

**Einfluß von NO/cGMP-abhängiger Induktion des
pro-apoptischen Signaltransduktionsweges auf das
Kontraktionsverhalten ventrikulärer
Herzmuskelzellen**

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

vorgelegt von

Hakan Tastan

aus Flensburg

Gießen, 2006

Aus dem Institut für Physiologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. H.-M. Piper

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: PD Dr. Reiss

Tag der Disputation: 14.12.2006

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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 wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Definition und Pathogenese der Herzinsuffizienz	1
1.2.	Arten des Zelltodes: Apoptose und Nekrose	2
1.3.	Apoptose: Charakteristika und Signalkaskaden	3
1.4.	Rolle der Apoptose in Ischämie und Reperfusion	6
1.5.	Stickstoffmonoxid (NO) als Apoptose-Induktor	7
1.6.	Wirkung von Apoptose auf die kardiale Funktion	8
1.7.	Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen	9
1.8.	Methodische Voraussetzungen	10
2.	Material	11
2.1.	Chemikalien	11
2.2.	Medien	12
2.3.	Puffer	13
2.4.	Geräte und Laborbedarf	14
2.4.1.	Zellpräparation und Zellkultur	14
2.4.2.	System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion	14
2.4.3.	Sonstige Geräte	14
2.4.4.	Verbrauchsmaterialien	15
2.4.5.	Software	15
3.	Methoden	16
3.1.	Präparation isolierter Herzmuskelzellen und deren Inkubation	16
3.2.	Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld	17

3.2.1.	Probenvorbereitung	17
3.2.2.	Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion	18
3.2.3.	Messung der Kontraktionsparameter	18
3.2.4.	Messprotokoll	21
3.2.5.	Messung der Zelllängen und -breiten	21
3.3.	Statistik	21
4.	Ergebnisse	22
4.1.	Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-Exposition	22
4.2.	Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-Exposition	23
4.3.	Zelllängen und -breiten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-Exposition	25
4.4.	Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender SNAP-Exposition	26
4.5.	Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender NAP-Exposition	27
4.6.	Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender SNAP-Exposition	29
4.7.	Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender NAP-Exposition	30
4.8.	Zelllängen und -breiten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender SNAP- und NAP-Exposition	32
4.9.	Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender YC-1-Exposition	33
4.10.	Einfluss von Last auf isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-, SNAP- und NAP-Exposition	34

5.	Diskussion	36
6.	Zusammenfassung und abschließende Betrachtung	41
7.	Literaturverzeichnis	43
8.	Danksagung	52
9.	Lebenslauf	53

1. Einleitung

1.1. Definition und Pathogenese der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz äußert sich im Unvermögen des Herzens, durch seine Pumparbeit die Homöostase des Körpers aufrechtzuerhalten. Es besteht eine kardiale Dysfunktion mit vermindertem Auswurfvolumen. Es werden akute und chronische Formen unterschieden. Eine akute Linksherzinsuffizienz kann bei einem frischen Herzinfarkt, bei Lungenödem, hypertensiver Krise oder als akute Dekompensation einer bereits bestehenden Herzinsuffizienz auftreten. Die chronische Herzinsuffizienz zeigt einen progredienten Verlauf mit zugrunde liegender meist ausgeprägter myokardialer Schädigung. Sie äußert sich als Veränderung der Kontraktilität, Herzfrequenz, Vorlast oder Nachlast. Koronarinsuffizienz, Herzvitien, Herzrhythmusstörungen und Kardiomyopathien können die Ursache sein. Weiterhin werden systolische und diastolische Ventrikelfunktionsstörungen beschrieben. Systolische Ventrikelfunktionsstörungen finden sich bei Kontraktionsschwäche (dilatative Kardiomyopathie, Myokarditis, koronare Herzkrankheit), bei Volumenbelastung (Shuntvitien, Klappeninsuffizienzen) und bei Druckbelastungen (Klappenstenosen, arterielle und pulmonale Hypertonien). Diastolische Ventrikelfunktionsstörungen sind durch eine behinderte Ventrikelfüllung gekennzeichnet und treten im Rahmen von konstriktiver Perikarditis oder einer restriktiven Kardiomyopathie auf (Goebell et al., 1992).

In der Initiation und Manifestation der Herzinsuffizienz spielt der Zelltod von Kardiomyozyten eine bedeutende Rolle. Infolge der schweren Zellschädigung durch Hypoperfusion des Myokards oder schwerwiegende Überlastung der Kardiomyozyten kommt es zum Untergang der Zellen (Anversa et Kajstura, 1998). Dieser Zelltod ist in vielen Fällen nekrotisch und durch eine irreversible Dysfunktion der Mitochondrien gekennzeichnet, da die Energiereserven ausgeschöpft sind (Ferrari et al., 1998). Neben dem nekrotischen spielt eine weitere Art des Zelluntergangs eine wichtige physiologische Rolle. Dieser Zelltod wird mit dem Begriff Apoptose umschrieben (Kerr et al., 1972) und ist im Gegensatz zur Nekrose genetisch codiert. Apoptose wird daher auch als „programmierter“ Zelltod bezeichnet.

1.2. Arten des Zelltodes: Apoptose und Nekrose

Es gibt beim Untergang von Zellen zwei Arten des Zelltodes, die Apoptose und die Nekrose. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose ist der zeitliche Verlauf des Zelltodes. Die Nekrose läuft spontan ab und kann deswegen nur durch das Abfangen ihrer Auslöser verhindert werden. Die Apoptose ist dagegen ein aktiver, genetisch determinierter Vorgang, der über spezifische Signalkaskaden läuft, so dass man auch noch nach dem Auftreten des Auslösers den weiteren Verlauf der Apoptose stoppen kann. Diese beiden Formen des Zelltodes werden nach morphologischen und biochemischen Kriterien eingeteilt.

Stark schädigende Einflüsse führen bei der Nekrose zu einem spontanen, passiven Sterben der Zelle. Die Zelle schwillt an und es kommt zum Zerreißen der Zellmembran und der Zellorganellen sowie zur Karyolyse. Enzyme werden aus dem Zytosol freigesetzt und die DNA wird unspezifisch abgebaut. Von dem nekrotischen Zelltod sind im Gewebe immer eine Gruppe von Zellen betroffen. Makrophagen werden aktiviert, die die nekrotischen Zellen eliminieren (Wyllie et al., 1980). Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose eher in einzelnen Zellen eines Gewebeverbandes ausgelöst und ruft keine inflammatorischen Prozesse hervor. Bei der Apoptose bleibt die Integrität der Zellmembran und Zellorganellen erhalten. Die Zelle und auch der Zellkern kondensieren. Es kommt zum Abschnüren von Membranvesikeln („apoptotic bodies“), die von benachbarten Zellen phagozytiert werden (Wyllie et al., 1980). Das genetische Programm der Apoptose ist in allen Körperzellen enthalten, seine Aktivierung unterliegt jedoch einer strengen Kontrolle. Diese morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle werden von einer Vielzahl biochemischer Veränderungen begleitet, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

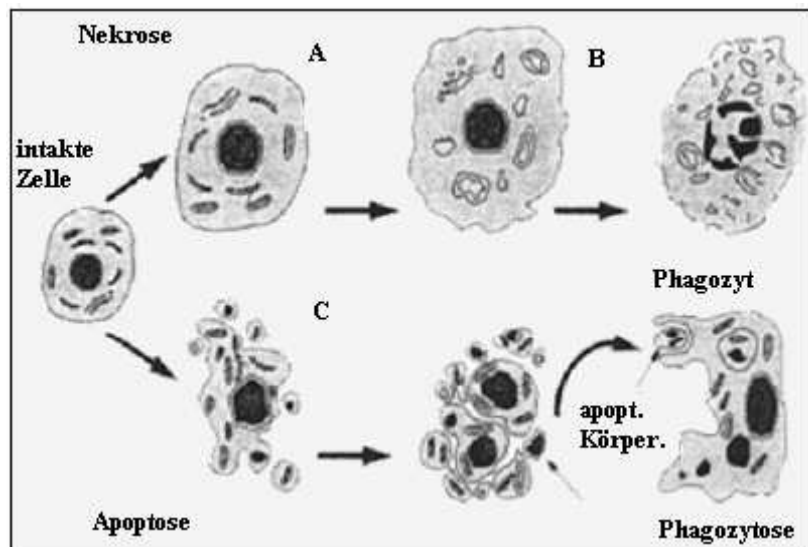


Abb. 1.1. Morphologische Veränderungen bei Nekrose und Apoptose

A: Zellschwellung und Verdickung der Mitochondrien B: Ruptur von Zellorganellen und Plasmazellmembranen, wahllose Fragmentation der DNA C: Schrumpfen der Zelle, Kondensation des Chromatins, Kondensation und Fragmentation des Zellkerns, Entstehung „apoptotic bodies“ (Feuerstein et al., 1997).

1.3. Apoptose: Charakteristika und Signalkaskaden

Die Aktivierung von Apoptose kann exogen über spezifische Rezeptoren induziert werden, wie zum Beispiel über den Fas-Rezeptor oder den TNF-1-Rezeptor. Diese Rezeptoren haben eine zytosolische „Todesdomäne“ gemeinsam, an die bei Rezeptoraktivierung spezifische Proteine binden und ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Ebenfalls ist eine Rezeptor-unabhängige endogene Induktion von Apoptose, zum Beispiel nach DNA-Schädigung oder bestimmten zellulären Stresssituationen, nachgewiesen worden (Vaux DL, 1993). Die Aktivierung erfolgt über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, unter anderem über spezielle Aspartat-Proteasen der Interleukin-1-konvertierendes Enzym (ICE)-Familie, genannt Caspasen. Einige Substrate dieser Proteasenkaskade sind bekannt, es handelt sich dabei zum Beispiel um Bestandteile der Kernmembran (Lamine), Endonukleasen-Vorstufen, die durch Spaltung aktiviert werden (Enari et al., 1998), oder das DNA-Reparaturenzym Poly-Adenosin-Ribose-Polymerase (PARP), das durch Spaltung inaktiviert wird (Margolin et al., 1997). An verschiedenen von diesen Reaktionsschritten setzen anti-apoptotische Kontrollmechanismen an, wie zum

Beispiel die Genprodukte der Bcl-2-Onkogenfamilie. Deren Mitglieder verhalten sich antagonistisch zueinander und entfalten ihre pro- und anti-apoptischen Effekte in Abhängigkeit von ihrer relativen Menge. Homodimere des Bcl-2-Proteins wirken anti-apoptisch (Bcl-2, Bcl-XL), während Heterodimere von Bcl-2 und seinem Gegenspieler Bax pro-apoptisch wirken (Boise et al., 1995; Yin et al., 1994). Diese Proteine assoziieren an die Mitochondrien- und Kernmembranen und wirken möglicherweise als spezifische Kanäle und regulieren die mitochondriale Permeabilitätstransition (Antonsson et al., 1997; Van der Heiden et al., 1997). Induktion von Bax führt zur Abnahme des mitochondrialen Transmembranpotentials und zu apoptotischem Zelltod (Pastorino et al., 1998). Dabei wurde auch die Freisetzung pro-apoptischer Faktoren z.B. Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma beobachtet (Pastorino et al., 1998; Jürgensmeier et al., 1998). Für Bcl-2 ist auch eine anti-oxidative Wirkung postuliert worden (Shimizu et al., 1995). In einem direkten Zusammenhang mit Apoptose steht auch das Tumorsuppressorgen p53. Eine p53-abhängige Transkription wird bei verschiedenen Genen beobachtet. Es wurde berichtet, dass p53 an die Promotorregion von Angiotensinogen, AT1 Rezeptor und Bax bindet (Leri et al., 1998; Kirshenbaum et al., 1997). Die Bindung von Angiotensin II an AT1 löst Apoptose aus (Kajstura et al., 1997; Leri et al., 2000). Vermutlich kann p53 den apoptotischen Prozess transkriptionsabhängig und -unabhängig aktivieren (Ding et al., 2000).

Weiterhin wird von Cytochrom C-unabhängiger Induktion von Apoptose durch p53-abhängige Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit Senkung des mitochondrialen Membranpotentials berichtet (Li et al., 1999). Es gibt weitere Kontrollmechanismen der apoptotischen Signalkaskade, die auf der Ebene der Caspase-Kaskade einsetzen. Es sind verschiedene Moleküle bekannt, die als Inhibitoren für Caspasen wirken. Dazu gehören unter anderem Mitglieder der IAP (Inhibitor of apoptosis) Familie, wie c-IAP-1 und c-IAP-2 (Yaoita et al., 1998; Roy et al., 1997). Auch die Aktivierung von Mitgliedern der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Familie kann in Kardiomyozyten zu apoptotischem Zelltod führen. Zellulärer Stress kann bestimmte Mitglieder der MAPK-Familie aktivieren (Komuro et al., 1996; Bogoyevitch et al., 1996; Aoki et al., 2002). Extrazellulär regulierte Kinase (ERK), c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38-MAPK werden bei Stress aktiviert (Bogoyevitch et al., 1996; Clerk et al., 1998). Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) sind in Kardiomyozyten an der Entstehung von Apoptose

beteiligt (Bogoyevitch et al., 1996; Aoki et al., 2002). Aktivierung von JNK bei oxidativem Stress führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und zur Auslösung von programmiertem Zelltod (Aoki et al., 2002; Yue et al., 2000). Die Aktivierung von p38-MAPK kann scheinbar ebenso Apoptose induzieren (Yue et al., 2000). Phosphorylierung von p38-MAPK führt aber auch zur Aktivierung von MAPK aktivierter Proteinkinase 2 (MAPKAPK2), die dann das Hitzeschockprotein 25/27 (HSP25/27) phosphoryliert (Clerk et al., 1998). Dies wirkt sich schützend auf das Aktin des Zytoskeletts aus (Guay et al., 1997). ERK-Aktivierung führt wahrscheinlich auch zu Inhibition von Apoptose (Yeh et al., 1998). Das Zusammenspiel der pro- und anti-apoptotischen Signalwege ist in Abbildung 1.2. zusammengefasst.

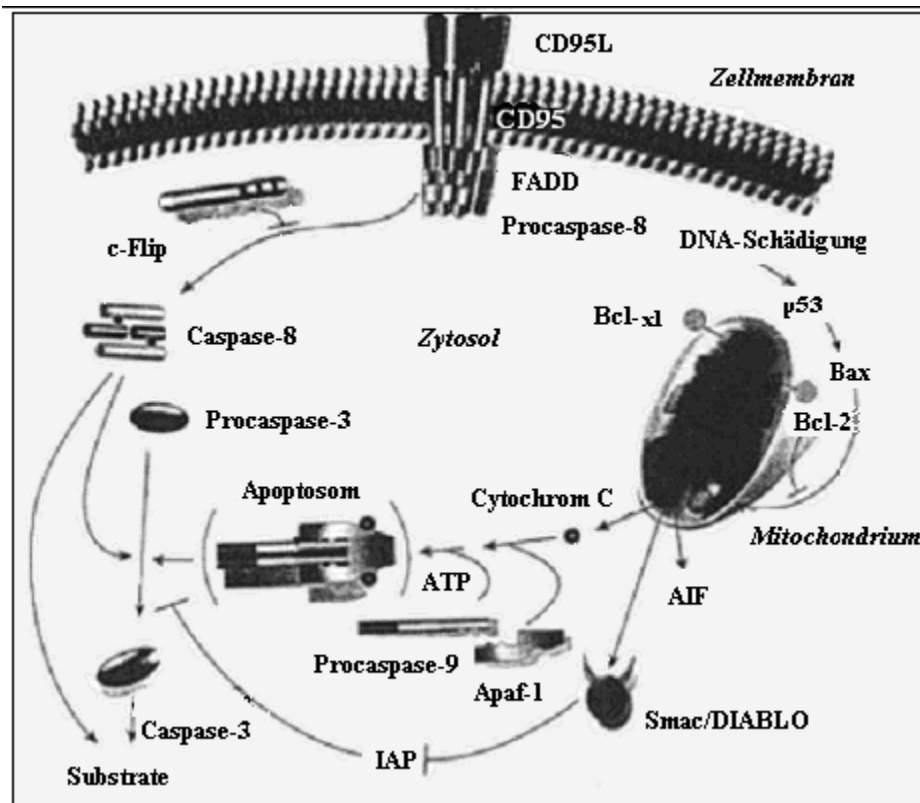


Abb. 1.2. Die apoptotischen Signalkaskaden (Hengartner M, 2000).

1.4. Rolle der Apoptose in Ischämie und Reperfusion

Viele Studien haben das Auftreten von Herzmuskelzell-Apoptose nach Ischämie/Reperfusion untersucht (Fliss et Gattinger, 1996; Batling et al., 1998; Haunstetter et Izumo, 1998). Die Vielzahl unterschiedlicher experimenteller Ansätze, Spezies und Nachweismethoden führen jedoch zu teilweise erheblichen Unterschieden hinsichtlich der Zahl der betroffenen Zellen und lassen Art und Quelle der Induktoren meist im Dunkeln.

Einige Studien zeigten, dass Herzmuskelzell-Apoptose durch die Ischämie selbst ausgelöst (Kajstura et al., 1996; Olivetti et al., 1996; Akiyama et al., 1997) und durch die Reperfusion beschleunigt oder verstärkt werden könnte (Fliss et Gattinger, 1996; Fliss H, 1998). Andere haben nur in reperfundiertem Gewebe Apoptose nachweisen können (Gottlieb et al., 1994; Bielawska et al., 1997; Cordis et al., 1998). Eine Untersuchung an kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten hat gezeigt, dass Hypoxie zu Apoptose unter gleichzeitiger Hochregulation des Fas-Rezeptors führt (Tanaka et al. 1994). Nach Ischämie/Reperfusion in Ratten ist in vivo ebenfalls eine starke Hochregulation von Fas gleichzeitig aber auch von Bcl-2 nachgewiesen worden (Kajstura et al., 1996). Überexpression von p53 konnte sowohl in adulten als auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten Apoptose auslösen. Bcl-2-Überexpression dagegen schützte diese effektiv vor p53-vermittelter Apoptose (Pierzchalski et al., 1997; Kirshenbaum, 1998) und kann nach akutem Herzinfarkt (Misao et al., 1996) sowie bei Herzversagen induziert werden (Olivetti et al., 1997).

In einer Studie an Rattenherzen wurde nach Ischämie/Reperfusion im Infarktbereich erhöhte Caspase-3-Aktivität in apoptotischen (Tunel-positiven) Zellen nachgewiesen (Black et al., 1998). Zudem konnte durch Einsatz eines Caspase-3-Inhibitors die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion isolierter Rattenherzen signifikant erniedrigt werden (Yaoita et al., 1998). Auch nach ischämischer Präkonditionierung, einem vermutlich PKC-vermittelten endogenen Schutzmechanismus, bei dem der Herzmuskel durch vorhergehende Kurzzeit-Ischämie/Reperusionsphasen vor Schädigung durch Langzeit-Ischämie geschützt wird, war die Apoptose-Induktion in ischämisch/reperfundierten Herzen reduziert (Piot et al., 1998).

In einer früheren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe an isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen der adulten Ratte wurde belegt, dass Bedingungen simulierter Ischämie und/oder Reoxygenierung allein, trotz der weitreichenden Analogie zu in

vivo Bedingungen von Ischämie/Reperfusion (Siegmund et al., 1990) nicht ausreichen, um endogen Apoptose in den isolierten Zellen zu induzieren (Taimor et al., 1999). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass in vivo während Ischämie/Reperfusion Faktoren von anderen Zelltypen des Herzens freigesetzt werden, zum Beispiel Sauerstoffradikale oder Stickstoffmonoxid aus aktivierten Makrophagen oder beschädigten Endothelzellen bei der Reperfusion (Matsubara et al., 1986), die in Herzmuskelzellen Apoptose induzieren.

1.5. Stickstoffmonoxid (NO) als Apoptose-Induktor

TNF- α aktiviert unter anderem die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Ferrari et al., 1998) und in Herzmuskelzellen von Patienten mit Herzversagen ist eine Überexpression von TNF-Rezeptormolekülen und iNOS gezeigt worden, die via NO-Synthese und oxidativem Stress Apoptose auslösten (Pinsky et al., 1995; Kitajima et al., 1994). Auch in anderen Zellmodellen ist NO als Induktor von Apoptose nachgewiesen worden. Loweth et al. (1997), Pollmann et al. (1996) und Wei et Zhu (1996) zeigten in neonatalen Herzmuskelzellen erhöhte NO-Produktion nach 3 h Hypoxie und 30 min Reoxygenierung. Andererseits kann exogenes NO auch kardioprotektiv wirken (Brunner F., 1997; Pabla et al., 1995). Die Effekte von NO hängen von den lokalen Konzentrationen und der zellulären Umgebung ab (Gonzalez-Zulueta, 2000). NO dient unter physiologischen Bedingungen als Signalmolekül, das z.B. die cGMP-abhängige Signaltransduktion über Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase moduliert. NO und NO-Derivate werden durch die zellulären Redoxsysteme kontrolliert und in nicht-toxische Formen (z.B. Nitrat) umgewandelt. Die Produktion großer NO-Konzentrationen in pathologischen Situationen fördert die Bildung hochreaktiver und potentiell toxischer Oxidationsprodukte von NO, die häufig mit einer erhöhten Bildung von Superoxid-Anionen einhergeht (Gross et Wolin, 1995). Das Stoffwechsel-Endprodukt der gebildeten Spezies, einschließlich des DNA-schädigenden Peroxynitrits (ONOO⁻), hängt dann von ihren lokalen Konzentrationen und dem Zustand der zellulären Systeme ab, mit denen sie interagieren.

1.6. Wirkung von Apoptose auf die kardiale Funktion

Die Apoptoseinduktion bewirkt auch unter strengen Konditionen, dass nur einige wenige Zellen den apoptotischen Prozess durchlaufen. In einem Herzen mit chronischer Hypertrophie finden sich neben normalen und gesunden Herzmuskelzellen nur wenige apoptotische Zellen. Im Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie ist die Situation viel komplizierter, weil neben der Apoptose auch ein onkotischer und autophagozytischer Zelltod gleichzeitig vorkommen können (Kostin et al., 2003). Wenngleich nur einige Zellen den apoptotischen Zyklus vollständig durchlaufen, untersucht durch DNA-Fragmentation, kann die Induktion des pro-apoptotischen Signaltransduktionsweges in vielen weiteren Zellen gefunden werden. Dieses beinhaltet auch die Aktivierung von Caspase-3 und die erhöhte Expression von pro- und anti-apoptotischen Genen. Die Inhibition der Caspase-3 Aktivierung verbessert die kardiale Funktion bei Myokardinfarkt und Herzhypertrophie, obwohl nur eine kleine Zahl von Herzmuskelzellen die Kriterien des apoptotischen Zelltodes erfüllen (Yaoita et al., 1998).

Als eine mögliche Erklärung wurde überlegt, dass Caspase-3 direkt an solche Proteine bindet, die für die Regulation der kardialen Funktion zuständig sind (Moretti et al., 2002; Communal et al., 2002). Diese Vorstellungen führen zu der Überlegung, dass eine Aktivierung des pro-apoptotischen Signaltransduktionsweges im Herzen zu einer eingeschränkten Kontraktilität führt bevor es zum Zelltod kommt. Man geht davon aus, dass die spezifische Aktivierung des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges die hypertrophe Entwicklung in einem chronisch hypertrophierten Herzen rückgängig machen kann (Dumitrascu et al., 2006).

Fiedler und Wollert (2004) haben gezeigt, dass viele Mechanismen am anti-hypertrophen Effekt von NO/cGMP teilhaben. Man geht davon aus, dass die Aktivierung des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges den Transport des Transkriptionsfaktors NFAT (JNK abhängig) in den Zellkern hemmt. Eine NFAT Aktivierung erhöht die SERCA2-Expression und steigert die Relaxation der Kardiomyozyten (Anwar et al., 2005). Demzufolge wird eine Hemmung der NFAT Aktivierung den günstigen Effekt von NFAT auf die SERCA2-Expression reduzieren. Es ist bekannt, dass die NO/cGMP/JNK-Signaltransduktionswege den apoptotischen Zelltod induzieren können (Taimor et al., 2000). NO aktiviert den pro-apoptotischen Signaltransduktionsweg über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (Taimor

et al., 2000). Die Art und Weise wie die Agonisten den pro-apoptotischen Zelltod induzieren sind sehr komplex. Die Induktion von cGMP-abhängiger Apoptose von adulten Kardiomyozyten benötigt die Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren, wie SMAD3 und Aktivatorprotein-1 (AP-1), und es braucht einige Stunden bis die Zellen den apoptotischen Prozess durchmachen und komplettieren (Taimor et al., 2001; Schneiders et al., 2005). Diese Fakten zeigen, dass die Expositionszeiten der Aktivatoren des cGMP-Signaltransduktionsweges eine wesentliche Rolle bei der Induktion der Apoptose spielen. Kurzfristige Gabe von hoch konzentriertem NO oder cGMP auf die Kardiomyozyten senkt akut die kardiale Funktion (Kojda et al., 1996). Mit dieser Art Experimenten ist jedoch keine Langzeitauswirkung der eingesetzten Substanzen auf die kardiale Funktion abschätzbar.

Um diese ungeklärte Frage zu beantworten, wurde in dieser Forschungsarbeit der chronische Effekt der Aktivierung des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten untersucht. Es wurde vermutet, dass die Aktivatoren dieser Signalkaskade sowohl eine Induktion des apoptotischen Zelltodes als auch eine Abnahme der kardialen Kontraktilität bewirken. Für die Induktion der Apoptose in adulten Herzmuskelzellen der Ratte wurden in dieser Studie der NO-Donor S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), das cGMP-Analogon 8-bromo-cyclo-GMP (8-br-cGMP) und der NO-unabhängige Aktivator der löslichen Guanylatzyklase 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzyl-Imidazol (YC-1) eingesetzt. Um zu beweisen, dass die Wirkung von SNAP alleine auf seine NO-Freisetzung zurückzuführen ist, wurde ebenfalls das Struktur analogon N-acetylpenicillamin (NAP), welches kein NO freisetzen kann, eingesetzt.

1.7. Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen

Als Modell für Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen finden adulte Herzmuskelzellen Verwendung. Das selektive Anheften adulter Herzmuskelzellen an FCS-vorbehandelte Kulturschalen ermöglicht die Gewinnung reiner Herzmuskelzellkulturen (Piper et al. 1989), Zelltypspezifische Vorgänge können daher sehr gut in Kulturen adulter Herzmuskelzellen analysiert werden. Da krankhafte Veränderungen, wie bei einem Herzinfarkt oder bei der Herzinsuffizienz, überwiegend im

Erwachsenenalter auftreten, ist der Phänotyp der adulten Herzmuskelzelle gut geeignet für Untersuchungen zu pathophysiologisch relevanten Mechanismen.

1.8. Methodische Voraussetzungen

Das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Zellen wurden über Nacht mit den jeweiligen Substanzen vorinkubiert. Vorausgehende Arbeiten an diesem Modell haben bereits gezeigt, dass die einzige messbare Veränderung hinsichtlich der basalen Funktion eine Beeinträchtigung der Frequenz-Kontraktionsbeziehung ist. Das bedeutet, dass die Zellen im nicht behandelten Zustand eine Abnahme der basalen Zellverkürzung bei Zunahme der Frequenz zeigen. Dieses ist vergleichbar mit der negativen Frequenz-Kraft-Beziehung des insuffizienten menschlichen Herzens. Da die Zellen der Ratte auch basal eine negative Frequenz-Verkürzungsbeziehung im Bereich von 0,5 bis 1 Hz zeigen, sind sie nicht direkt mit humanen Systemen vergleichbar. Bezüglich einer direkten Übertragbarkeit auf das humane System gelten für diese vorgestellten Untersuchungen speziebedingte Vorbehalte. Auf der anderen Seite ist das Rattenzellsystem der Herzmuskelzellen das am besten untersuchte Modell und zeigt hinsichtlich der Signaltransduktion viele Parallelen zu den humanen Systemen, während dies für Mauszellen weit weniger gilt. Die Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen erlauben eine Detailanalyse der maximalen Zellkontraktion und der Verkürzungsdynamik. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen aus einem Herzen isoliert und gemessen. Die Ergebnisse aus mindestens zwei verschiedenen Präparationen wurden zusammengestellt, so dass die zufallsbedingte Variabilität durch die Präparation weitgehend ausgeglichen werden konnte.

2. Material

2.1. Chemikalien

8-br-cGMP	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glucose	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
HEPES	Roche Applied Science, Mannheim
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
Methylcellulose M _D 40.000	Sigma, Taufkirchen
NAP	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Eggenstein
SNAP	Sigma, Taufkirchen
YC-1	Sigma, Taufkirchen

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

2.2. Medien

Calciumchlorid-Stammlösung:

CaCl₂ 100 mM

CCT-Kulturmedium:

M 199-HEPES gepuffert x ml
Kreatin 5 mM
Karnitin 2 mM
Taurin 5 mM
Streptomycin 100 µg/ml
Penicillin 100 IU/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid 100 µM

M 199-HEPES gepuffert:

Medium 199/Earl's Salts 9,8 g/l
HEPES 15 mM
PH 7,4

Powell-Medium:

NaCl 110 mM
NaHCO₃ 25 mM
KCL 2,6 mM
KH₂PO₄ 1,2 mM
MgSO₄ 1,2 mM
Glucose 11 mM

Vorinkubationsmedium:

M 199-HEPES gepuffert x ml
FCS 4 % (vol/vol)
Penicillin 100 IU/ml
Streptomycin 100 µg/ml

Cytosin- β -Arabinofuranosid wurde zur Hemmung der Proliferation verbliebener Nicht-Herzmuskelzellen zugesetzt. Alle Medien wurden steril filtriert, 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 μ l

PBS-Puffer:

NaCl	150 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
Na ₂ HPO ₄	5 mM
PH	7,4

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	30 mg

TBS-Puffer:

TRIS-HCl	10 mM
NaCl	150 mM
PH	7,4

Zellkontraktionspuffer-Stammlösung:

NaCl	125 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
KCl	2,6 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,0 mM
Glucose	10 mM

HEPES	10 mM
PH	7,4

Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung:

Zellkontraktionsstammlösung	100 ml
Adenosin-Desaminase	20 µl

2.4. Geräte und Laborbedarf

2.4.1. Zellpräparation und Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Institutes der J.-L.-Universität Gießen
Gewebehacker	Harvard 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	Physiologisches Labor des Physiologischen Institutes der J.-L.-Universität Gießen

2.4.3. Sonstige Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke&Kunkel, Staufen
PH-Meter	WTW, Weilheim

Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn

2.4.4. Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton, Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen (Typ Falcon 3004)	Becton, Dickinson, Heidelberg
Pipettespitzen	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 Ca^{++} -toleranten Herzmuskelzellen wurde eine Langendorff-Apparatur zunächst mit Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (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 ca. 12 Wochen alte, 300-350 g schwere, männliche Wistar-Ratten aus dem Tierstall des Physiologischen Instituts, Justus-Liebig-Universität Gießen, mit Diethylether narkotisiert und thorakotomiert. Die Herzen wurden mit eiskalter 0,15 M NaCl-Lösung still gestellt und oberhalb des Aortenbogens abgetrennt, danach die Lungenflügel entfernt und die Aorta frei präpariert. Bei langsam laufender Perfusion mit dem KRB-Puffer (ca. 30 Tropfen/min) wurden die Herzen mit der frei präparierten 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 weiter aufgetrennt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur durch ein Nylonnetz mit 200 μm Porengröße filtriert, um Bindegewebsstücke 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 mM CaCl_2 resuspendiert und erneut bei 400 Upm für 3 min zentrifugiert. Intakte Ca^{++} -tolerante Myozyten wurden durch Sedimentation durch ein Medium hoher Dichte aufkonzentriert. Hierfür wurden vier hohe Reagenzgläser bis zur Hälfte mit dem KRB-Puffer + 4 % Albumin + 1 mM 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 die Kurzzeitkultur in modifiziertem Kulturmedium 199 (CCT-Medium) resuspendiert. 35 mm-Gewebe-kulturschalen (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, Osterode/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 zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Diese Kurzzeitkultur im CCT-Medium bewirkte eine energetische Erholung der Zellen nach der Präparation.

Während der zweistündigen Kurzzeitkultur werden die intakten Myozyten zusätzlich aufgereinigt. Im Gegensatz zu den beschädigten und lysierten Zellen sedimentieren die stäbchenförmigen, intakten Myozyten und heften sich am Boden der vorinkubierten Plastik-Kulturschale an. Die runden und isolierten Zellen flotierte 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).

3.2. Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld

3.2.1. Probenvorbereitung

Bei der Messung von Myokardzell-Kontraktionen wurde mit Übernachtskulturen von isolierten Kardiomyozyten gearbeitet. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (mit unterschiedlichen Reagenzien, siehe Ergebnisteil) wurden bei den Myozyten die Kontraktionsparameter entweder ohne weitere Zugabe von Reagenzien oder unter Anlegen einer äußeren Last durch Kontraktion in hoch viskösem Medium gemessen.

3.2.2. Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion

Die Kulturschale wurde auf den Objektisch eines Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel verschlossen. In diesen wurden vier Löcher gebohrt, die so angeordnet wurden, dass sie annähernd die Eckpunkte eines Quadrats bildeten, welches den Kreis des Deckels maximal ausfüllte. 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, 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 Drähten 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 Stromstoßfrequenz 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 fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war 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 verschiedene starke y-Auslenkungen dargestellt. Diejenigen Amplituden, welche die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung identifiziert werden. Es war also möglich, die Zellkontraktion auf dem Oszillographen zu beobachten. Der Oszillograph wurde als Zwei-Kanaloszillograph 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 gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar gemacht 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, welches 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. 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 von der Zeit darstellte. Mithin eine Kurve, welche die Kontraktion der Zelle anzeigte. Der Computer erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Er nahm fünf Kontraktionen auf und ermittelte folgende Werte als Mittelwerte aus den jeweiligen fünf 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 Sekunden
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 weitere Parameter errechnet:

1. Der Quotient $\Delta L/L$: Man bildete die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge (ΔL). In Prozent ausgedrückt zeigt $\Delta L/L$ an, um wieviel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
2. Die Con_{max} als Ratenkonstante für die 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 wurden in das Programm Excel übertragen und weiter verarbeitet: aus diesen jeweiligen ersten Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichungen und Median bestimmt. Danach änderte man die Frequenz und maß die Zelle noch einmal bei 0,5 und 2 Hz aus.

3.2.5. Messung der Zelllängen und –breiten

Die Messung der Herzmuskelzellen erfolgte mit Hilfe einer CCD-Videokamera (AVC-D5CE, SONY, Japan). Während der Messung befanden sich die Zellen in der Kulturschale. Mit Hilfe der Kamera war es möglich, die Zelllängen und –breiten der Herzmuskelzellen genau zu erfassen.

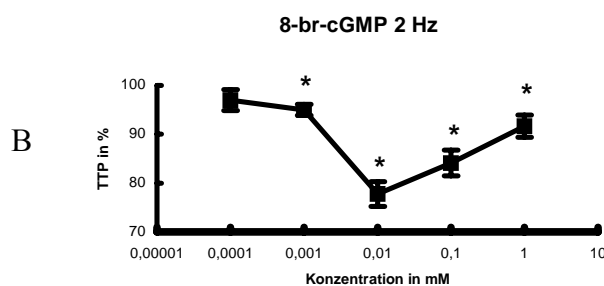
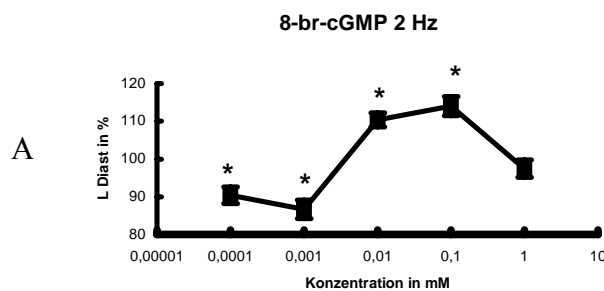
3.3. Statistik

Die Einzellkontraktionen wurden jeweils aus verschiedenen Präparationen zusammengefasst und der Mittelwert aus diesen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler. Bei Vergleichen zwischen zwei 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 bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-Exposition

Um den chronischen Einfluss von cGMP-Derivaten auf deren Kontraktionsverhalten zu überprüfen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 24 Stunden in Gegenwart von 8-br-cGMP (0,0001-1 mM) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation (2 Hz) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Das entspricht einer nominell weitgehend lastfreien Verkürzung. Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurde die diastolische Zelllänge (L Diast), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TTP) und die relative Zellverkürzung (dl/L) berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Die diastolische Zelllänge war bei 0,01 und 0,1 mM jeweils signifikant höher, jedoch bei 0,0001 und 0,001 mM jeweils signifikant niedriger (Abb. 4.1.A). Die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung war zwischen 0,01-1 mM signifikant kürzer. In diesem Bereich war auch eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zeit zu erkennen (Abb. 4.1.B). Die relative Zellverkürzung stellt sich biphasisch dar mit einem signifikant niedrigen Wert bei 0,01 mM (Abb. 4.1.C).



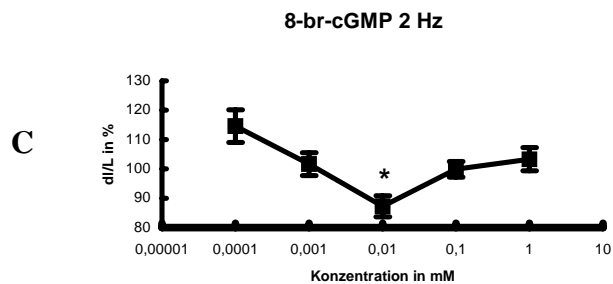


Abb. 1: Einfluss von chronischer Supplementation von 8-br-cGMP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit 8-br-cGMP (0,01 mM n= 72, 0,0001/0,001/0,1/1 mM n= 36) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.2. Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-Exposition

Um das frequenzabhängige Kontraktionsverhalten zu überprüfen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 24 Stunden in Gegenwart von 8-br-cGMP (0,01 mM) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation (0,5/1/2 Hz) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Eine Frequenz von 0,5 Hz für die Ratte ist unphysiologisch niedrig, erlaubt aber der Zelle eine starke Verkürzung. Im Bereich von 1-2 Hz findet sich an frisch isolierten Herzmuskelzellen eine positive Verkürzungs-Frequenz-Beziehung, wie sie als Frequenzinotropie beschrieben wird. Wieder wurden die diastolische Zelllänge, die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung und die relative Zellverkürzung berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Die diastolische Zelllänge war bei 0,5 und 2 Hz signifikant höher als bei den Kontrollen (Abb. 4.2.A). TTP war bei allen drei Frequenzen signifikant höher, am höchsten jedoch bei 1 Hz (Abb. 4.2.B). Die relative Zellverkürzung war bei allen drei Frequenzen signifikant niedriger, jedoch bei 1 Hz am niedrigsten (Abb. 4.2.C).

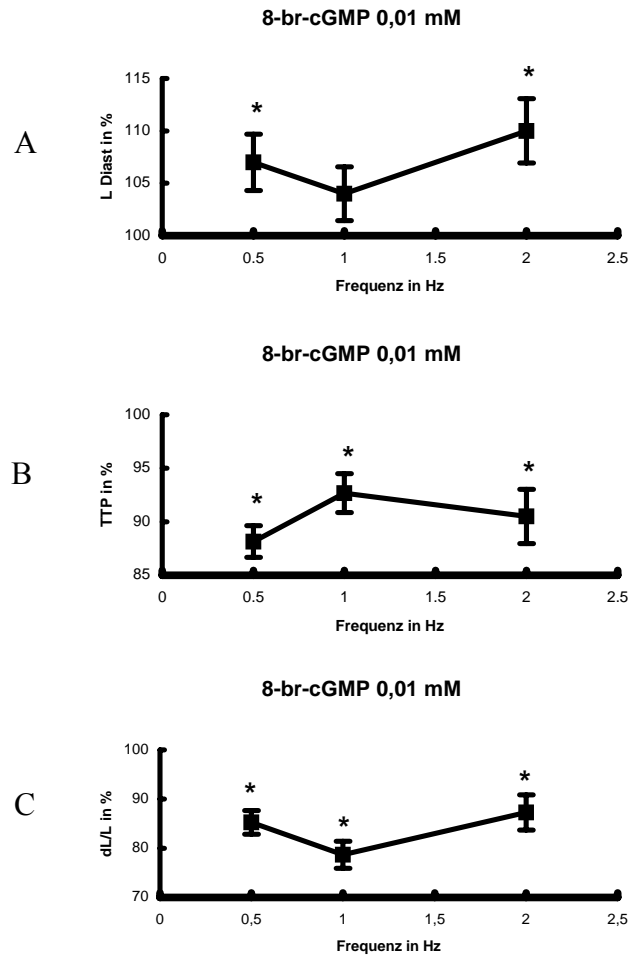


Abb. 2: Einfluss von chronischer Supplementation von 8-br-cGMP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit 8-br-cGMP (0,01 mM n= 72) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.3. Zelllängen und -breiten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-Exposition

Adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte wurden für 24 Stunden in Gegenwart von 8-br-cGMP (0,0001-1 mM) inkubiert. Danach wurden die Zelllängen und -breiten der Herzmuskelzellen ohne vorherige Kontraktion in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Angegeben sind die prozentualen Zelllängen und -breiten in Relation zu den Kontrollen (100 %). Bei allen Konzentrationen war eine signifikante Zunahme der Zelllänge unter 8-br-cGMP-Zugabe zu erkennen (Abb. 4.3.A). Eine konzentrationsabhängige Zunahme oder Abnahme der Zelllänge war nicht zu sehen. Bei den Konzentrationen 0,001-0,1 mM war eine signifikante Zunahme der Zellbreite zu erkennen, diese wurde mit zunehmender Konzentration geringer (Abb. 4.3.B).

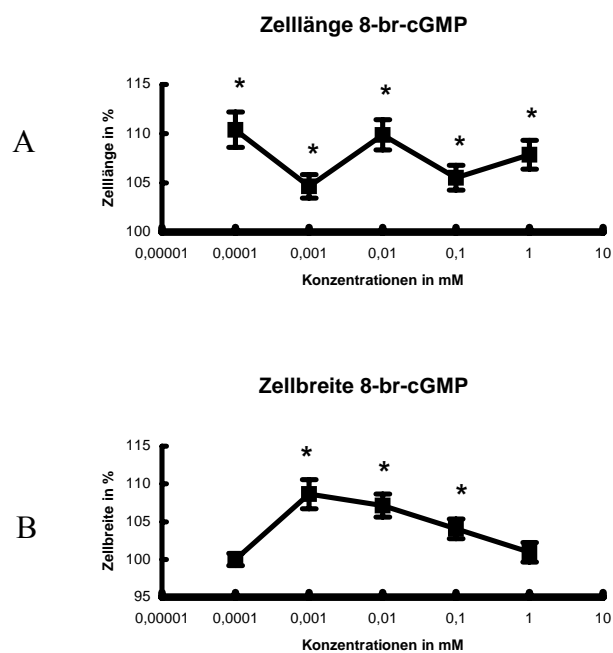
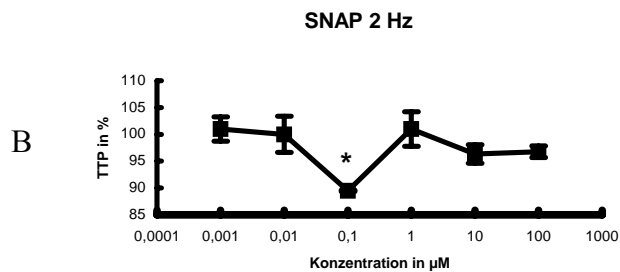
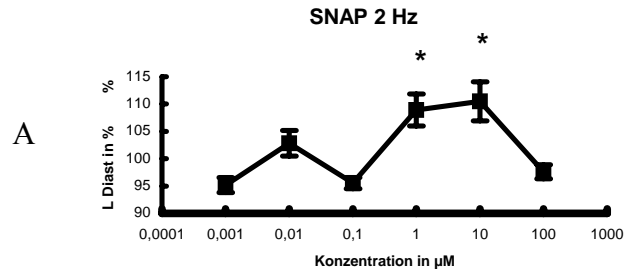


Abb. 3: Einfluss von chronischer Supplementation von 8-br-cGMP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit 8-br-cGMP (0,01 mM n= 72, 0,0001/0,001/0,1/1 mM n= 36) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die Zelllänge (A) und Zellbreite (B) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.4. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender SNAP-Exposition

Um den chronischen Einfluss von NO-Donoren auf deren Kontraktionsverhalten zu überprüfen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 24 Stunden in Gegenwart von SNAP (0,001-100 μM) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation (2 Hz) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Die diastolische Zelllänge, die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung und die relative Zellverkürzung wurden berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Die diastolische Zelllänge war bei 1 und 10 μM jeweils signifikant höher, bei den übrigen Konzentrationen war eine Tendenz zu niedrigeren Werten zu erkennen, diese war jedoch nicht signifikant (Abb. 4.4.A). TTP war nur bei 0,1 μM signifikant kürzer (Abb. 4.4.B). Die relative Zellverkürzung hatte zwischen 1 und 100 μM eine Tendenz zu höheren Werten und zwischen 0,001 und 0,1 μM zu niedrigeren Werten, es lag jedoch keine Signifikanz vor (Abb. 4.4.C).



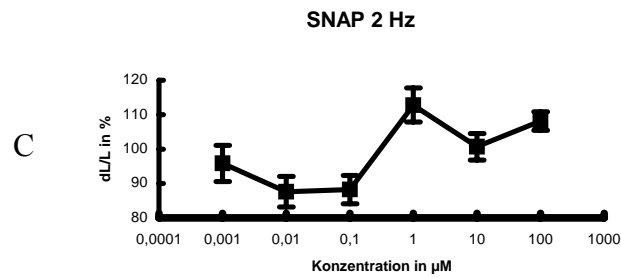


Abb. 4: Einfluss von chronischer Supplementation von SNAP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit SNAP (1 μM n= 72, 0,001/0,01/0,1/10/100 μM n= 48) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.5. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender NAP-Exposition

Um zu überprüfen, ob der Einfluss von SNAP auf das Kontraktionsverhalten NO-abhängig ist, wurden die selben Messungen mit NAP vorgenommen. Dabei wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 24 Stunden in Gegenwart von NAP (0,001-100 μM) inkubiert. Bei NAP handelt es sich um das inaktive Kontrollmolekül des NO-Donors SNAP. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation (2 Hz) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Die diastolische Zelllänge, die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung und die relative Zellverkürzung wurden berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Die diastolische Zelllänge war bei 0,1 und 1 μM jeweils signifikant niedriger, bei den übrigen Konzentrationen war kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 4.5.A). TTP war nur bei 0,1 μM signifikant kürzer (Abb. 4.5.B). Die relative Zellverkürzung zeigte bei 100 μM einen signifikant niedrigen Wert (Abb. 4.5.C).

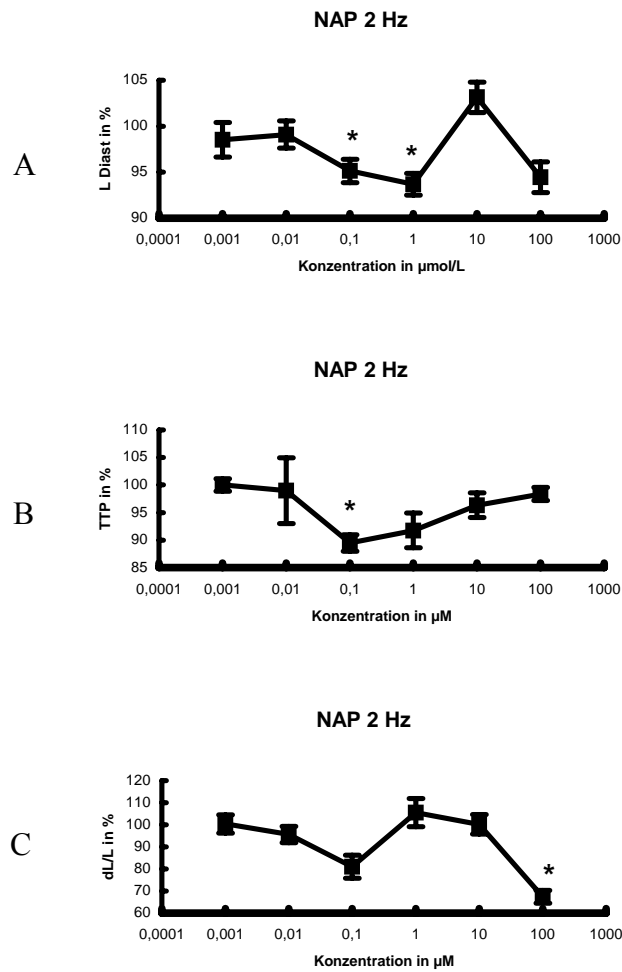
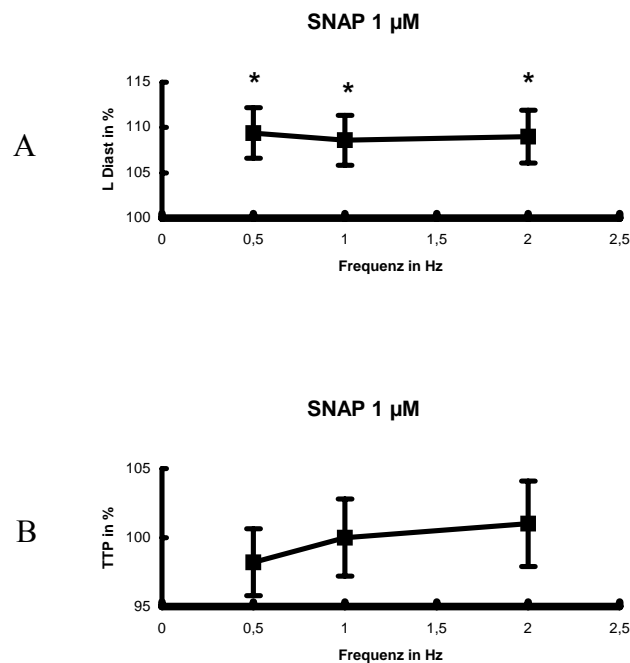


Abb. 5: Einfluss von chronischer Supplementation von NAP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit NAP (1 μM n= 72, 0,001/0,01/0,1/10/100 μM n= 48) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.6. Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender SNAP-Exposition

Um das frequenzabhängige Kontraktionsverhalten zu überprüfen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 24 Stunden in Gegenwart von SNAP (1 μM) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation (0,5/1/2 Hz) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Wieder wurden die diastolische Zelllänge, die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung und die relative Zellverkürzung berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Die diastolische Zelllänge war bei allen drei Frequenzen signifikant höher als bei den Kontrollen (Abb. 4.6.A). TTP war bei allen drei Frequenzen nicht signifikant verändert (Abb. 4.6.B). Die relative Zellverkürzung war ebenfalls bei allen drei Frequenzen nicht signifikant verändert (Abb. 4.6.C).



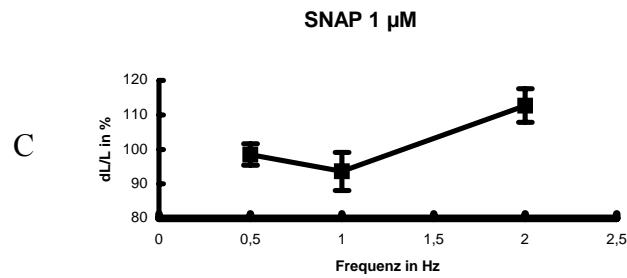


Abb. 6: Einfluss von chronischer Supplementation von SNAP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit SNAP (1 μ M n= 72) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.7. Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender NAP-Exposition

Adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte wurden für 24 Stunden in Gegenwart von NAP (1 μ M) inkubiert, um ebenfalls das frequenzabhängige Kontraktionsverhalten zu überprüfen. Die Kontraktionen der Herzmuskelzellen wurden unter elektrischer Stimulation (0,5/1/2 Hz) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Wieder wurden die diastolische Zelllänge, die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung und die relative Zellverkürzung berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Die diastolische Zelllänge war bei allen drei Frequenzen signifikant niedriger als bei den Kontrollen (Abb. 4.7.A). TTP war bei allen drei Frequenzen nicht signifikant verändert, mit zunehmender Frequenz war jedoch eine Tendenz zu niedrigen Werten zu erkennen (Abb. 4.7.B). Die relative Zellverkürzung war ebenfalls bei allen drei Frequenzen nicht signifikant verändert (Abb. 4.7.C).

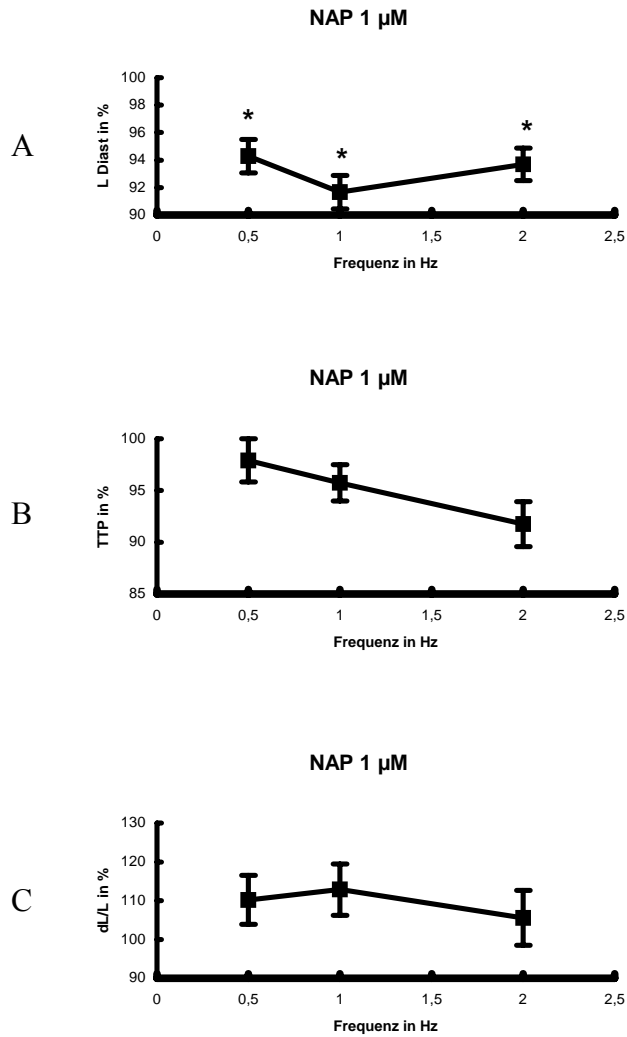


Abb. 7: Einfluss von chronischer Supplementation von NAP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit NAP (1 μ M n= 72) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.8. Zelllängen und -breiten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender SNAP- und NAP-Exposition

Adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte wurden für 24 Stunden in Gegenwart von SNAP (1 μM) und NAP (1 μM) inkubiert. Danach wurden die Zelllängen und -breiten der Herzmuskelzellen ohne vorherige Kontraktion in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Angegeben sind die prozentualen Zelllängen und -breiten in Relation zu den Kontrollen (100 %). Nach SNAP-Exposition war eine signifikante Zunahme der Zelllängen erkennbar, die Zellbreiten waren tendenziell geringer, jedoch nicht signifikant (Abb. 4.8.A/B). Nach NAP-Exposition war keine signifikante Veränderung der Zelllängen und -breiten vorhanden (Abb. 4.8.A/B).

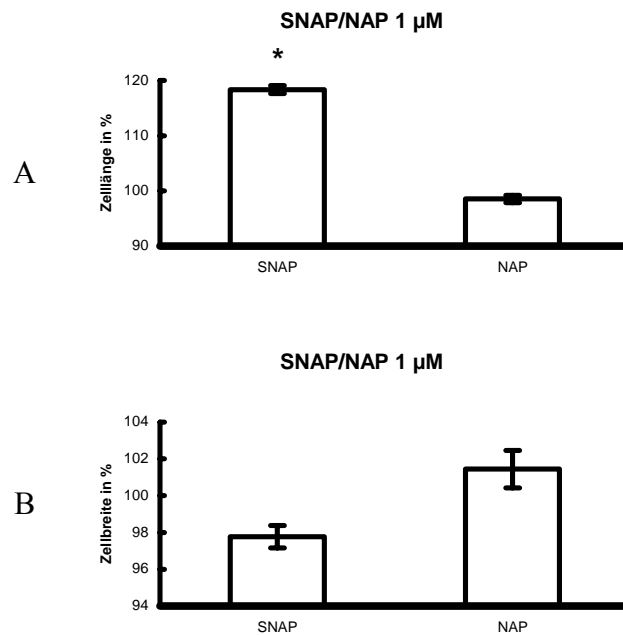
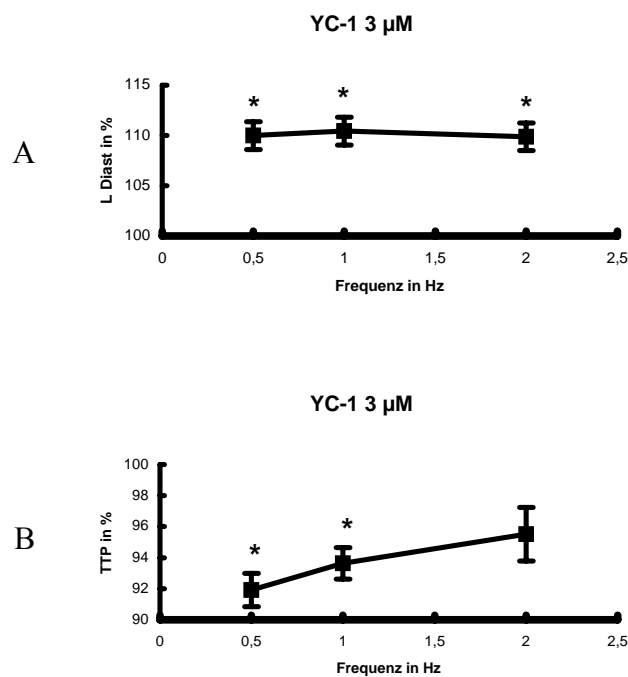


Abb. 8: Einfluss von chronischer Supplementation von SNAP und NAP auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit SNAP und NAP (1 μM n= 120) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die Zelllänge (A) und Zellbreite (B) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.9. Frequenzabhängige lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender YC-1-Exposition

Adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte wurden für 24 Stunden in Gegenwart von YC-1 (3 μM) inkubiert, um das frequenzabhängige Kontraktionsverhalten zu überprüfen. Die Kontraktionen der Herzmuskelzellen wurden unter elektrischer Stimulation (0,5/1/2 Hz) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Wieder wurden die diastolische Zelllänge, die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung und die relative Zellverkürzung berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Die diastolische Zelllänge war bei allen drei Frequenzen signifikant höher als bei den Kontrollen (Abb. 4.9.A). TTP war nur bei 0,5 und 1 Hz signifikant niedriger (Abb. 4.9.B). Die relative Zellverkürzung war bei allen drei Frequenzen nicht signifikant verändert (Abb. 4.9.C).



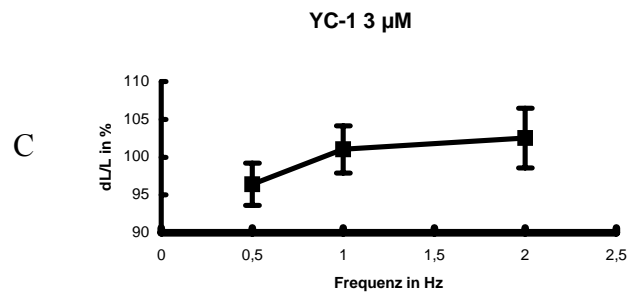


Abb. 9: Einfluss von chronischer Supplementation von YC-1 auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit YC-1 (3 μ M n= 72) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der un-behandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

4.10. Einfluss von Last auf isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender 8-br-cGMP-, SNAP- und YC-1-Exposition

Um den Einfluss einer externen Last auf die Kontraktion nach anhaltender Exposition mit 8-br-cGMP, SNAP und YC-1 zu beurteilen, wurden die Zellen mit 8-br-cGMP (1 mM), SNAP (100 μ M) und YC-1 (3 μ M) inkubiert und am darauf folgenden Tag in viskösem Medium (nominell 400 cP durch Zugabe von Methylcellulose) elektrisch (2 Hz) stimuliert. Dies imitiert eine externe Lasterhöhung, wie sie sich im Gesamtorgan als erhöhte Nachlast äußert. Die diastolische Zelllänge, die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung und die relative Zellverkürzung wurden berechnet und in Relation zu den Kontrollen (100 %) prozentual angegeben. Bei der diastolischen Zelllänge war keine signifikante Veränderung zu erkennen, nach 8-br-cGMP-Zugabe war nur eine leichte Tendenz zu niedrigen Werten vorhanden (Abb. 4.10.A). TTP war nach 8-br-cGMP-, SNAP- und YC-1-Zugabe jeweils signifikant niedriger (Abb. 4.10.B). Die relative Zellverkürzung wies bei allen drei Substanzen signifikant höhere Werte auf (Abb. 4.10.C).

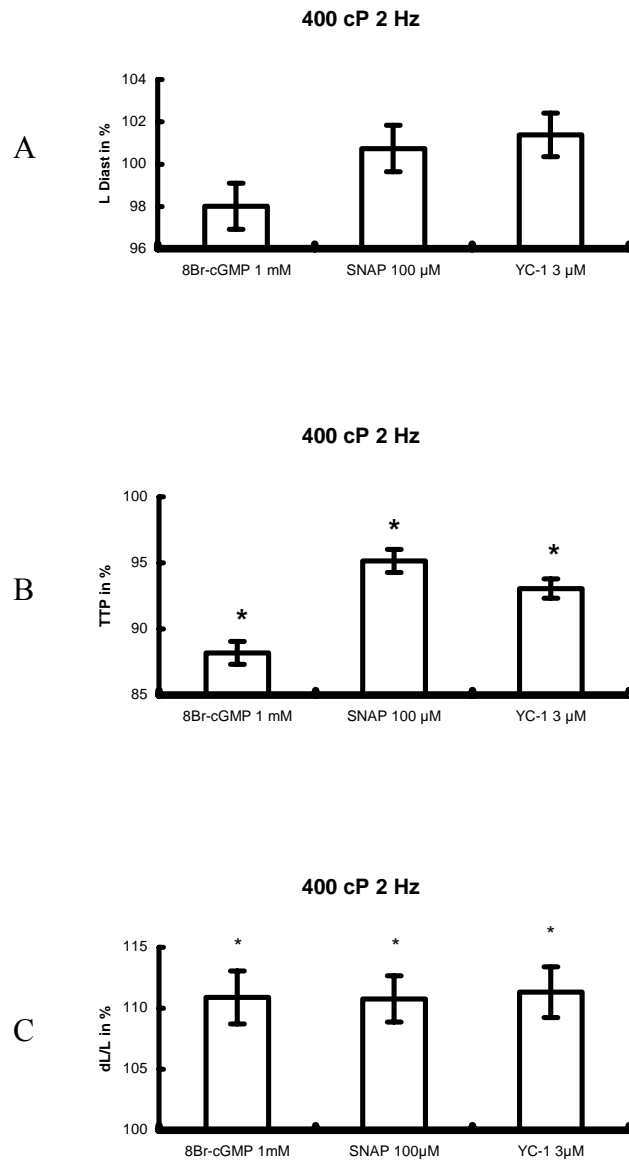


Abb. 10: Einfluss von chronischer Supplementation von 8-br-cGMP, SNAP und YC-1 auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium mit 8-br-cGMP (1 mM n= 108), SNAP (100 µM n= 108) und YC-1 (3 µM n= 108) inkubiert. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Mittelwerte und Standardfehler für die diastolische Zelllänge (A), die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (B) und die relative Zellverkürzung (C) relativ zu den Kontrollen (100 %). * kennzeichnet Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit $p < 0,05$.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es zu ermitteln, ob eine chronische Aktivierung des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges, der bei akuter Aktivierung die kardiale Funktion modifiziert, auch langfristig die kardiale Funktion beeinträchtigt. Die Fragestellung ergibt sich aus der Überlegung heraus, dass dieser Signalweg chronisch zur Induktion von Apoptose beiträgt.

Für diese Arbeit wurde ein Übernacht-Zellkultur-System benutzt, in dem sich eine negative Frequenz-Verkürzungsbeziehung von Zellen entwickelt. Da eine negative Frequenz-Kraft-Beziehung im insuffizienten menschlichen Herzen vorgefunden wird, kann das genannte Zellkultursystem benutzt werden, um solch eine Situation nachzuahmen. Taimor et al. (2004) und Anwar et al. (2005) konnten zeigen, dass die Stimulierung von α -Adrenorezeptoren, die einen pro-hypertrophen Effekt in diesem System durch Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors bewirkt, die Zellfunktion durch Aktivierung von SERCA2 steigern kann. Diese Resultate wurden nur bei einer Herzfrequenz von über 2 Hz und mehr gemessen, entsprechen also einer Aufhebung der negativen Kraft-Frequenz-Beziehung.

Als Hauptbefund dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion des pro-apoptotischen Signaltransduktionsweges durch NO/cGMP weder die kardiale Funktion steigert noch verringert. Diese Tatsache gilt für Experimente, die unter lastfreien Konditionen durchgeführt wurden. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch bei den Experimenten mit zunehmender Last (400 cP) kein Funktionsverlust der Herzmuskelzelle beobachtet werden konnte. Die Zellverkürzung nahm unter diesen Konditionen gering, aber trotzdem signifikant zu. Die Messung der Zellfunktion nach 24 Stunden ergab, dass die Induktion des NO/cGMP Signaltransduktionsweges die kardiale Leistung reduzieren kann. Dabei wurden aber weit geringere Konzentrationen verwendet, als benötigt, um eine Apoptose zu induzieren, und um die Zellfunktion durch eine akute Aktivierung zu beeinträchtigen. Begleitend wurde auch eine Zunahme der ruhenden Kardiomyozytenzelllängen beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine moderate, chronische Stimulation des NO/cGMP Signaltransduktionsweges zu einem Calcium-Sensibilitätsverlust führt. Um den Effekt von NO/cGMP auf die kardiale Leistung zu analysieren, wurden die

Herzmuskelzellen über Nacht unter Serum-freien Konditionen kultiviert. Unter diesen Bedingungen können die Zellen eine stabile Proteinsynthese aufrecht erhalten (Pinson et al., 1993), aber dennoch von einer normalen biphasischen Frequenz-Zellverkürzungs-Beziehung, wie sie in frisch isolierten Herzmuskelzellen auftritt (Langer et al., 2003 und diese Studie), in eine negative Frequenz-Kraft-Beziehung übergehen (Anwar et al., 2005 und diese Studie). Dieser Übergang kann unterdrückt werden durch eine α -Adrenorezeptor-Stimulation, wobei eine NFAT-Aktivierung und eine NFAT-abhängige SERCA2-Expression als notwendige Zwischenschritte identifiziert werden konnten. Das NO/cGMP-System hat verschiedene Möglichkeiten NFAT zu deaktivieren. NO kann z.B. über cGMP den JNK-Signaltransduktionsweg in Kardiomyozyten aktivieren (Taimor et al., 2001). Die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges stimuliert die Freisetzung von NFAT aus dem Nukleus und hat deshalb einen negativen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktor (Chow et al., 1997). Die Ergebnisse dieser Studie, dass eine Stimulation des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges die negative Frequenz-Zellverkürzungs-Beziehung nicht verbessert, stimmen überein mit diesen Daten.

Andererseits ist bekannt, dass eine α -Adrenorezeptor-Stimulation und NO den AP-1-Signaltransduktionsweg aktivieren (Taimor et al., 2001). Bei Kardiomyozyten führt die α -Adrenorezeptor-Stimulation ohne NFAT-Aktivierung nicht zu einer Veränderung der negativen Frequenz-Zellverkürzungs-Beziehung (Anwar et al., 2005). Da weder die α -Adrenorezeptor-Stimulation ohne NFAT-Aktivierung noch NO/cGMP die Veränderungen oder kontraktilen Eigenschaften, gemessen an kultivierten Kardiomyozyten, modifizieren, aber dennoch beide Agonisten AP-1 aktivieren, sprechen die Resultate gegen eine Beteiligung von AP-1 in diesem Prozess. Einer der wichtigsten Ergebnisse dieser Studie ist, dass geringe Konzentrationen von 8-br-cGMP oder SNAP ausreichen, um die Kontraktionsleistung der Zellen zu reduzieren, gemessen nach 24 stündiger Inkubationszeit der Kardiomyozyten. Die Konzentrationen von 8-br-cGMP oder SNAP, die erforderlich sind, um die Zellverkürzungsrate zu reduzieren, sind geringer als die, die notwendig sind, um Apoptose zu induzieren. Eine Reduktion der Kontraktionsleistung wurde jedoch bei höheren Konzentrationen und gleichzeitiger Aktivierung des pro-apoptischen Signaltransduktionsweges nicht gemessen. Unter solchen Bedingungen zeigen fast alle Herzmuskelzellen eine Aktivierung von Caspase-3. Die Aktivierung von Caspase-3 in Verbindung mit SNAP wurde bereits von Taimor (2000) dargelegt.

Die Frage, auf welche Weise der apoptotische Zelltod bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine Rolle spielt und von welchen Faktoren sie abhängig ist, ist immer noch nicht geklärt.

In dieser Studie wurde untersucht, ob die alleinige Induktion von Apoptose die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten negativ beeinflusst. Der Hinweis für diese Fragestellung kam, wie in der Einleitung beschrieben, von verschiedenen Forschungsarbeiten, die nachwiesen, dass eine Caspase-3 abhängige Teilung von kontraktilen Proteinen und eine Verbesserung der kardialen Funktion auftraten, sobald Caspase-3 inhibiert wurde. In dieser Arbeit wurde jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Caspase-3-Inhibition und der Teilung von kontraktilen Proteinen sowie der Verbesserung der kardialen Funktion festgestellt. Es sollte erwähnt werden, dass der Hinweis für die direkte Beteiligung einer Caspase-3-Aktivierung an der Verschlechterung der kardialen Funktion von drei von einander unabhängigen Forschungsarbeiten dargestellt wurde. Communal et al. (2002) berichteten, dass aktivierte Caspase-3 Sarkomeren-Proteine *in vitro* spalten und die Calcium-Sensibilität reduzieren kann. Die dargelegten Befunde stimmen mit denen von Communal in sofern überein, als dass eine Calcium-Desensibilisierung festgestellt werden konnte, nachgewiesen auf eine indirekte Weise durch Beobachtungen der Zelllängenveränderungen. Einen Zellfunktionsverlust konnte man bei Versuchen weder mit noch ohne Last eruieren. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Communal fand sich aber noch keine Zunahme der Apoptose, ein indirektes Maß für Caspase-3-Aktivität und bei nachgewiesener Caspase-3-Aktivierung ergab sich kein Funktionsverlust.

Zusammengefasst kann man sagen, dass das NO/cGMP-System viele verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, wie z.B. die Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Die Reaktion der Zelle auf eine NO/cGMP-Aktivierung ist nicht nur die Aktivierung von Caspase-3 alleine. Ferner konnte beobachtet werden, dass ein desensibilisierender Effekt von NO/cGMP nur bei niedrigen Konzentrationen auftritt. Diese Konzentrationen waren niedriger als jene, die benötigt werden, um Caspase-3 zu aktivieren. Das führt wiederum zu der Überlegung, ob die Caspase-3-Aktivierung wirklich zu einer Calcium-Desensibilisierung in gesunden Herzmuskelzellen führt. Weiterhin ist die Mitwirkung der Caspase-3-Aktivierung beim Übergang zur Herzinsuffizienz kritisch zu betrachten, da diese Erkenntnisse von

Kaninchen-Versuchen stammen, bei denen die Herzinsuffizienz induziert wurde. Wie schon erwähnt, führt eine Caspase-3-Aktivierung zur Teilung von Sarkomeren-Proteinen (Moretti et al., 2002). Laugwitz et al. (2001) haben gesunde Kardiomyozyten mit denen von insuffizienten Herzen verglichen. Die Kardiomyozyten von insuffizienten Herzen entwickelten einen Funktionsverlust, der nach Caspase-3-Inhibition rückläufig sein könnte. In der hier vorliegenden Arbeit wurden nur gesunde Kardiomyozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl unbehandelte Kardiomyozyten als auch jene, die mit pro-apoptischen Konzentrationen von 8-br-cGMP oder SNAP behandelt wurden, einen Übergang von einer normalen in eine negative biphasische Frequenz-Zellverkürzungs-Beziehung zeigten. Die Aktivierung des pro-apoptischen Signaltransduktionsweges übt keinen zusätzlichen Effekt aus. Mit anderen Worten, die hier vorgelegte Arbeit konnte zeigen, dass die Induktion des pro-apoptischen Signaltransduktionsweges das Kontraktionsverhalten nicht beeinflusst.

Abschließend betrachtet, zeigen die in dieser Studie erhobenen Befunde deutlich, dass die Induktion des pro-apoptischen Signaltransduktionsweges die Funktion von Kardiomyozyten nicht beeinflusst. Ebenso konnte dargestellt werden, dass bei Konzentrationen, bei denen Apoptose induziert wird, NO/cGMP-abhängige Signaltransduktionswege den Verlust der kardialen Funktion weder erhöhen noch erniedrigen. Unabhängig von ihrem Effekt auf die Apoptose waren interessanter Weise gerade niedrige Konzentrationen von NO/cGMP ausreichend, um die kardiale Leistung zu reduzieren. Das kann interpretiert werden als ein Effekt, welcher von einer Calcium-Desensibilisierung ausgeht. Da NO, cGMP und eine direkte Aktivierung der Guanylatzyklase einen ähnlichen Effekt auf die Zelllängen haben, kann man davon ausgehen, dass NO diesen Effekt über cGMP ausübt. Layland et al. (2002) beschrieben bereits ähnliche Effekte von cGMP auf die Calcium-Desensibilisierung in Form von akuten Reaktionen von cGMP-Derivaten. Diese kommen in Betracht als NO/cGMP-abhängige Troponin I Phosphorylierungen. Es ist möglich, dass die in dieser Studie benutzten niedrigeren Konzentrationen einen ähnlichen Effekt ausüben, jedoch wird eine längere Zeit benötigt, damit dieser für das Herz mechanisch relevant wird.

Basierend auf diesen neuen Resultaten, dass hohe Konzentrationen von NO/cGMP Apoptose induzieren, und dass gerade niedrige Konzentrationen bei chronischer Exposition die kardiale Leistung reduzieren, ist die Aktivierung des NO/cGMP-Systems ein fragwürdiger Ansatz für eine anti-hypertrophe Therapie.

6. Zusammenfassung und abschließende Betrachtung

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, den chronischen Effekt der Aktivierung des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen:

- 1.** Bei den Experimenten mit Last und ohne Last konnte kein Funktionsverlust der Herzmuskelzelle beobachtet werden.
- 2.** Die Induktion des NO/cGMP Signaltransduktionsweges kann die kardiale Leistung reduzieren, wenn die dabei verwendeten Konzentrationen geringer sind als benötigt, um eine Apoptose zu induzieren oder um die Zellfunktion akut zu beeinträchtigen.
- 3.** Begleitend mit der Reduktion der kardialen Leistung bei geringen Konzentrationen wurde auch eine Verlängerung der ruhenden Kardiomyozytenzelllängen beobachtet.
- 4.** Die Induktion des pro-apoptotischen Signaltransduktionsweges durch NO/cGMP hat weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die kardiale Funktion.
- 5.** Eine Stimulation des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges verbessert nicht die negative Frequenz-Zellverkürzungs-Beziehung.
- 6.** Durch Messungen der Zell- und Sarkomerenlängenveränderungen konnte eine Calcium-Desensibilisierung festgestellt werden

Summary

It is still under discussion to what extent and why apoptotic cell death contributes to the progression of heart failure. This study investigated whether the induction of apoptotic cell death per se depresses contractile function of cardiomyocytes. The evidence for this comes from previous findings of caspase-3-dependent cleavage of contractile proteins and the improvement of cardiac function when caspase-3 is inhibited. However, this study shows no evidence for such a strict coupling. Communal et al. (2002) reported that active caspase-3 develop a reduced calcium sensitivity. This study could also report a calcium desensitization, although in an indirect way by the observation of cell lengthening. A loss of cell function, neither as unloaded cell shortening nor when the cells were exposed to external load (400 cP), could not be observed. However, in a living cell, NO/cGMP activates multiple pathways including the activation of transcription factors and the final response of the cell is not simply the response to active caspase-3. Furthermore, it could be observed such a desensitizing effect of NO/cGMP already at concentrations below those required for significant caspase-3 activation. This makes it questionable whether indeed caspase-3 activation leads to calcium desensitization in intact cells. Again, caspase-3 activation went along with the cleavage of sarcomeric proteins (Moretti et al., 2002). Compared to cardiomyocytes from healthy animals, those isolated from the failing hearts developed a loss of function that could be reserved by caspase-3 inhibition (Laugwitz et al., 2001). In this study, however, it was not compared normal cardiomyocytes with failing myocytes. In either untreated cardiomyocytes or those treated with pro-apoptotic concentrations of either 8-br-cGMP or SNAP, the cells underwent a transition from a normal biphasic frequency cell shortening relationship into a negative relationship. On top of this transition, the activation of pro-apoptotic pathways did not exert an additional effect. In other words, in this well controlled situation the induction of pro-apoptotic pathways did not influence the contractile function of cardiomyocytes further.

In summary this study provides direct evidence that NO/cGMP-dependent pathways do neither improve nor worsen the loss of cardiac function at concentrations at which they accelerate apoptosis. Nevertheless, even low but sustained concentrations of cGMP/NO are sufficient to reduce cardiac performance, irrespectively of their effect on apoptosis. This was can be interpreted as a calcium desensitizing effect.

7. Literaturverzeichnis

Akiyama K, Gluckman TL, Terhakopian A, Jinadasa PM, Narayan S, Singaswamy S, Massey B 3rd, Bing RJ., Apoptosis in experimental myocardial infarction in situ and in the perfused heart in vitro. *Tissue Cell* (1997) 29: 733-43

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC., Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* (1997) 277: 370-372

Anversa P, Kajstura J. Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ Res* (1998) 82: 1231-1233

Anwar A, Taimor G, Korkususz H, Schreckenber R, Berndt T, Abdallah Y, Piper HM, Schlüter K-D. PKC-independent signal transduction pathways increase SERCA2 expression in adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* (2005) 39:911-919

Aoki H, Kang P, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, Izumo S: Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277 (2002) 10244-10250

Bartling B, Holtz J, Darmer D., Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* (1998) 93: 71-84

Bielawska AE, Shapiro JP, Jiang L, Melkonyan HS, Piot C, Wolfe CL, Tomei LD, Hannun YA, Umansky SR., Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* (1997) 151: 1257-1263

Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, Radinovic S, Eberhart A, Nicholson DW, Rodger IW., Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* (1998) 30: 733-742

Bogoyevitch M, Gillespie-Brown J, Ketterman A, Fuller S, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall C, Sugden P: Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. *Circ Res* (1996) 79: 162-173

Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB., Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* (1995) 200: 107-121

Brunner F., Interaction of nitric oxide and endothelin-1 in ischemia/reperfusion injury of rat heart. *J Mol Cell Cardiol* (1997) 29: 2363-2374

Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* (1997) 278:1638-1641

Clerk A, Michael A, Sugden P: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J* (1998) 333: 581-589

Communal C, Samundea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci* (2002) 99: 6252-6256

Cordis GA, Yoshida T, Das DK., HPTLC analysis of sphingomyelin, ceramide and sphingosine in ischemic/reperfused rat heart. *J Pharm Biomed Anal* (1998) 16: 1189-1193

Ding H, Lin Y, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, Fisher D: Essential role for Caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol Chem* (2000) 275: 38905-38911

Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beueerlein K, Schmidt H, Stasch J-P, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* (2006) 113: 286-295

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. (1998) 391: 43-50. Erratum in: *Nature* (1998) 393: 396

Ferrari, R, Agnoletti, L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Visioli O. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur. Heart J* (1998) 19: B2-11

Feuerstein G, Ruffolo R, Yue T: Apoptosis and congestive heart failure. *TCM* (1997) 7: 249-255

Fiedler B, Wollert K. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* (2004) 63: 450-457

Fliss H., Accelerated apoptosis in reperfused myocardium: friend of foe? *Basic Res Cardiol* (1998) 93: 90-93

Fliss H, Gattinger D, Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* (1996) 79: 949-956

Goebell H, Wagner J: *Innere Medizin*. de Gruyter, Berlin, New York (1992): 38-43

Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson TM, Dawson VL., Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97: 436-441

Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL., Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* (1994) 94: 1621-1628

Gross SS, Wolin MS., Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* (1995) 57: 737-769

Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie J, Huot J, Landry J: Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* (1997) 110: 357-368

Haunstetter A, Izumo S., Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* (1998) 82: 1111-1129

Hengartner M: The biochemistry of apoptosis. *Nature* (2000) 407: 770-776

Jürgensmeier J, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed John: Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *PNAS* (1998) 95: 4997-5002

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P., Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* (1996) 74: 86-107

Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P., Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol* (1996) 271: H1215-1228

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs L, Anversa P: Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* (1997) 29: 859-870

Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* (1972) 26: 239-257

Kirshenbaum LA., Regulators of apoptosis in the heart: a matter of life and death. *Can J Cardiol* (1998) 14: 457-460

Kirshenbaum L, de Moissac D: The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* (1997) 96: 1580-1585

Kitajima I, Kawahara K, Nakajima T, Soejima Y, Matsuyama T, Maruyama I., Nitric oxide-mediated apoptosis in murine mastocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* (1994) 204: 244-251

Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schlüter K-D, Piper HM, Noack E. Low increase in cGMP by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat cardiac myocytes. *Circ Res* (1996) 78: 91-101

Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y: Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J* (1996) 10: 631-636

Kostin S, Pool L, Elsässer A, Hein S, Drexler HCA, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer EP, Klövekorn W-P, Schaper J. Myocytes die by different mechanisms in human failing myocardium. *Circ Res* (2003) 92: 715-724

Langer M, Luttecke D, Schluter KD. Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflugers Arch* (2003) 447: 289-297

Leri A, Claudio P, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P: Stretch-mediated release of Angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local Renin-angiotensin system and decreases the bcl-2-to-bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* (1998) 101: 1326-1342

Leri A, Liu Y, Li B, Fiordaliso F, Malhotra A, Latini R, Kajstura J, Anversa P: Up-regulation of AT1 and AT2 receptors in postinfarcted hypertrophied myocytes and stretch-mediated apoptotic cell death. *Am J Pathol* (2000) 156: 1663-1672

Li P, Dietz R, von Harsdorf R: p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by bcl-2. *EMBO J* (1999) 18: 6027-6036

Loweth AC, Williams GT, Scarpello JH, Morgan NG., Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. *FEBS Lett* (1997) 400: 285-288

Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Gu Y, Livingston DJ., Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *J Biol Chem* (1997) 272: 7223-7228

Matsubara T, Ziff M., Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* (1986) 137: 3295-3298

Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H., Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* (1996) 94: 1506-1512

Moretti A, Weig H-J, Ott T, Seyfarth M, Holthoff H-P, Grewe D, Gillitzer A, Bott-Flügel L., Schömig A, Ungerer M, Laugwitz K-L. Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci* (2002) 99: 11860-11865

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P., Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* (1997) 336: 1131-1341

Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P., Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* (1996) 28: 2005-2016

Pabla R, Buda AJ, Flynn DM, Salzberg DB, Lefler DJ, Intracoronary nitric oxide improves postischemic coronary blood flow and myocardial contractile function. *Am J Physiol* (1995) 269: H1113-1121

Pastorino J, Chen S, Tafani M, Snyder J, Farber J: The overexpression of bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* (1998) 273: 7770-7775

Pierzchalski P, Reiss K, Cheng W, Cirielli C, Kajstura J, Nitahara JA, Rizk M, Capogrossi MC, Anversa P., p53 Induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* (1997) 234: 57-65

Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ., The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest* (1995) 95: 677-685

Pinson A, Schlüter K-D, Zhou XJ, Schwartz P, Kessler-Icekson G, Piper HM. Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* (1993) 25: 477-490

Piper HM, Millar BC, McDermott BJ., The negative inotropic effect of neuropeptide Y on the ventricular cardiomyocyte. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (1989) 340: 333-337

Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH., Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* (1996) 79: 748-756

Roy N, Deveraux Q, Takahashi R, Salvesen G, Reed J: The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific Caspases. *EMBO J* (1997) 16: 6914-6925

Schneiders D, Heger J, Best P, Piper HM, Taimor G. SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* (2005) 67: 87-96

Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y., Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* (1995) 374: 811-813

Siegmund B, Koop A, Klietz T, Schwartz P, Piper HM., Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* (1990) 258: H285-291

Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res* (2000) 45: 588-594

Taimor G, Lorenz H, Hofstaetter B, Schluter KD, Piper HM., Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rat. *Cardiovasc Res* (1999) 41: 147-156

Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediate NO-induced apoptosis of adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J* (2001) 15: 2518-2520

Taimor G, Schlüter K-D, Best P, Helmig S, Piper HM. Transcription activator protein 1 mediates α but not β -adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2004) 286: H2369-2375

Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M., Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* (1994) 75: 426-433

Van der Heiden AP, Goebbels D, Pijpers AP, Koole LH., A photochemical method for the surface modification of poly(etherurethanes) with phosphorylcholine-containing compounds to improve hemocompatibility. *J Biomed Mater Res* (1997) 37: 282-290

Vaux DL, Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) 90: 786-789

Wei L, Zhu H, The influence of hypoxia/reoxygenation on production and release of nitric oxide from cultured newborn rat cardiomyocytes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (1996) 76: 697-699

Wyllie, AH, Kerr JFR, Currie AR, Cell death: The significance of apoptosis. *International Review of Cytology* (1980) 68: 251-306

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y., Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* (1998) 97: 276-281

Yeh W, de la Pompa J, McCurrach M, Shu H, Elia A, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry W, Lowe S, Goeddel D, Mak T: FADD: Essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* (1998) 279: 1944-1958

Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ., BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* (1994) 369: 321-323

Yue T, Wang L, Gu J, Ma X, Kumar S, Lee J, Feuerstein G, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein E: Inhibition of Extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res* (2000) 86: 692-699

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Überlassung des interessanten Themas und sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente, sowie für seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Kollegen Dr. Sybille Wenzel und Nadine Lorenz für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung.

Frau Daniela Schreiber und Herrn Sergej Kechter danke ich für die Präparation der Herzmuskelzellen.

Ich möchte meinen Eltern Safiye und Hasan Tastan, meinen Geschwistern Hülya und Ilhan sowie meinem Schwager Selim für ihre moralischen Unterstützungen danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Mürüvvet, weil sie sehr geduldig war und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tastan
Vorname: Hakan
Geburtsdatum: 31.08.1975
Geburtsort: Flensburg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

Grundschule: Grundschule Ramsharde Flensburg 1982-1986
Gymnasium: Altes Gymnasium Flensburg 1986-1995

Studiengänge

Justus-Liebig-Universität Gießen:

1. Humanmedizin 10/1995–05/2002
2. Zahnmedizin 04/2002–10/2005

Staatsexamina:

1. Staatsexamen (Humanmedizin) 03/1999
2. Staatsexamen (Humanmedizin) 03/2001
3. Staatsexamen (Humanmedizin) 05/2002
Staatsexamen (Zahnmedizin) 10/2005

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Experimentelle

Doktorarbeiten:	1. Institut für Anatomie Gießen	03/1999-03/2001
	2. Institut für Physiologie Gießen	04/2004-05/2005

Aktuelle Tätigkeit

Seit 01.01.2006 Assistenzarzt am Universitätsklinikum Bern/CH
Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie