellen mit massiver Zunahme von Proteinsynthese und Zellvolumen Anzeichen einer Dysfunktion.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde auf zellulärer Ebene die Kausalverknüpfung von Hypertrophie und Kontraktion belegt. Dazu wurden in einem ersten experimentellen Modell adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen aus der Ratte isoliert und für 24 h mit Phenylephrin inkubiert. Phenylephrin hat eine starke hypertrophe Wirkung auf Herzmuskelzellen. Es steigert die Proteinsynthese durch Aktivierung der Proteinkinase C und des PI 3-Kinase/Akt-Signalweges. Daneben kommt es durch Stimulation mitogen aktivierter Kinasen (p42-MAP) zu phänotypischen Veränderungen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer chronischen Stimulation  $\alpha$ -adrenerger Rezeptoren auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte und der Beitrag der oben genannten Signaltransduktionswege durch spezifische pharmakologische Hemmung untersucht. Eine signifikante kontraktile Dysfunktion der hypertrophierten Herzmuskelzellen wurde sichtbar, obwohl diese eine erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit zeigen.

Die Übertragbarkeit dieser Befunde auf Herzmuskelzellen aus hypertrophierten Herzen wurde nachfolgend analysiert. Dazu wurden drei verschiedene Modelle verwendet. Zunächst wurden Herzmuskelzellen aus transgenen Mäusen isoliert, die eine myokardiale Expression einer konstitutiv aktivierten Akt besitzen. Dieses Modell entspricht einer Hypertrophie ohne erkennbare phänotypischen Veränderungen, wie sie durch MAP-Kinasen induziert werden. Als zweites wurden Kardiomyozyten aus spontan hypertensiven Ratten isoliert. Diese Tiere zeigen in vivo eine druckinduzierte Myokardhypertrophie, wahrscheinlich basierend auf einer Aktivierung sowohl des sympathischen Nervensystems als auch des Renin-Angiotensin-Systems. Phänotypische Veränderungen sind hier wahrscheinlich. Diese Herzmuskelzellen zeigten eine kontraktile Dysfunktion, welche nicht durch schnellere Relaxations- und Kontraktionsgeschwindigkeit ausgeglichen werden konnte, während bei den Akt exprimierenden Herzmuskelzellen ein Funktionsausgleich stattfand.

Als drittes wurden Kardiomyozyten aus transgenen Mäusen isoliert, welche TGF- $\beta$  überexprimieren. Diese Tiere haben eine moderate Myokardhypertrophie aber keine Druckbelastung. TGF- $\beta$  wird dabei als Endpunkt einer Angiotensin II –Wirkung verstanden, welche anschließend durch eine veränderte Ankopplung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren zu einer Myokardhypertrophie beiträgt. In dem hier verwendeten Modell konnte dieser Teil der postulierten Kausalkette (Angiotensin II – TGF- $\beta$  –  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren) von den

Eigeneffekten des Angiotensin II entkoppelt werden. Dies wurde im weiteren belegt durch eine Anzahl an Experimenten, in denen auf jeder der drei Ebenen der Kausalkette in den transgenen Tieren eingegriffen wurde. Deshalb wurden die TGF- $\beta$  überexprimierenden Mäuse mit Telmisartan (einem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten), TGF- $\beta$ -Antikörper und  $\beta$ -Blockern behandelt und nachfolgend auf ihre  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit untersucht. Die Untersuchungen belegen die Bedeutung von TGF- $\beta$  für die verminderte Ansprechbarkeit  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren im Rahmen einer druckinduzierten Myokardhypertrophie. Sie zeigen erstmals, dass die Gabe von  $\beta$ -Blockern TGF- $\beta$  induzierte funktionelle Veränderungen auf zellulärer Ebene korrigieren kann.

## 7 Summary

The following paper demonstrates the causal link between hypertrophy and contraction at the cellular level. In a first experimental model, adult ventricular rat cardiac muscle cells were isolated, and incubated for 24 hours with phenylephrine. Phenylephrine has a strong hypertrophic effect on cardiac muscle cells. It increases the rate of protein synthesis by activating protein kinase C and the PI 3 kinase / Akt signaling pathway. In addition, it causes phenotypic changes through stimulation of mitogen-activated kinases (p42 MAP). This paper examines the effect of chronic stimulation of  $\alpha$ -adrenergic receptors on the contractile behaviour of adult rat cardiac muscle cells and examines the contribution made by the above signal transduction pathway through the use of specific pharmacological inhibition. Significant contractile dysfunction of the hypertrophied cardiac muscle cells was observed, although the cells exhibited an increased relaxation speed.

The transferability of these findings to cardiac muscle cells from hypertrophied hearts was then analysed using three different models. Firstly, cardiac muscle cells from transgenic mice expressing constitutively active Akt kinase in the myocardium were isolated. This model is equivalent to hypertrophy without the recognisable phenotypic changes induced by MAP kinases. Secondly, cardiomyocytes from spontaneously hypertensive rats were isolated. These animals *in vivo* show pressure induced myocardial hypertrophy, probably as a result of the activation of both the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system. Phenotypic changes are likely. These cardiac muscle cells exhibit contractile dysfunction, which cannot be compensated for by more rapid relaxation and contraction speeds, whereas in the Akt expressing cardiac muscle cells functional compensation had taken place.

Thirdly, cardiomyocytes from transgenic mice overexpressing TGF- $\beta$  were isolated. These mice have a moderate myocardial hypertrophy, but no raised pressure load. TGF- $\beta$  is assumed to be the end point of an angiotensin II effect, which then contributes to myocardial hypertrophy as a result of altered  $\beta$ -adrenergic receptor coupling. In the model used here, it is possible to decouple this part of the postulated chain of cause and effect (angiotensin II – TGF- $\beta$  –  $\beta$ -adrenergic receptors) from the individual effect of angiotensin II. This was further demonstrated by a series of experiments which interfered at each of the three stages of the chain of cause and effect in the transgenic animals. The TGF- $\beta$  overexpressing mice were treated with Telmisartan (an ATI receptor antagonist), TGF- $\beta$  antibodies and  $\beta$ -blockers and

subsequently examined for their  $\beta$ -adrenergic responsiveness. These experiments demonstrate the significance of TGF- $\beta$  in reduced responsiveness of  $\beta$ -adrenergic receptors in pressure induced myocardial hypertrophy. They show, for the first time, that the administration of  $\beta$ -blockers can correct TGF- $\beta$  induced functional changes at the cellular level.

---

## 8. Literaturverzeichnis

- Bell, D., Schlüter K-D., Zhou, X.J., McDermott, B.J., Piper, H.M., (1995)  
Hypertrophic effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin on adult mammalian ventricular cardiomyocytes.  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 2433-2443
- Boluyt, M.O., O`Neil, L., Meredith, A.L., Bing, O.H., Brooks, W.W., Conrad, C.H., Crow M.T., Lakatta EG (1994)  
*J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**, 741-754
- Buxton, I.L., Brunton, L.L, (1985)  
Action of the cardiac alpha 1-adrenergic receptor. Activation of cyclic AMP degradation.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 6733-6737
- Carr, A.A., Prisant, L.M. (1986)  
Losartan: first of a new class of angiotensin antagonists for the management of hypertension.  
*J. Clin. Pharmacol.* **36**, 3-12
- Del Monte, F.P., O`Gara, P., Poole-Wilson, P.A., Yacoub, M. Harding S.E., (1995)  
Cell geometry and contractile abnormalities of myocytes from failing human left ventricle  
*Cardiovasc. Res.* **30**, 281-290
- Lee, Y.A., and Lindpaintner K. (1993)  
Role of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive cardiac hypertrophy.  
*Eur. Heart J.* **14** (Suppl.J.), 42-48
- Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B., Castelli, W.P. (1990)  
Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.  
*N. Engl. J. Med.* **322**, 1561-1566

Linzbach A.J. (1947)

Mikrometrische und histologische Analyse hypertropher menschlicher Herzen.

Virchow Arch. **314**, 534

Morgan H.E., Baker K.M. (1991)

Cardiac hypertrophy: Mechanical, neural and endocrine dependence.

Circulation **83**, 13-25

Moriguchi, Y., Matsubara, H., Mori, Y., Murasawa, S., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Nakajima, T., Oda, K., Iwasaka, T. (1999)

Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms.

Circ. Res. **84**, 1073-1084

Pönicke, K., Schlüter, K-D., Heinroth-Hoffmann, I., Seyfarth, T., Goldberg, M., Osten, B., Piper, H.M., Brode, O-E. (2001)

Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes. Involvement of only  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors.

Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. **364**, 444-453

Rosenkranz, S., Flesch, M., Amann, K., Hauseler, C., Kilter, H., Seeland, U., Schlüter K-D., Böhm, M. (2002)

Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpression TGF-beta(1).

Am J Physiol, Heart Circ Physiol **238**, 1253-1262

Schäfer, M., Pönicke, K., Heinroth-Hoffmann, I., Brodde, O-E., Piper, H.M., Schlüter, K-D. (2001)

$\beta$ -adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes.

J. Am. Cell. Cardiol. **37**, 300-307

Schlüter, K-D., Piper, H.M. (1992)

Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes.

Am. J. Physiol. **263**, H1739-H1746

Schlüter, K-D., Zhou, X.J., Piper, H.M. (1995)

Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes.

Am. J. Physiol. **269**, C1311-C1316

Schlüter, K-D., Simm, A., Schafer, M., Taimor, G., Piper, H.M. (1996)

Early response kinase and PI 3-kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy.

Am. J. Physiol. **276**, H1655-H1663

Schlüter, K-D., Frischkopf, K., Flesch, M., Rosenkranz, S., Taimor, G., Piper, H.M. (2000)

Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy.

Cardiovasc. Res. **45**, 410-417

Shoi, T., McMullen, J.R., Kang, P.M., Douglas, P.S., Obata, T., Franke, T.F., Cantley, L.C., Izumo, S. (2002)

Akt/Protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice.

Mol. Cell. Biol. **22**, 2799-2809

Simpson, P.C. (1985)

Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an  $\alpha_1$ -adrenergic receptor and induction of beating through  $\alpha_1$ - and  $\beta_1$ -adrenergic receptor interaction: evidence for independent regulation of growth and beating.

Circ. Res. **56**, 884-894

Villareal, F.K., Dillmann, W.H. (1992)

Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin and collagen.

Am. J. Physiol. **262**, H1861-H1866

Wada, H., Zile, M.R., Ivester, C.T., Cooper, G., McDermott, P.J. (1996)

Comparative effect of contraction and angiotensin II on growth of adult feline cardiomyocytes in primary culture.

Am. J. Physiol. **271**, H29-H37

Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H.M., Schlüter, K-D., (2001) Redox sensitive intermediates mediate angiotensin-II-induced p38-MAP kinase activation, AP-1 binding activity and TGF- $\beta$  expression in adult ventricular cardiomyocytes

FASEB J. **15**, 2291-2293

Zhou, X.J., Schlüter, K-D., Piper, H.M. (1996)

Hypertrophic responsiveness to  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes.

Moll. Cell. Biochem. **164**, 211-216



Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht, weitere Arbeiten sind in Vorbereitung.

Attiwa, A., Taimor, G., **Korkusuz, H.**, Schreckenberger, R., Berndt, T., Abdallah, Y., Piper, H.M., Schluter, K-D. (2005)

PKC-independent signal transduction pathways increase SERCA2 expression in adult rat cardiomyocytes

J. Mol. Cell. Card. **39** (6), 911-9.

Postervorträge

<sup>1</sup>**H.Korkusuz**, <sup>2</sup>S. Rosenberg, <sup>1</sup>K.-D. Schlüter

$\beta$ -Blocker normalisieren in vivo eine TGF- $\beta$  vermittelte Beeinträchtigung der maximalen Zellkontraktion adulter Herzmuskelzellen

<sup>1</sup>Physiologisches Institut Giessen; <sup>2</sup>Klinik für Innere Medizin, Köln

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung/24.-26. April 2003

Mannheim

R.Schreckenberger,S.Wenzel, **H.Korkusuz**, C.Schäfer, K.-D. Schlüter

$\alpha$ -Adrenerg vermittelte Steigerung der SERCA Expression in adulten ventrikulären Herzmuskelzellen: Signaltransduktion und funktionelle Relevanz

Physiologisches Institut Giessen

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung/24.-26. April 2003

Mannheim

## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. H.-M. Piper, Leiter des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Giessen, Fachbereich Humanmedizin danke ich für die Bereitstellung des Themas.

Sehr herzlich möchte ich Prof. Dr. K.-D. Schlüter danken, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und durch außerordentliche Geduld und stete Freundlichkeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Desweiteren danke ich den Medizinisch-Technischen Assistenten Daniela Schreiber, Iris Schumacher, Dagmar Felde und Sergei Ketcher für die guten Arbeitsbedingungen im Labor.

Allen weiteren Mitarbeitern, den Mitdoktoranden danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima.

Zu guter letzt einen herzlichen Dank an meine Eltern und meinen Brüdern, die mir ein großer Rückhalt waren und sind.

---

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Korkusuz Hüdayi  
Wohnort: Wilhelmstr.35  
57518 Betzdorf  
Geburtsdatum/-ort: 10. Februar 1976 in Kirchen/Sieg  
Familienstand: verheiratet  
Nationalität: türkisch

### Schulischer Werdegang

1982-1986 Martin-Luther-Grundschule in Betzdorf  
1986-1993 Bertha-von-Suttner-Realschule in Betzdorf  
1993-1997 Freiherr-von-Stein Gymnasium in Betzdorf

### Studium

10.1998–09.2004 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen

### Beruflicher Werdegang

02.2005-08.2005 Assistenzarzt an der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Universität Düsseldorf bei Prof. Strauer  
09.2005-08-2006 Assistenzarzt an der Klinik für Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin der Universität des Saarlandes bei Prof. Böhm  
seit 09.2006 Assistenzarzt am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt bei Prof. Vogl

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.

Hüdayi Korkusuz