

**Mechanismus des positiv kontraktiven Effektes von Stickstoffmonoxid (NO)
auf ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte mit positiver Kraft/Frequenz-
Beziehung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Markus Langer
aus Stuttgart

Stuttgart 2007

Aus dem Physiologischen Institut
Leiter Prof. Dr. Dr. Piper
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter
Gutachter: Prof. Dr. Hölschermann

Tag der Disputation: 28.06.2007

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung

1.1.	Stickstoffmonoxid (NO), ein Botenstoff mit vielen Funktionen	7
1.2.	Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen von adulten Ratten als in vitro Modell dieser Studie	8
1.3.	Effekte von NO an ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte	9
1.4.	Verschiedene Signalübertragungswege von NO	9
1.5.	Differenzierte Versuchsbedingungen	10
1.6.	Aufgabenstellung	11

2. Material

2.1.	Chemikalien	12
2.2.	Medien	14
2.3.	Puffer	15
2.4.	Geräte und Laborbedarf	16
2.4.1.	Zellpräparation und Zellkultur	16
2.4.2.	System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion	16
2.4.3.	Sonstige Geräte	16
2.4.4.	Verbrauchsmaterialien	17
2.4.5.	Software	17

3. Methoden

3.1.	Isolierung von Herzmuskelzellen	18
3.1.1.	Versuchstiere	18
3.1.2.	Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten	18
3.2.	Zellkultur	19
3.2.1.	Vor- und Ausplattierung	19
3.2.2.	Kurzzeitkulturen der isolierten Kardiomyozyten	19
3.3.	Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld	20
3.3.1.	Probenvorbereitung	20
3.3.2.	Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzellkontraktion	20
3.3.3.	Messung der Kontraktionsparameter	21
3.3.4.	Messprotokoll	26
3.3.5.	Auswertung der Kontraktionsparameter und statistische Berechnung	27
3.3.6.	Darstellung der Experimentiererergebnisse	27

3.3.7.	Bestimmung der cAMP- und cGMP-Spiegel	27
4.	Ergebnisse	
4.1.	Allgemeine Charakteristika des Kontraktionsverhaltens von isolierten Kardiomyozyten der Ratte	28
4.2.	Einfluss von NO-Donatoren auf die Kontraktilität	30
4.3.	Effekte von NO-Donatoren auf Kardiomyozyten unter Anwesenheit eines Inhibitors der löslichen Guanylatzyklase	36
4.4.	Interaktion von NO mit dem β -adrenergen System	44
4.5.	Interaktion von SNAP mit der α_s -Untereinheit von G-Proteinen	46
5.	Diskussion	
5.1.	Hauptbefunde	49
5.1.1.	Beteiligung von cGMP am positiv kontraktilem NO-Effekt	49
5.1.2.	Beteiligung der α_s -Untereinheit von G-Proteinen an dem positiv kontraktilem Effekt von NO	50
5.1.3.	Beteiligung von cAMP an dem positiv kontraktilem Effekt von NO	51
5.2.	Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinasen	52
5.3.	Vergleich mit anderen Studien	52
5.4.	Limitierungen	53
5.5.	Schlussfolgerung	54
5.6.	Ausblick	54
6.	Zusammenfassung/Conclusion	55
7.	Literaturverzeichnis	57
8.	Anhang	61

1. Einleitung

1.1. Stickstoffmonoxid (NO), ein Botenstoff mit vielen Funktionen

Seit Erforschung des „endothelium derived relaxing factors“ (EDRF) als vasoaktive Substanz im menschlichen Organismus und der Entdeckung, dass die beobachtete Vasodilatation durch die endogene Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) ausgelöst wird (Furchgott und Zawadzki, 1980), ist die Untersuchung der Funktion von NO in Hinsicht auf physiologische Abläufe des Herz-Kreislaufsystems Ziel zahlreicher Studien. NO wird im Organismus aus der Aminosäure L-Arginin von einer Gruppe von Enzymen synthetisiert (NO-Synthasen, NOS) die als Isoenzyme in verschiedenen Organsystemen exprimiert werden und dort bestimmte Funktionen durch die Freisetzung von NO und Folgeschritte vermitteln. Somit spielt NO als ubiquitär vorkommendes Molekül eine wesentliche Rolle in der Signalübertragung von Organfunktionen.

Im zentralen Nervensystem wird NO in Neuronen synthetisiert und dient als Neuromediator bei der Entstehung von Gedächtnis, der zentralen Kreislaufregulation und der Modulation von Schmerz (Garthwaite, 1991; Snyder and Brecht, 1992).

NO, in Endothelzellen und Thrombozyten gebildet, inhibiert die Thrombozytenaggregation und –adhäsion, inhibiert die Leukozytenadhäsion und beeinflusst das Wachstum glatter Muskelzellen (Moncada and Higgs, 1993).

Im peripheren, autonomen Nervensystem wird der Tonus der glatten Muskulatur von Magen-Darm Trakt, Lunge und Urogenitalsystem wesentlich durch die Freisetzung von NO beeinflusst (Gillespie et al., 1990; Rand, 1992; Toda, 1995).

Im Immunsystem wirkt NO durch die Blockade von Enzymen in der Atmungskette von Bakterien und Tumorzellen zytostatisch und zytotoxisch und spielt damit eine wichtige Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern (Hibbs et al., 1990; Nguyen et al., 1992).

Die hier erwähnten physiologischen Funktionen von NO werden durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und einem konsekutiven Anstieg von cGMP vermittelt.

Nachdem der vasodilatierende Effekt von NO im Gefäßsystem ausführlich erforscht wurde und Grundlage des Einsatzes von Nitraten in der Medizin ist, liegt das Interesse in letzter Zeit zunehmend in der Untersuchung, welche Auswirkung die endogene Freisetzung von NO aus kardialen Endothelzellen auf Herzmuskelzellen und die Herzfunktion hat. Nach zahlreichen teils gegensätzlichen Studienergebnissen scheint mittlerweile fest zu stehen, dass niedrige,

submikromolare Konzentrationen an NO einen positiv kontraktile Effekt, höhere Konzentrationen an NO einen negativ kontraktile Effekt auf Herzmuskelzellen haben (Kojda et al, 1995). Hieraus erwächst die Frage nach dem Mechanismus dieser gegensätzlichen Wirkungsweise, die NO konzentrationsabhängig an Herzmuskelzellen auslöst. Mit dieser Frage beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

1.2. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen von adulten Ratten als in vitro Modell dieser Studie

Isolierte Rattenherzen zeigen eine biphasische Kraft-Frequenz Beziehung mit einem atypischen negativen Verlauf von 0,5 bis 1,0 Hz und einen typischen positiven Verlauf zwischen 1,0 und 2,0 Hz (Borzak et al., 1991; Vornanen, 1992). Die negative Kraft-Frequenz-Beziehung (FFR=Force-Frequency-Relationship) ist spezifisch für das Rattenherz im unteren Frequenzbereich. In diesem Bereich ist die Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums mit Calcium während der Diastole weniger von der Sarkoplasmatische-Retikulum-Calzium-ATPase (SERCA) dominiert.

Die positive FFR oberhalb einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz hingegen gleicht dem Kontraktionsverhalten anderer Säugetierherzen. In diesem Bereich kommt es in der Diastole zu einer vermehrten Calcium-Aufnahme über die (SERCA) in das sarkoplasmatische Retikulum, so dass in der folgenden Systole mehr Calcium nach intrazellulär freigesetzt werden kann.

Für die folgenden Untersuchungen wurden Kurzzeitkulturen von Herzmuskelzellen der Ratte verwendet, die nach einem von Piper et. al. 1990 entwickelten Verfahren hergestellt wurden. Bei dem Verfahren werden Herzen adulter Ratten durch retrograde Perfusion nach Langendorff mit einer Kollagenaselösung angedaut, anschließend mechanisch zerkleinert und in eine Pufferlösung mit physiologischer Elektrolytkonzentration überführt. Durch Sedimentation werden intakte Herzmuskelzellen von Bindegewebsresten getrennt und anschließend auf einer Kulturschale in einem Puffermedium ausplattiert. Dadurch gewinnt man Zellen, die morphologisch und metabolisch im serumfreien Medium über 24-36 Stunden weitgehend den Zellen im Gewebsverband in vitro vergleichbar sind (Volz et al., 1991). Der wesentliche Unterschied besteht in dem Fehlen von Zell-Zell Kontakten und der Verrichtung mechanischer Arbeit und in dem sehr viel größeren Extrazellulärvolumen.

Mittels einer speziellen Versuchs- und Messvorrichtung, die im Einzelnen noch beschrieben wird, können die Zellen bis zu 36 Stunden nach der Präparation elektrisch stimuliert und die Dynamik der Kontraktion registriert werden.

1.3. Effekte von NO an ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte

Zahlreiche in vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass NO direkt die Kontraktilität von ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte beeinflusst (Kodja et al., 1996; Vila-Petroff et al., 1999). Diese Beobachtung wurde in mehreren in vitro Untersuchungen demonstriert, in denen ventrikuläre Herzmuskelzellen mit exogenem NO inkubiert wurden. Dabei ergab sich bei elektrischer Stimulation eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungs-Kurve durch einen Anstieg der Zellverkürzung bei niedrigen Konzentrationen an NO und eine Abnahme der Zellverkürzung bei hohen Konzentrationen an NO (Kodja et al., 1996).

Gleiche Beobachtungen über eine positive Kraftentwicklung von Kardiomyozyten konnten auch anhand von isovolumentrisch schlagenden Langendorff Herzen, Präparationen des schlagenden Herzens oder an Papillarmuskeln der Katze gemacht werden (Müller-Stahl et al., 2000; Mohan et al., 1996).

Eine negative Kraftentwicklung, hervorgerufen durch hohe Konzentrationen an NO, kann Herzmuskelzellen am Beginn der Reperfusion nach einer Ischämiephase vor einer Hyperkontraktilität schützen (Schlüter et al., 1994). Dabei sind die Zellen in der postischämischen Phase vorübergehend vor einer NO induzierten Apoptose geschützt (Taimor et al., 2000).

Aus diesem Grund wirken hohe Konzentrationen an exogenem NO protektiv in der postischämischen Erholungsphase.

Diese Effekte, die bei hohen Konzentrationen an NO beobachtet wurden, werden durch eine NO-abhängige Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und eine folgende Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen verursacht (Schlüter et al., 1994; Kodja et al., 1996; Taimor et al., 2000).

1.4. Verschiedene Signalübertragungswege von NO

In letzter Zeit wurden in einigen Publikationen unkonventionelle Wege für die Signalübertragung von NO in Herzmuskelzellen diskutiert. Dabei soll NO unabhängig von der löslichen Guanylatzyklase und cGMP-abhängigen Proteinkinasen direkt Zellfunktionen über Transnitrosylierung von regulatorischen Thiolen beeinflussen (Stamler, 1994; Stoyanovsky et al., 1997; Xu et al., 1998; Arstall et al., 1998). Diese Studien vermitteln den Eindruck, dass NO die Kontraktilität von Kardiomyozyten direkt über die Adenylatzyklase,

Proteinkinase C (PKC), Kreatinkinase oder Calciumkanäle verändert (Vila-Petroff et al., 1999; Ping et al., 1999; Liang und Knox, 1999; Arstall et al., 1998; Abi-Gerges et al., 2002). Wie bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, führen niedrige Konzentrationen an NO-Donatoren zu einem Anstieg des zellulären cAMP-Spiegels (Kodja et al., 1996). Als Wirkmechanismus, über den NO zu einem zellulären cAMP-Anstieg führt, wurde vermutet, dass der cAMP-Abbau durch Inhibierung von Phosphodiesterasen (cGI-PDE oder PDE III) verändert wird. Diese Hypothese schließt nicht aus, dass der cAMP-Anstieg durch eine direkte Beeinflussung des Adenylatzyklasesystems, entweder cGMP-abhängig oder cGMP-unabhängig, zustande kommt. Tatsächlich berichtete Vila-Petroff und Kollegen (1999), dass der NO-Donor SNAP zu einem Anstieg der Adenylatzyklase-Aktivität in Sarkolemmmembranen des Herzens führt. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, weil dies nicht nur zeigt, dass NO mit dem Adenylatzyklase aktivierenden System interagiert, sondern dass NO auch die Verbindung von verschiedenen Rezeptor-Systemen, die die Adenylatzyklaseaktivität betreffen, erhöhen könnte. Tatsächlich sind niedrige Konzentrationen von NO-Donatoren in der Lage, einen β -Adrenozeptor-vermittelten Anstieg der Kontraktilität von Kardiomyozyten zu verstärken (Kodja et al., 1996).

1.5. Differenzierte Versuchsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente an isolierten Herzen von erwachsenen Ratten durchgeführt. Anders als in früheren Studien wurden die Untersuchungen mit Stimulationsfrequenzen von 0,5, 1,0 und 2,0 Hz durchgeführt wobei sich das unter 1.2. beschriebene Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen der Ratte zeigte.

Bisherige Studien, die sich mit dem Mechanismus der positiven Kontraktilität von Herzmuskelzellen durch exogenes NO beschäftigten, haben diesen Mechanismus bisher nicht bei Stimulationsfrequenzen untersucht, die eine positive FFR an Herzmuskelzellen auslösen (Kodja et al., 1996; Vila-Petroff et al., 1999).

In der Arbeit von Vila-Petroff wurde beschrieben, dass NO über einen cGMP unabhängigen Mechanismus die Kontraktilität erhöht, was im Gegensatz zu vorhergehenden Studien mit Papillarmuskeln der Katze steht (Mohan et al., 1996). Es ist unklar, ob der Unterschied in einer anderen Spezies begründet ist, oder ob nur Zellen mit einer negativen FFR mit Zellen einer positiven FFR verglichen wurden.

Insgesamt entspricht die positive FFR dem physiologischen Anspruch, da das Rattenherz ansonsten in vivo (bei 5-7 Hz) mit reduzierter Kontraktilität schlagen würde.

1.6. Aufgabenstellung

Wie bereits oben ausgeführt wurde in mehreren Studien ein positiv kontraktiler Effekt von niedrigen Konzentrationen NO an Herzmuskelzellen beschrieben. Über den subzellulären Mechanismus wie dieser Effekt zustande kommt konnte bisher jedoch keine einheitliche Aussage getroffen werden. Erschwerend kommt hinzu, dass Herzmuskelzellen der Ratte, als Tiermodell in vielen Studien verwandt, eine biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung aufweisen, und so die Versuche teilweise im negativen und teilweise im positiven Kraft-Frequenzbereich durchgeführt wurden.

Da das Rattenherz in vivo aber im positiven Kraft-Frequenz-Bereich schlägt erschien es sinnvoll, weitere Untersuchungen auch unter diesen Bedingungen durch zu führen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, den Mechanismus des positiv kontraktilen Effekts von NO an isolierten Herzmuskeln der Ratte in einem positiven Kraft-Frequenz-Bereich zu untersuchen.

2. Material

2.1. Chemikalien

Adenosin-Desaminase	Sigma, Deisenhofen
Adenosin –Di-Phosphat	Böhringer, Mannheim
Adenosin-Mono-Phosphat	Böhringer, Mannheim
Adenosin-Tri-Phosphat	Böhringer, Mannheim
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma, Deisenhofen
Ammonium-Persulphat	Böhringer, Mannheim
BCIP	Sigma, Deisenhofen
Benzon-Nuklease	Merck, Darmstadt
Bisindonylmaleimid	Sigma, Deisenhofen
BQ 123	Bachem, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Deisenhofen
DEAE-Zellulose	Böhringer, Mannheim
Desoxyglucose	Sigma, Deisenhofen
Diphenylamin	Merck, Darmstadt
DL-Alpha-Difluoromethyl-Ornithin	RBI, Köln
DDT	Sigma, Deisenhofen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Forskolin	
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Böhringer, Mannheim
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Böhringer, Mannheim
Hexokinase	Sigma, Deisenhofen

Isoprenalin	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumcyanat	Sigma, Deisenhofen
Karnitin	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase Typ CLSII (332 U/mg)	Biochrom, Berlin
Kreatin	Sigma, Deisenhofen
Kreatinphosphat	Böhringer, Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199 / Earl's Salts	Gibco BRL, Eggenstein
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (unter Lizenz von Riedel-de Haen GmbH)
Molekulargewichtstandards (Protein)	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
NAD ⁺	Böhringer, Mannheim
NADH	Böhringer, Mannheim
Natrium-Ortho-Vanadat	Merck, Darmstadt
NF 449	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
ODQ	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Rapamycin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Rp-cyclic-AMPS	Sigma, Deisenhofen
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)	Merck, Darmstadt
SNAP	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Spermine NONOate	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Trichloracetat	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
YC-1	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Böhringer (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedl-de Haen (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) in den höchsten erhältlichen Qualitäten bezogen. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2. Medien

Calcium-Stammlösung:

CaCl ₂	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-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 ₃	25 mMol/l
KCl	2,6 mMol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mMol/l
MgSO ₄	1,2 mMol/l
Glucose	11 mMol/l

Vorinkubationsmedium:

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

Cytosin-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
Calcium-Stammlösung	12,5 ml

PBS-Puffer:

NaCl	150 mMol/l
KH ₂ PO ₄	5 mMol/l
Na ₂ HPO ₄	5 mMol/l
pH	7,4

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25 ml

TBS-Puffer:

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

Zellkontraktionspuffer-Stammlösung:

NaCl	125 mMol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mMol/l
KCl	2,6 mMol/l
MgSO ₄	1,2 mMol/l
CaCl ₂	1,0 mMol/l
Glucose	10 mMol/l
HEPES	10 mMol/l

pH 7,4

Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung:

Stammlösung 100 ml

Adenosin-Desaminase 20 µl

2.4. Geräte und Laborbedarf

2.4.1. Zellpräparation und Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorffapparatur	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes in Düsseldorf
Gewebehacker	Bachofer, Reutlingen
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, 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, Köln
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Zellstimulator	Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU 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
Anlage zur Demineralisierung von Wasser	Millipore, Bedford MA, USA

2.4.4. Verbrauchsmaterialien

Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 mm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel

2.4.5. Software

Excel	Microsoft
Image-Quant	Molekular Dynamics, Krefeld
MUCEL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
SPSS	SAS Software-Version 6.11

3. Methoden

3.1. Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1. Versuchstiere

Die für die Versuche verwendeten Herzmuskelzellen wurden aus adulten männlichen Wistar-Ratten (Lebendgewicht 250-300g) isoliert. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet und gehalten und erhielten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin) und Wasser.

3.1.2. Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

Die Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte nach der von Piper et al. 1982 veröffentlichten Methode.

Nach kurzer Äthernarkose (ca. 1 Min.) wurde der Thorax der Tiere mittels zweier Schnitte entlang des Rippenbogens und zweier parasternaler Schnitte eröffnet, das Mediastinum dargestellt und das Perikard abpräpariert. Anschließend wurde das Herz- und Lungenbündel angehoben und mit einem Scherenschlag herausgelöst. Daraufhin wurde es sofort in eiskalte isotonische Kochsalzlösung verbracht. Darin wurde zunächst die Lunge und die noch vorhandenen Gewebereste entfernt und anschließend das Herz mit der Aorta ascendens an eine Langendorff-Apparatur angehängt und retrograd perfundiert. Nach Auswaschen des verbliebenen Blutes mit 20 ml Powell-Medium wurde das Herz 25 Minuten mit 50 ml Kollagenasepuffer rezirkulierend perfundiert. Mit einem Ventil wurde dabei eine Flussrate von ca. 2-3 ml/min eingestellt. Vor und während der Perfusion wurde das Powell-Medium mit Carbogen begast.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewebe mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde es unter Carbogenbegasung für 10 Minuten im Rezirkulationspuffer mit 1% Albumin bei 37°C inkubiert. Die Mazeration der ventrikulären Herzmuskelzellen wurde dabei durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren unterstützt. Im Anschluss wurde die so gewonnene Zellsuspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) filtriert, um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Die filtrierte Zellsuspension wurde dann bei 25 g für 3 Minuten zentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen Kardiomyozyten wurden im Powell-Medium, das zusätzlich 200 mMol/l CaCl₂ enthielt,

aufgenommen und nochmals bei 25 g für 2 Minuten zentrifugiert. Das hierbei sedimentierte Pellet wurde erneut in Powell-Medium plus 400 mMol/l CaCl₂ aufgenommen und zu einer homogenen Zellsuspension aufgeschüttelt. Diese Suspension wurde auf Reagenzgläser verteilt, die zuvor mit einer ca. 10 cm hohen Flüssigkeitssäule der Gradienten-Lösung beschickt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (1 Minute bei 25 g) wurde eine Zellpopulation gewonnen, die zu 70-80 % aus stäbchenförmigen, ventrikulären Kardiomyozyten bestand.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Vor- und Ausplattierung

Um eine Anheftung der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten auf Kulturschalen zu gewährleisten, wurden diese Schalen vor dem Ausplattieren über Nacht bei 37° C mit Vorinkubationsmedium behandelt. Dieses wurde dann unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen wieder abgesaugt. Das Zellpellet mit den isolierten Kardiomyozyten wurde dann mit CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension vermischt und anschließend auf die Kulturschalen ausplattiert. Dabei wurde eine Plattierungsdichte von 5x10⁴ Zellen pro cm² erreicht. Anschließend wurden die Zellkulturen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert um eine ausreichende Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Vor der Verwendung der Kardiomyozyten zu den Messungen wurden die Kulturschalen vorsichtig mit CCT-Medium abgespült, wodurch abgerundete und nicht ausreichend angeheftete Zellen entfernt wurden. Damit konnte erreicht werden, dass die verbliebene Zellkultur zum Zeitpunkt der Messung zu 90 % aus stäbchenförmigen und angehefteten Zellen bestand.

3.2.2. Kurzzeitkulturen der isolierten Kardiomyozyten

Unter Kurzzeitkulturen versteht man frisch isolierte Kardiomyozyten, die nach der bereits beschriebenen zweistündigen Anheftungsphase unmittelbar für die entsprechenden Experimente verwendet werden. Bei dieser Kulturform bleibt die charakteristische stäbchenförmige Gestalt weitgehend erhalten. Die Zellen werden dabei serumfrei kultiviert.

3.3. Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld

3.3.1. Probenvorbereitung

Bei der Messung der Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld wurde mit Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten gearbeitet. Unmittelbar vor der Messung wurde die betreffende Kulturschale aus dem 37°C warmen Inkubator genommen und das CCT-Kulturmedium abgesaugt. Anschließend wurde die Kulturschale mit 3 ml 37°C warmen Zellkontraktionspuffer gefüllt. Je nach Versuchskriterium wurde den Kulturschalen 5 Minuten vor Messbeginn eine bestimmte Reagenz zugesetzt.

3.3.2. Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzellkontraktion

Die mit Zellkontraktionspuffer und eventuell mit Reagenz gefüllte Kulturschale wurde auf den Objektisch eines Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel verschlossen. In diesem Deckel waren vier Löcher, die so angeordnet waren, dass sie annähernd die Eckpunkte des Quadrates bildeten, welches den Kreis des Deckels maximal ausfüllt. Der Draht, der später an die Kathode des Elektrostimulators angeschlossen wurde, war durch eines dieser beiden Löcher in das Innere des Deckels geführt worden, so dass er in den Zellkontraktionspuffer in der Kulturschale eintauchen konnte. Durch ein benachbartes Loch wurde er wieder nach außen geführt. Dabei war der Draht so gebogen, dass er annähernd senkrecht in den Zellkontraktionspuffer eintauchte, dann abknickte und horizontal durch den Puffer verlief und schließlich wieder abknickte und senkrecht wieder den Puffer verließ. Mit dem Draht, der später an die Anode angeschlossen wurde, verfuhr man auf die selbe Weise. In der mit diesem Deckel verschlossenen Kulturschale lagen sich damit zwei horizontal verlaufende Drähte gegenüber, die beide in den Puffer eintauchten und Kathode und Anode darstellten. Durch Anschluss der Drähte an das Stimulationsgerät baute sich zwischen den beiden Polen ein elektrisches Feld auf, das durch die Drahtform annähernd homogen war und so zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss zwischen den beiden Drähten und durch die Zellen, die sich in diesem Feld befanden, 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, die die

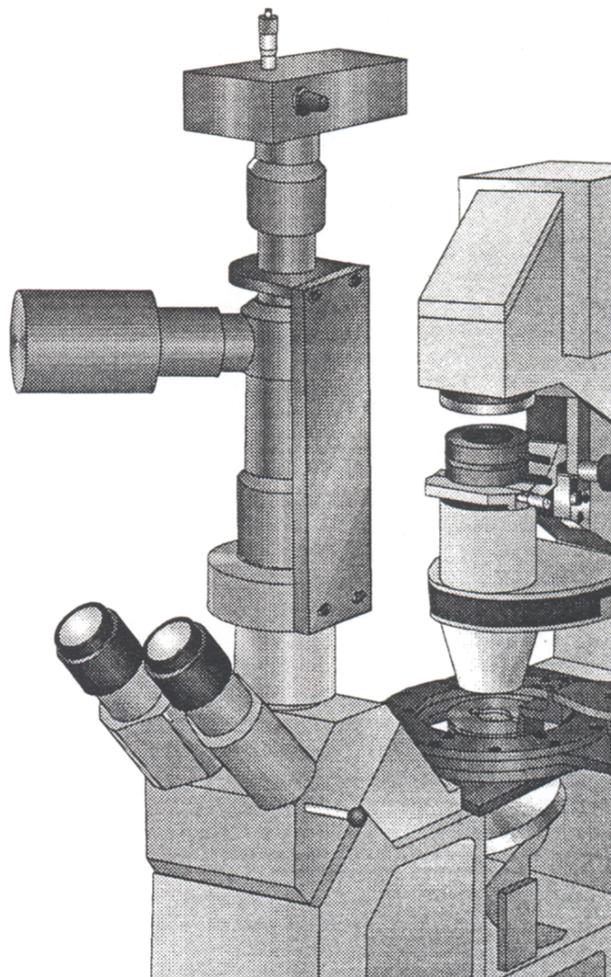
vorgegebene Frequenz nicht annahmen, wurden in den Experimenten nicht berücksichtigt. Man konnte damit den Myokardzellen verschiedene Frequenzen vorgeben, indem man die Stimulationsfrequenz änderte.

Diese Methode der Stimulation wurde bereits von Schlüter et al. 1997 beschrieben.

3.3.3. Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg erfasst. Die jeweilige Kulturschale befand sich während der elektrischen Stimulation auf dem Objektisch eines Mikroskops, durch das es möglich war die Zellen bei den Kontraktionen zu beobachten (**Abb.1**).

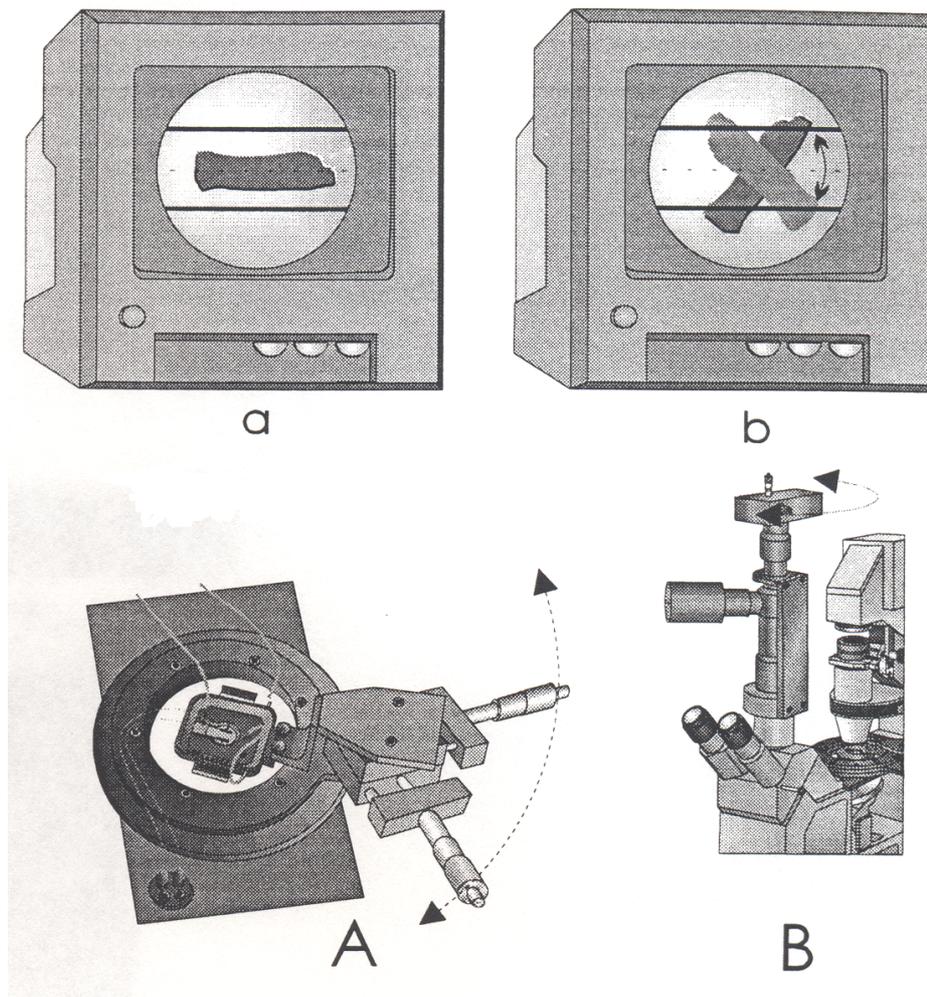
Abb. 1



Quelle: Scientific Instruments

An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen. Eine Kamera war eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor. Bei der anderen Kamera handelte es sich um eine Zeilenkamera, die in der Lage war, verschiedene Helligkeiten wahrzunehmen. Damit konnte die Kamera den hell-dunkel bzw. dunkel-hell Übergang zwischen Zelle und Hintergrund, also die Zellgrenzen, erkennen. Um nun die Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste man die Zeilenkamera so positionieren, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen, d.h. die Längsrichtung der Zelle musste annähernd parallel zur Längsrichtung der Kamerazeile sein. 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, das sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden (**Abb.2**).

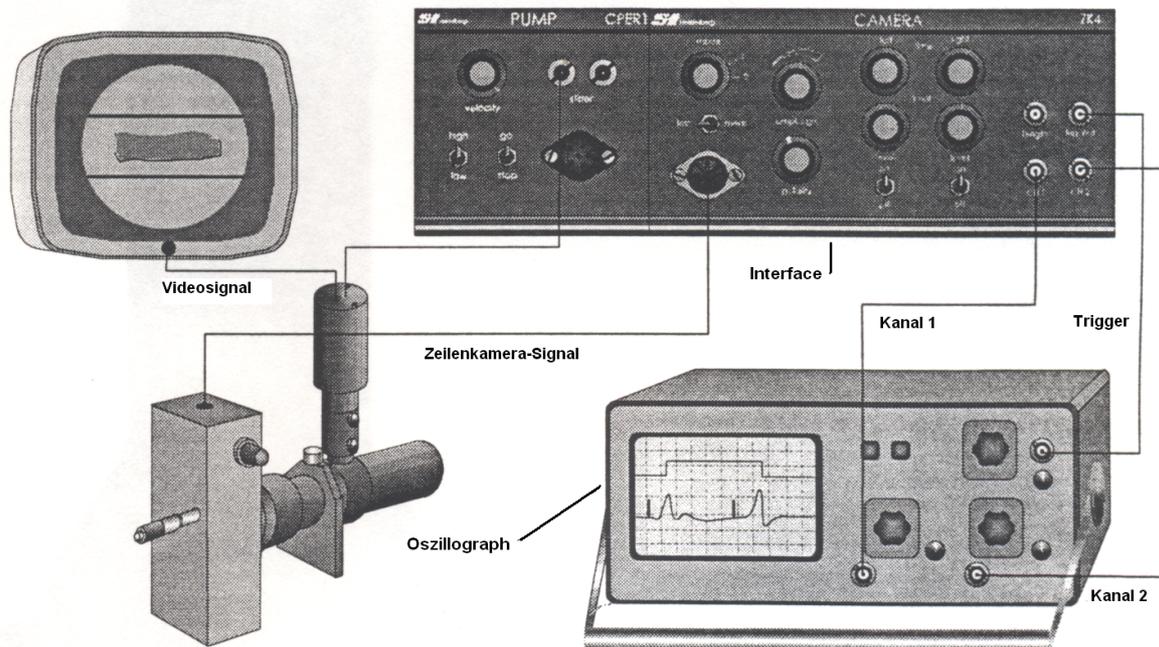
Abb. 2



Quelle: Scientific Instruments

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde über ein Interface auf einem Oszillographen dargestellt (Abb. 3).

Abb. 3

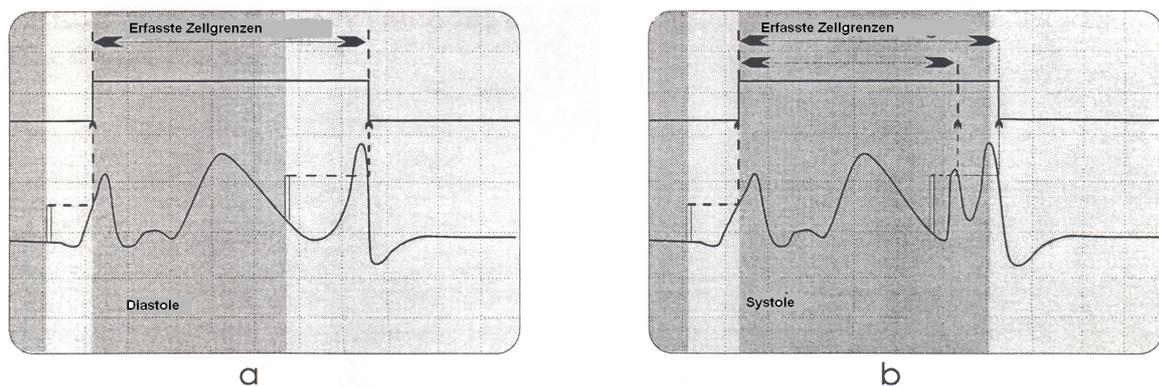


Quelle: Scientific Instruments

Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf $0,1 \text{ ms/cm}$ 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 verschieden starke y-Auslenkungen dargestellt. Diejenigen Amplituden, die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung identifiziert werden. Damit war es möglich, die Zellkontraktionen auf dem Oszillographen zu beobachten. Der Oszillograph wurde als Zweikanaloszillograph 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 die Spannung nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface auf folgende Weise getriggert: Man setzte eine Triggermarke des Interface, die ebenfalls vom Interface auf dem Oszillographen 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 die Triggermarke vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude der Triggermarke), 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 der der Triggerwert 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 (**Abb. 4**). Man konnte also die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen beobachten. An der anderen Zellkante verfuhr man analog.

Abb. 4



Quelle: Scientific Instruments

Die Information Interface-Spannung „An“ bzw. Interface-Spannung „Aus“ wurde vom Oszillographen an das Interface weitergegeben, welches sie wiederum an einen Computer weiterleitete. Auf diesem Computer lief das Programm MUCCELL der Firma Scientific Instruments GmbH. Dieses Programm registrierte aus der Information Spannung „An“ bzw. „Aus“ die Länge der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Anhand der Zelllänge zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Zeit darstellte, also eine Kurve, die die Kontraktion der Zelle darstellte. Der Computer erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion.

Er nahm 5 Kontraktionen auf und ermittelte folgende Mittelwerte aus den jeweiligen 5 Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometer
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometer
3. Die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (time to peak in Millisekunden)
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (Rel_{max})
6. Die Zeit von der 10 %-igen Kontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90 % der Zellverkürzungsstrecke

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

1. Der Quotient dL/L : Man bildete die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge und dividierte diese Differenz durch die diastolische Zelllänge. In Prozent ausgedrückt gibt dL/L an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
2. Die Con_{Rate} als Ratenkonstante für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit: Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wurde durch die Zelllänge der betreffenden Zelle dividiert, um so die Geschwindigkeit auf die Länge zu normieren. Die Con_{max} wurde in der Einheit $[s^{-1}]$ angegeben.
3. Die Rel_{Rate} als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit: Analog zur Con_{max} wurde die maximale Relaxationsgeschwindigkeit durch die Zelllänge dividiert und in der Einheit $[s^{-1}]$ angegeben.

3.3.4. 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 weiterverarbeitet: Aus diesen jeweiligen ersten vier Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt. Danach änderte man die Frequenz und maß die Zelle auf gleiche Weise bei 0,5 Hz und 2 Hz aus.

Pro Kulturschale wurden je 3 Zellen untersucht. Pro Zellkultur und damit pro Rattenherz-Präparation wurden jeweils 6 Kulturschalen untersucht, also insgesamt 18 Zellen. Von diesen 6 Schalen wurde je eine Schale für Kontrollmessungen benutzt, in die keine Reagenz zugegeben wurde. Den übrigen Schalen wurde eine Reagenz zugesetzt.

SNAP 1-100												
	Messung	L max	t peak	Kon. Max	T 10% peak	Rel. Max peak to 10%	integral	L. syst	L. diast	dL/L		
1. Zelle	1.0 Hz	1	-8,106	116	-1,3	92	1,17	86	-1,025	104,88	113,086	-7,168
		2	-8,985	119	-1,45	96	1,39	48	-1,238	104,882	113,867	-7,891
		3	-8,985	120	-1,45	95	1,49	69	-1,378	104,785	113,77	-7,898
		4	-8,497	120	-1,31	96	1,35	48	-1,337	104,887	113,184	-7,507
	Mittelwert		-8,643	118,750	-1,378	94,750	1,350	62,750	-1,245	104,834	113,477	-7,616
	Standardabw.		0,369	1,639	0,073	1,639	0,116	15,928	0,137	0,109	0,345	0,303
	Median		-8,741	119,5	-1,38	95,5	1,37	58,5	-1,2875	104,8335	113,477	-7,699
	1.0 Hz	5	-9,375	130	-1,45	106	1,44	74	-1,703	104,687	114,062	-8,219
	0.5 Hz	6	-8,887	132	-1,45	107	1,4	69	-1,582	104,687	113,574	-7,825
		7	-9,083	134	-1,45	110	1,34	83	-1,471	104,785	113,868	-7,977
	8	-8,985	135	-1,45	109	1,31	69	-1,056	104,887	113,672	-7,904	
Mittelwert		-9,083	132,750	-1,450	108,000	1,373	73,750	-1,604	104,712	113,734	-7,981	
Standardabw.		0,183	1,920	0,000	1,581	0,051	5,717	0,088	0,042	0,187	0,147	
Median		-9,034	133	-1,45	108	1,37	71,5	-1,62	104,687	113,77	-7,941	
2. Zelle	1.0 Hz	9	-10,743	122	-1,75	98	2,22	23	-2,98	104,296	115,039	-9,339
		10	-12,11	120	-2,54	96	2,55	15	-3,347	104,101	116,211	-10,421
		11	-13,282	120	-2,74	96	2,68	12	-3,662	103,906	117,188	-11,334
		12	-13,477	120	-2,74	94	2,77	12	-3,581	103,906	117,285	-11,491
	Mittelwert		-12,403	120,500	-2,443	96,000	2,555	15,500	-3,368	104,028	116,431	-10,846
	Standardabw.		1,092	0,866	0,408	1,414	0,209	4,500	0,261	0,187	0,907	0,858
	Median		-12,696	120	-2,64	96	2,615	13,5	-3,454	104,0035	116,6995	-10,877
	1.0 Hz	13	-16,114	133	-2,91	104	2,1	56	-2,832	118,75	134,864	-11,948
		14	-16,114	132	-2,91	104	2,26	22	-2,598	118,457	134,571	-11,974
		15	-15,821	133	-3,09	104	2,07	28	-2,607	118,164	133,985	-11,808
	16	-15,723	133	-2,92	106	2,03	32	-2,619	118,066	133,789	-11,752	
Mittelwert		-15,943	132,750	-2,958	104,500	2,115	34,500	-2,664	118,359	134,902	-11,871	
Standardabw.		0,174	0,433	0,077	0,866	0,087	12,913	0,097	0,288	0,434	0,093	
Median		-15,9675	133	-2,915	104	2,085	30	-2,613	118,3105	134,278	-11,878	
3. Zelle	1.0 Hz	17	-16,114	143	-2,92	114	2,19	67	-2,937	118,066	134,18	-12,009
		18	-15,04	140	-2,76	113	2,08	83	-2,751	117,871	132,911	-11,316
		19	-14,844	140	-2,93	112	2,04	78	-2,856	117,871	132,715	-11,185
		20	-14,747	140	-2,75	111	1,84	77	-2,847	117,968	132,715	-11,112
	Mittelwert		-15,186	140,750	-2,840	112,500	2,038	76,250	-2,748	117,944	133,130	-11,405
	Standardabw.		0,546	1,299	0,085	1,118	0,127	5,804	0,117	0,081	0,611	0,356
	Median		-14,942	140	-2,84	112,5	2,06	77,5	-2,7035	117,9195	132,813	-11,250
	1.0 Hz	21	-15,235	127	-2,94	99	1,96	12	-4,382	117,382	132,617	-11,488
	2.0 Hz	22	-18,848	135	-3,47	108	2,37	20	-6,088	116,992	135,84	-13,875
		23	-20,411	137	-3,67	112	2,45	25	-6,882	116,308	136,719	-14,929
	24	-20,411	136	-3,68	108	2,46	30	-7,031	115,82	136,231	-14,983	
Mittelwert		-18,726	133,750	-3,440	106,750	2,310	21,750	-6,091	116,626	135,352	-13,819	
Standardabw.		2,114	3,961	0,301	4,763	0,205	6,647	1,049	0,603	1,609	1,416	
Median		-19,6295	135,5	-3,57	108	2,41	22,5	-6,475	116,65	136,0355	-14,402	
3. Zelle	1.0 Hz	25	-8,887	147	-1,38	120	1,11	34	-1,727	110,058	118,945	-7,472
		26	-8,887	148	-1,38	120	1,02	34	-1,791	110,058	118,945	-7,472
		27	-9,18	148	-1,38	121	1,05	34	-1,809	110,058	119,238	-7,699
		28	-9,278	148	-1,38	123	1,11	35	-1,757	110,058	119,536	-7,775
	Mittelwert		-9,058	147,750	-1,380	121,000	1,073	34,250	-1,771	110,058	119,116	-7,604
	Standardabw.		0,174	0,433	0,000	1,225	0,039	0,433	0,032	0,000	0,174	0,135
	Median		-9,0335	148	-1,38	120,5	1,08	34	-1,774	110,058	119,0915	-7,585
	0.5 Hz	29	-10,645	164	-1,52	137	1,14	32	-2,314	110,156	120,801	-8,812
		30	-10,157	160	-1,52	132	1,14	42	-2,245	110,253	120,41	-8,435
		31	-9,571	160	-1,38	133	1,05	40	-2,053	110,253	119,824	-7,988
	32	-9,278	162	-1,38	135	0,98	36	-2,033	110,253	119,531	-7,762	
Mittelwert		-9,913	161,500	-1,450	134,250	1,078	37,500	-2,161	110,229	120,142	-8,249	
Standardabw.		0,528	1,658	0,070	1,920	0,067	3,841	0,121	0,042	0,495	0,405	
Median		-9,864	161	-1,45	134	1,095	38	-2,149	110,253	120,117	-8,211	
3. Zelle	2.0 Hz	33	-10,352	144	-1,52	116	1,25	23	-3,508	109,863	120,215	-8,611
		34	-14,454	146	-2,23	119	1,72	24	-5,191	109,375	123,829	-11,673
		35	-15,04	147	-2,98	120	1,92	22	-5,386	109,092	124,122	-12,117
		36	-15,04	144	-3,17	116	1,83	25	-5,415	108,789	123,829	-12,146
	Mittelwert		-13,722	145,250	-2,475	117,750	1,855	23,500	-4,875	109,277	122,999	-11,137
	Standardabw.		1,960	1,299	0,654	1,785	0,238	1,118	0,794	0,397	1,612	1,470
Median		-14,747	145	-2,605	117,5	1,77	23,5	-5,2885	109,2285	123,829	-11,895	

Abb. 5: Zusammengefasste Auswertung für eine Kulturschale (Messung von 3 Zellen) nach Zugabe einer Reagenz (SNAP)

3.3.5. Auswertung der Kontraktionsparameter und statistische Berechnung

Bei der Auswertung der Kontraktionsparameter wurden die in den Experimenten erhaltenen Mediane betrachtet, also pro Zelle und pro Frequenz jeweils ein Wert. Die Auswertung der Kontraktionsparameter erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS. Wurden zwei Teilerperimente miteinander verglichen (z.B. Schale mit oder ohne SNAP), so wurden die erhaltenen Parameter mit dem t-Test verglichen. Die jeweilige Arbeitshypothese wurde verworfen, wenn das Signifikanzniveau, bzw. der p-Wert, Werte über 0,05 annahm. Wurden mehrere Gruppen untereinander verglichen, so wurde zunächst mit dem ANOVA-Test eine Varianzanalyse durchgeführt. Deutete dieser Test Unterschiede zwischen den Gruppen an, wurde zur post hoc Analyse der Student-Newman-Keuls-Test angewandt. Auch hier wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 als signifikant betrachtet.

3.3.6. Darstellung der Experimentiererergebnisse

Die Ergebnisse wurden in Graphen und in Tabellen dargestellt. Man wählte die folgende Tabellenform für die tabellarische Darstellung:

In die ganz linke Spalte wurde die Reagenz eingetragen, mit der die Zellen (bzw. die Kulturschalen) inkubiert worden waren. Danach folgte die Spalte mit der Anzahl aller auf diese Weise untersuchten Zellen (als „n“ bezeichnet), wobei hier Zellen verschiedener Schalen und Präparationen zusammengefasst wurden. Danach folgten die Spalten mit den untersuchten Parametern. In jeder dieser Spalten wurden die Mittelwerte aller erhobenen Mediane der entsprechenden Kontraktionsparameter wie in 3.3.4 aufgeführt, zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.3.7. Bestimmung der cAMP- und cGMP-Spiegel

Auf Kulturschalen ausplattierte Kardiomyozyten wurden mit Zellkontraktionspuffer gewaschen und anschließend mit 2 ml eiskaltem Ethanol versetzt. Danach wurden die Zellen in Plastikpipetten übertragen und in einer speziellen Anlage (Speedvac) schnell getrocknet. Zuletzt wurden dem verbleibenden Zellmaterial Wasser zugesetzt und die gewonnene Suspension bei 4°C und 10 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde dann zur Bestimmung der cAMP- und cGMP-Spiegel mittels kommerziellen Radioimmunoassay-Kit (Amersham, Braunschweig) verwandt.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeine Charakteristika des Kontraktionsverhaltens von isolierten Kardiomyozyten der Ratte

Jede in den Experimenten verwendete Zellpräparation enthielt Zellen gemischter Populationen zweier Rattenherzen. Die in der ganzen Studie verwendeten Herzmuskelzellen entstammten aus 42 unterschiedlichen Präparationen. Bei jeder Präparation wurden zu Beginn des Versuchs die basalen Kontraktionsparameter (ohne Zusatz von Reagenzien) von jeweils drei Zellen bestimmt. Dazu wurden nur Zellen ausgewählt, die sich nicht spontan kontrahierten. Im Durchschnitt zeigten weniger als 15 % aller Zellen innerhalb von 60 Sekunden spontane Kontraktionen. Die übrigen Zellen zeigten weniger als 4 spontane Kontraktionen innerhalb einer Minute. Aus diesem Kollektiv, das mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert wurde, wurden zufällig drei Zellen zur Bestimmung der Kontraktionsparameter ausgesucht. Die Messreihe wurde dann jeweils pro Zelle bei 1,0 Hz, 0,5 Hz und 2,0 Hz durchgeführt.

Die durchschnittliche prozentuale Zellverkürzung bei diesen Zellen (Gesamt 126 Zellen) betrug bei:

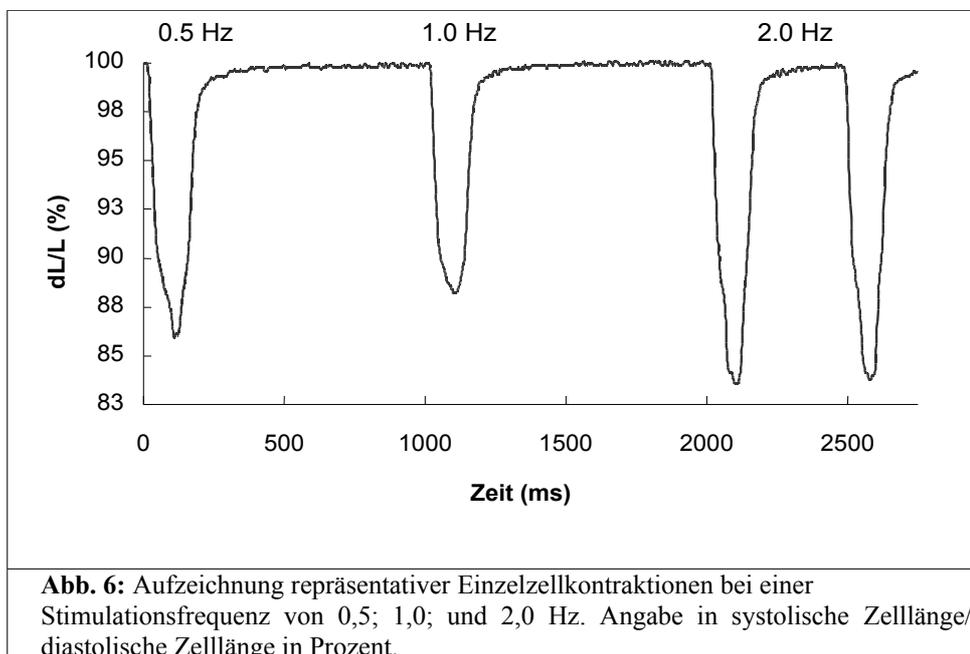
0,5 Hz – 9,00 +/- 0,22 %

1,0 Hz – 8,01 +/- 0,25 %

2,0 Hz – 8,79 +/- 0,18 %

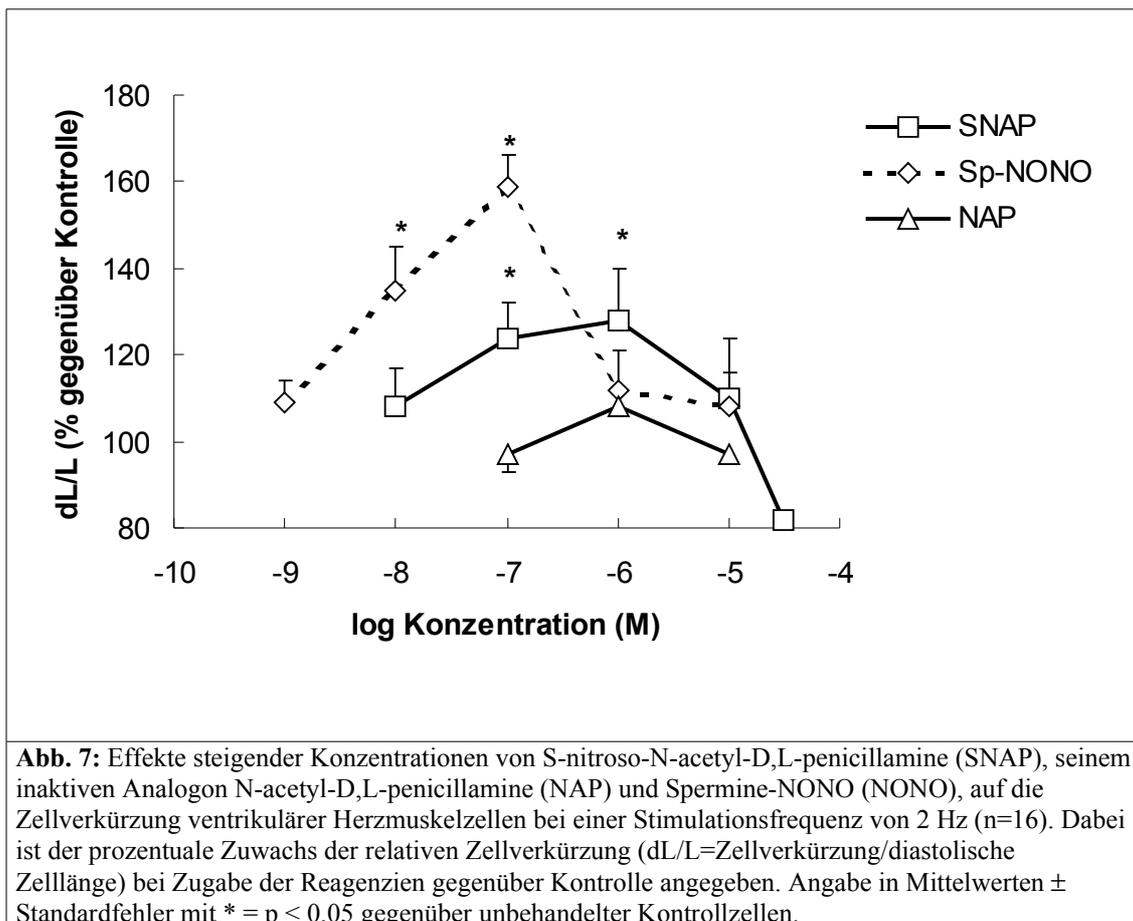
Durchschnittlich zeigten die Herzmuskelzellen der Ratte eine Abnahme der Zellverkürzung von 0,5 bis 1,0 Hz ($p=0,014$) und eine Zunahme der Zellverkürzung von 1,0 bis 2,0 Hz ($p=0,03$).

Ein repräsentatives Beispiel zeigt **Abbildung 6**. 84 % aller Zellen zeigten eine geringere Zellverkürzung zwischen 0,5 und 1,0 Hz und 78 % aller Zellen zeigten eine stärkere Zellverkürzung zwischen 1,0 und 2,0 Hz auf. Bis zu einer Frequenz von 4 Hz konnte keine Zunahme der Zellverkürzung erreicht werden. Aus diesem Grund wurden die Versuche bei Stimulationsfrequenzen von 0,5 bis 2,0 Hz durchgeführt.

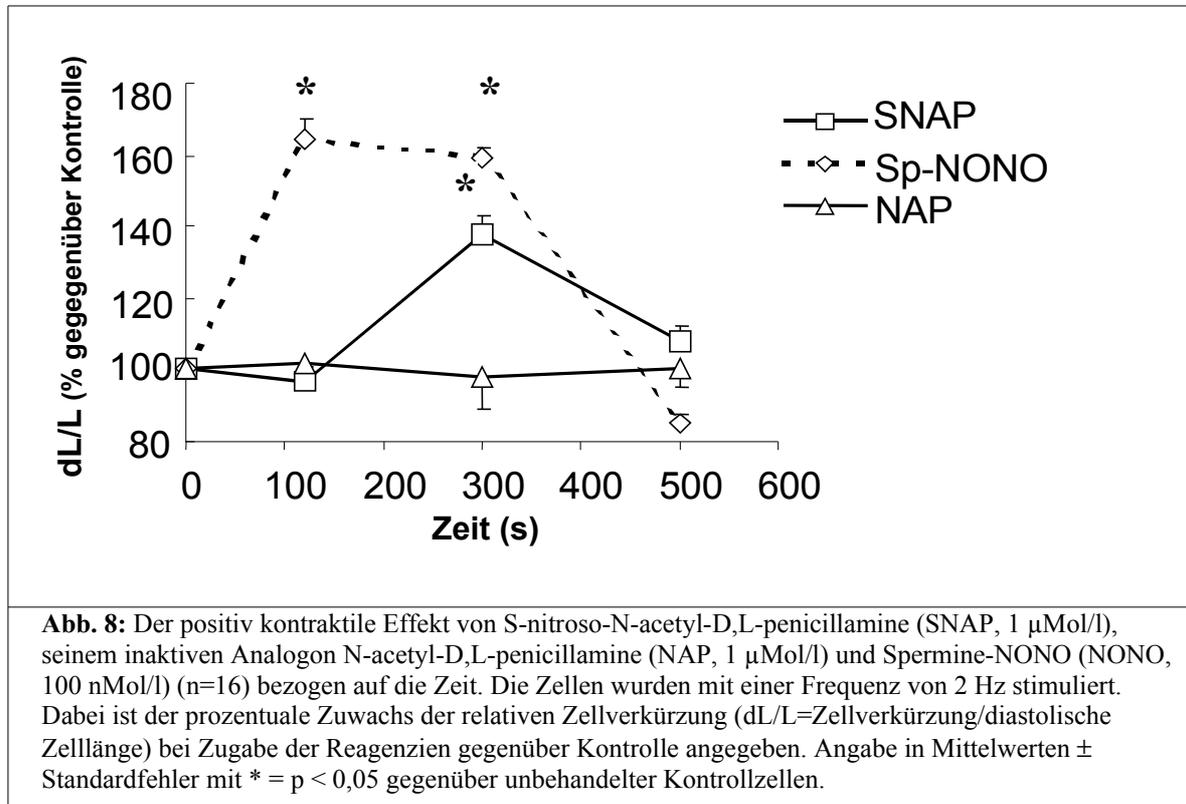


4.2. Einfluss von NO-Donatoren auf die Zellverkürzung

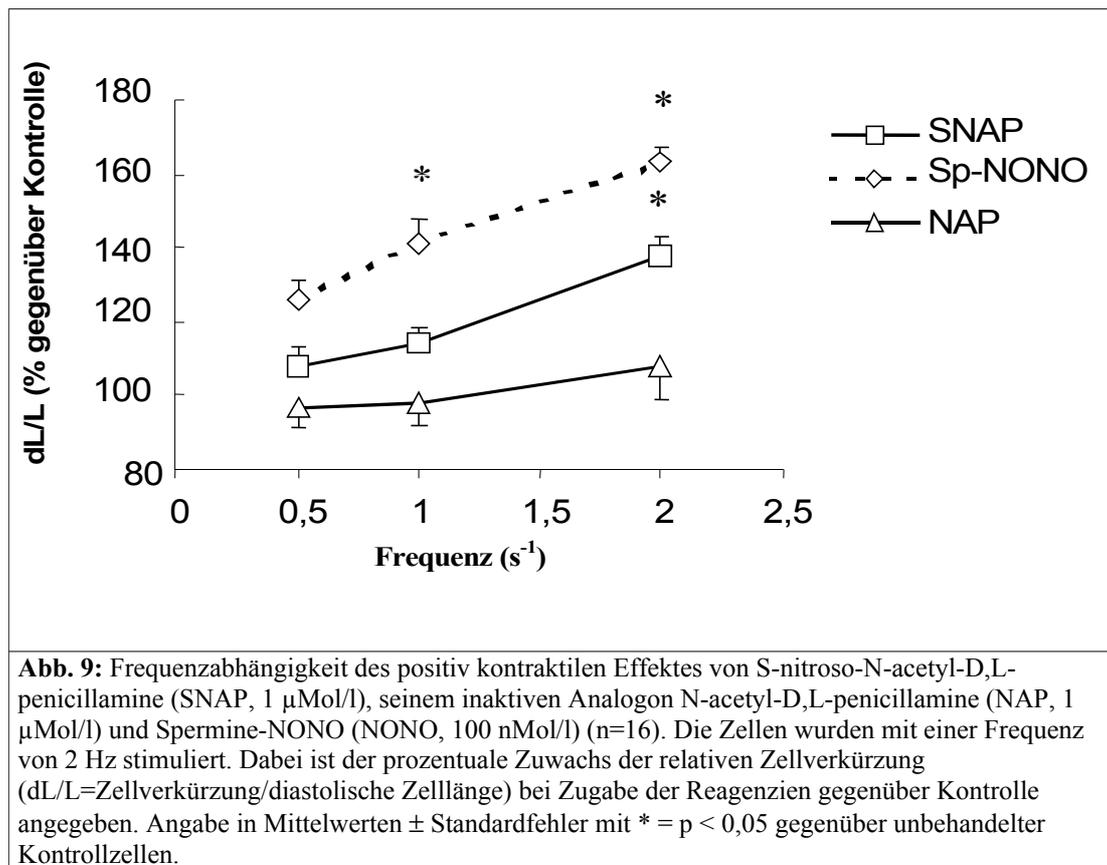
Bei einer Stimulationsfrequenz von 2,0 Hz steigern die NO-Donatoren SNAP und Spermine-NONO die prozentuale Zellverkürzung mit maximalen Effekten bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{Mol/l}$ SNAP und 100 nMol/l Spermine-NONO (**Abb. 7**). Die entsprechenden EC_{50} –Werte lagen bei 50,1 nMol/l SNAP und 7,08 nMol/l Spermine-NONO.



Die Effekte beider NO-Donatoren waren vorübergehend und erreichten eine maximale Ausprägung 300 Sekunden nach Zugabe von SNAP und 120 Sekunden nach Zugabe von Spermine-NONO (Abb. 8).



In beiden Fällen war der Effekt bei höheren Stimulationsfrequenzen ausgeprägter (**Abb. 9**).



Der Effekt von SNAP auf die Kontraktilität von Herzmuskelzellen konnten nicht durch NAP, ein inaktives Analogon zu SNAP, imitiert werden (**Abb. 7-9**).

Repräsentative Einzelzellkontraktionen in An- oder Abwesenheit von SNAP, Sp-NONO und NAP zeigt **Abbildung 10**.

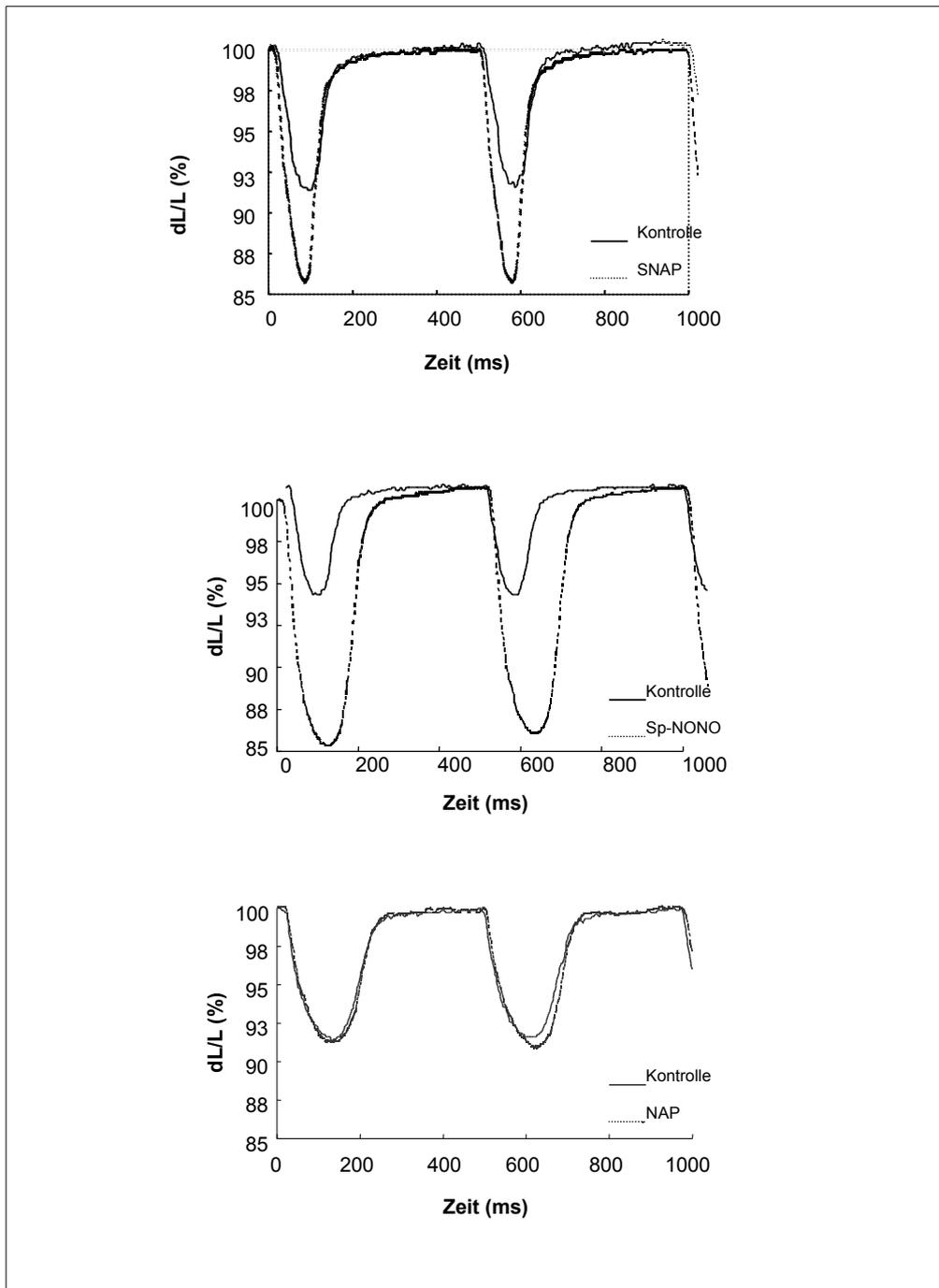


Abb. 10: Repräsentative Einzelzellkontraktionen die den maximal positiv kontraktile Effekt von S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 1 μ Mol/l), Spermine-NONO (NONO, 100 nMol/l) und N-acetyl-D,L-penicillamine (NAP, 1 μ Mol/l), zeigen. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert. Die Werte der Zellverkürzung sind als Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge in Prozent angegeben.

Die Dynamik der Zellverkürzung wurde bei einer Frequenz von 2,0 Hz genauer untersucht (**Tabelle 1**). Dabei zeigte sich, dass SNAP und Spermine-NONO an Herzmuskelzellen zu einer Zunahme der absoluten und prozentualen Zellverkürzung, der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, der Kontraktionsrate und der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit führt. Die Relaxationsparameter Relaxationsrate und die Zeit bis zu 90 % Relaxation (R90) blieben unverändert.

Tabelle 1: Vergleich des positiv kontraktiven Effekts von SNAP und Spermine-NONOate

	N	Länge (μm)	Verkürzung (μm)	dL/L (%)	TTP (ms)	Con _{max} ($\mu\text{m/s}$)	Con-Rate (s^{-1})	Rel _{max} ($\mu\text{m/s}$)	Rel-Rate (s^{-1})	R90 (ms)
Kontrolle	92	108.92±1.55	9.82±0.38	9.47±0.40	137±6	215±10	22.10±0.50	159±8	16.02±0.49	29±2
SNAP	80	108.84±2.06	12.42±0.62*	11.48±0.46*	134±8	343±42*	25.90±1.25*	284±47*	20.33±1.52	28±2
Sp-NONO	32	107.34±4.64	13.30±1.20*	11.96±0.72*	183±31*	362±40*	33.58±4.73*	256±10*	20.85±1.54	28±4

Isolierte Herzmuskelzellen wurden bei einer konstanten Frequenz von 2,0 Hz ohne Zusatz einer Reagenz (als Kontrolle) oder unter Zusatz von SNAP (1 $\mu\text{Mol/l}$) oder Spermine-NONOate (100 nMol/l) stimuliert. Die Zelllänge ist dabei in μm , die Zellverkürzung als maximale Zellverkürzung in absoluten Werten in μm und als Prozent der diastolischen Zelllänge als dL/L angegeben. Die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (TTP) und die Zeit bis zum Erreichen von 90% Relaxation der Zelle (R90) ist in ms angegeben. Die Kinetik der Zellkontraktion ist als Geschwindigkeit (Con_{max} und Rel_{max}) in $\mu\text{m/s}$ und als Konstante (Rate) in s^{-1} angegeben. Werte als Mittelwerte± Standardfehler mit * = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle.

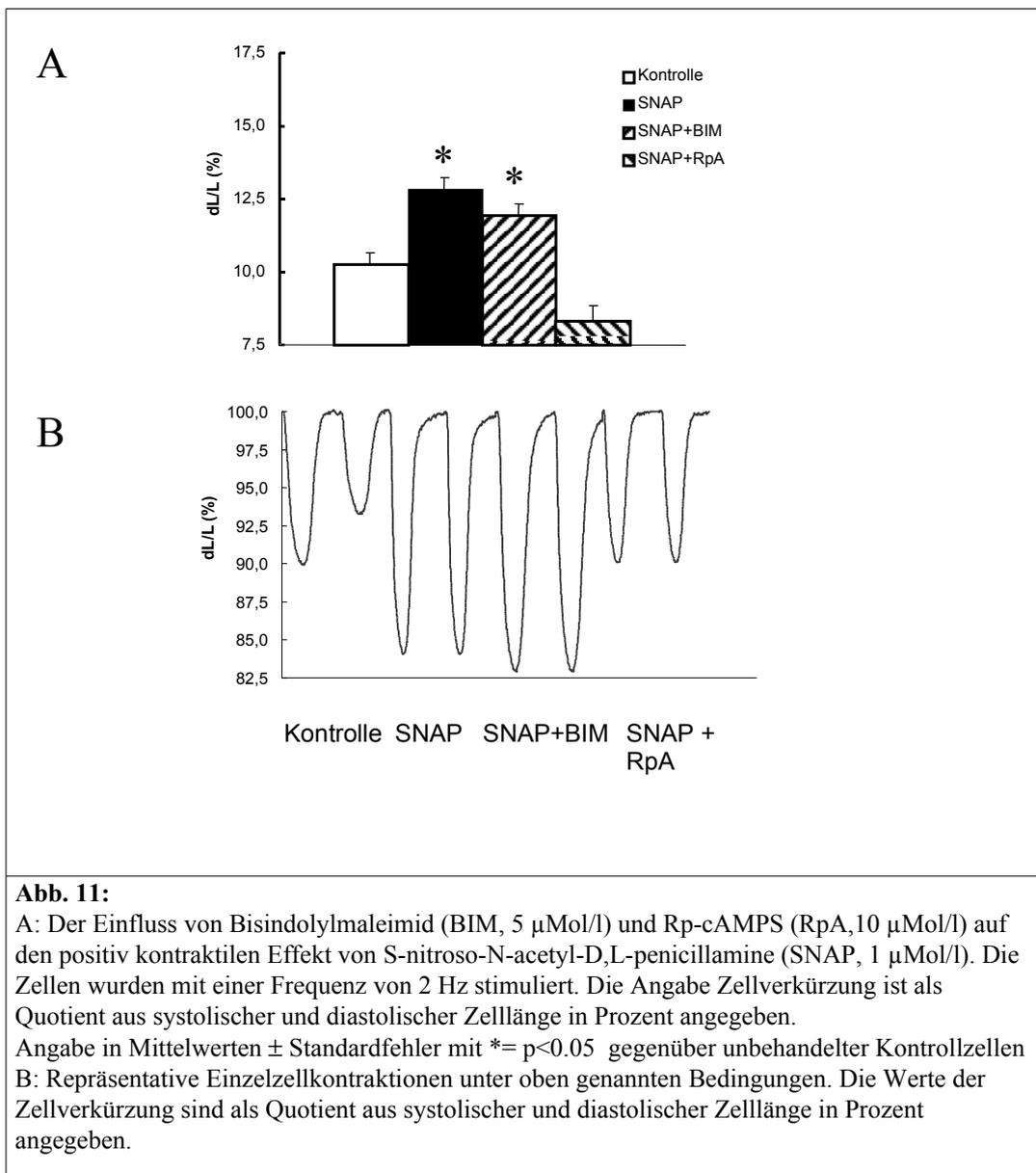
Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Stimulation der Herzmuskelzellen auf die Konzentrationen von cGMP und cAMP hat. Deren Bestimmung ergab, dass durch das Schlagen der Herzmuskelzellen die zellulären cGMP- und cAMP-Spiegel geringgradig abfallen. Nach Zugabe von SNAP (1 $\mu\text{Mol/l}$) zu Kulturschalen mit schlagenden Herzmuskelzellen stiegen die Spiegel von cGMP und cAMP deutlicher an als bei nicht schlagenden Herzmuskelzellen (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Einfluss der Kontraktion auf die zellulären cAMP und cGMP Spiegel

	Frequenz	n	cAMP (pMol/mg)	cGMP (pMol/mg)
Kontrolle	0 Hz	4	2.95±0.05	0.98±0.01
Kontrolle	2 Hz	4	2.77±0.02	0.91±0.01
SNAP	0 Hz	4	2.97±0.05	1.09±0.08*
SNAP	2 Hz	4	4.37±0.01 [#]	1.48±0.07 [#]

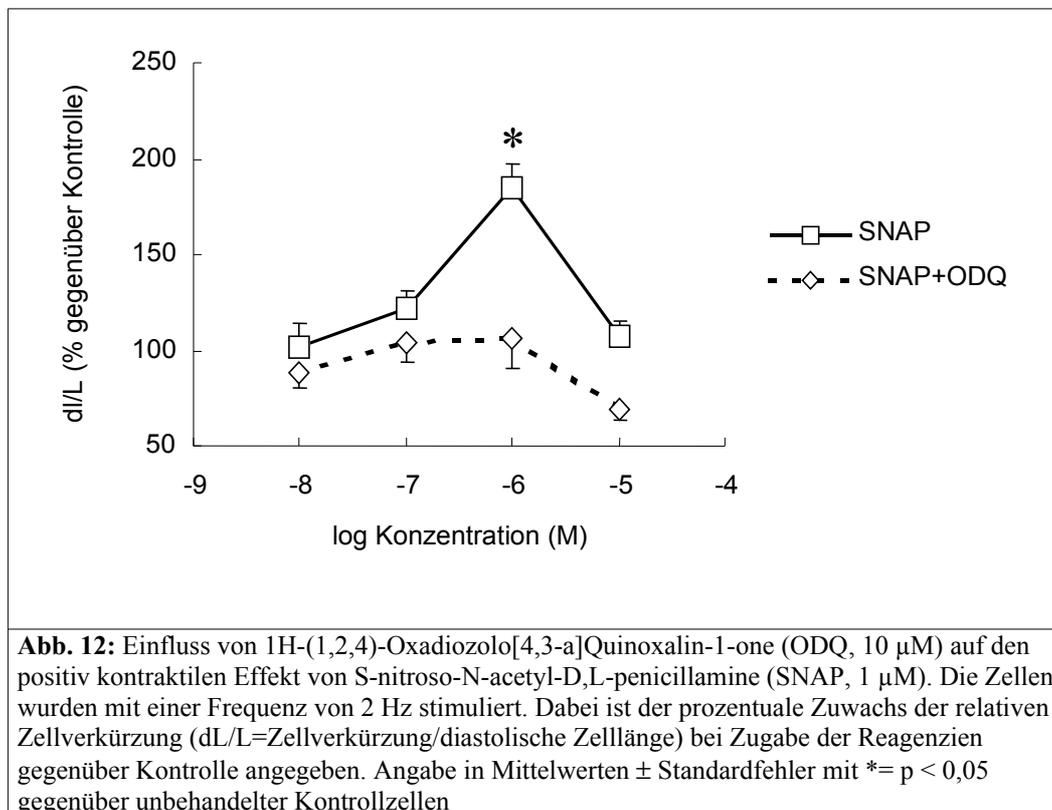
cAMP- und cGMP-Spiegel isolierter Herzmuskelzellen wurden in Ruhe ohne Zugabe einer Reagenz oder nach Inkubation mit SNAP (1 $\mu\text{mol/l}$) und jeweils nach Stimulation mit 2 Hz gemessen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler mit * = $p < 0.05$ gegenüber Kontrolle in Ruhe bzw. # $p < 0.05$ gegenüber Kontrolle bei 2 Hz.

Der positiv kontraktile Effekt, den SNAP an isolierten Herzmuskelzellen verursacht, konnte nach Vorinkubation der Zellen mit Rp-cAMPS (10 $\mu\text{Mol/l}$), welches die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase verhindert, nicht beobachtet werden. Bei Vorinkubation der Zellen mit Bisindolylmaleimid (5 $\mu\text{Mol/l}$), einem Inhibitor der PKC, blieb der positiv kontraktile Effekt von SNAP erhalten (**Abb. 11**).



4.3. Effekte von NO-Donatoren auf Kardiomyozyten unter Anwesenheit eines Inhibitors der löslichen Guanylatzyklase

Um zu untersuchen, ob der positiv kontraktile Effekt von SNAP und Spermine-NONO durch eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt wird, wurden die Zellen mit ODQ (10 $\mu\text{Mol/l}$) inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die biphasische Dosis-Wirkungskurve von SNAP durch die Coinkubation mit ODQ in eine monophasische Kurve konvertierte, was bedeutet, dass ODQ in höheren Konzentrationsbereichen den positiv kontraktilen Effekt von entsprechenden Konzentrationen an SNAP aufhebt (**Abb. 12**).



Ähnlich wie bei SNAP wurde der positiv kontraktile Effekt von Sp-NONO durch Zugabe von ODQ abgeschwächt (**Tabelle 3, Abb. 13**).

Tabelle 3: Effekt von ODQ auf den positiv kontraktile Effekt von SNAP und Spermine-NONOate auf Herzmuskelzellen

	N	Länge (μm)	Verkürzung (μm)	dL/L (%)	TTP (ms)	Con _{max} ($\mu\text{m/s}$)	Con-Rate (s^{-1})	Rel _{max} ($\mu\text{m/s}$)	Rel-Rate (s^{-1})	R90 (ms)
Kontrolle	60	109.72±1.60	9.62±0.81	8.76±1.17	147±17	205±21	21.17±1.13	153±17	15.47±0.79	35±8
ODQ	16	114.69±2.17	10.02±0.86	8.47±0.61	133±19	183±11	19.87±1.08	164±15	15.80±0.77	27±5
SNAP (1 μM)	16	111.24±5.53	16.82±1.56*	15.82±1.20*	135±15	400±34*	25.15±0.87*	298*34	17.34±1.04	24±3
SNAP (1 μM) + ODQ	16	105.95±4.21	9.80±1.34 [#]	9.05±1.14 [#]	110±13 [#]	226±20	24.31±0.80*	170±27	16.82±1.39	46±5
SNAP (10 μM)	16	117.14±2.88	10.68±1.01	9.20±0.76	123±2*	245±24	22.21±2.84	202±23	16.24±1.51	24±4
SNAP (10 μM) + ODQ	16	92.51±8.12	5.79±0.80 [#]	5.94±0.47 [#]	113±2 [#]	170±13	23.89±1.03	128±14 [#]	16.89±1.20	24±5
Sp-NONO	16	111.15±4.73	14.42±1.91*	12.86±0.31*	156±2	294±10*	32.58±2.73*	227±6*	16.44±0.76	22±1
Sp-NONO + ODQ	16	102.53±1.93	10.20±0.50 [#]	9.80±0.37 [#]	173±9	191±12 [#]	19.34±1.21 [#]	162±14 [#]	16.61±1.38	43±6

Isolierte Herzmuskelzellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 2 Hz stimuliert ohne Zugabe einer Reagenz als Kontrolle oder nach Zugabe von SNAP, Spermine-NONOate (Sp-NONO; 100 nMol/l), ODQ (10 $\mu\text{Mol/l}$) oder o.g. Kombination zweier Reagenzien. Die Zelllänge ist angegeben in μm , die Zellverkürzung als maximale Verkürzung in μm absolut und als Prozent der diastolischen Zelllänge (dL/L), die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (TTP) und von maximaler Kontraktion bis zur 90%igen Relaxation (R90) ist in ms angegeben. Die Kinetik der Kontraktion ist als Geschwindigkeit (Con_{max} und Rel_{max}) in $\mu\text{m/s}$ und als Konstante (Rate) in s^{-1} angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler * mit $p < 0.05$ gegenüber Kontrolle, bzw. # mit $p < 0.05$ gegenüber jeweiliger Reagenz ohne ODQ.

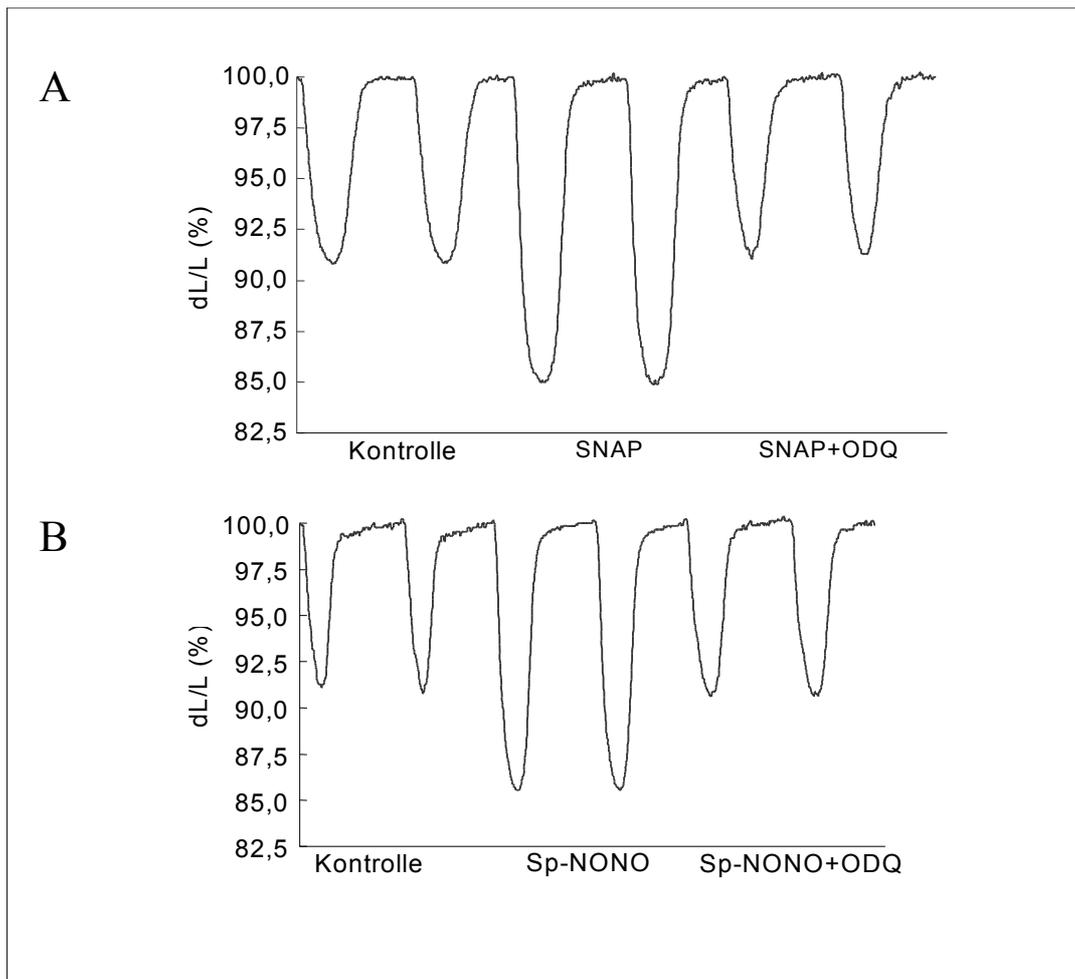


Abb. 13:

A: Repräsentative Einzelzellkontraktionen von ventrikulären Herzmuskelzellen ohne Zugabe einer Reagenz, nach Zugabe von S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 1 μ Mol/l) und nach Zugabe von S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 1 μ Mol/l) und 1H-(1,2,4)Oxadiazolo[4,3-a]Quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ Mol/l).

B: Repräsentative Einzelzellkontraktionen von ventrikulären Herzmuskelzellen ohne Zugabe einer Reagenz, nach Zugabe von Spermine-NONO (Sp-NONO, 100 nMol/l) und nach Zugabe von Spermine-NONO (Sp-NONO, 100 nMol/l) und 1H-(1,2,4)Oxadiazolo[4,3-a]Quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ Mol/l). Die Werte der Zellverkürzung sind als Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge in Prozent angegeben.

ODQ alleine verändert nicht das Kontraktionsverhalten von isolierten Kardiomyozyten (Tabelle 3, Abb. 14).

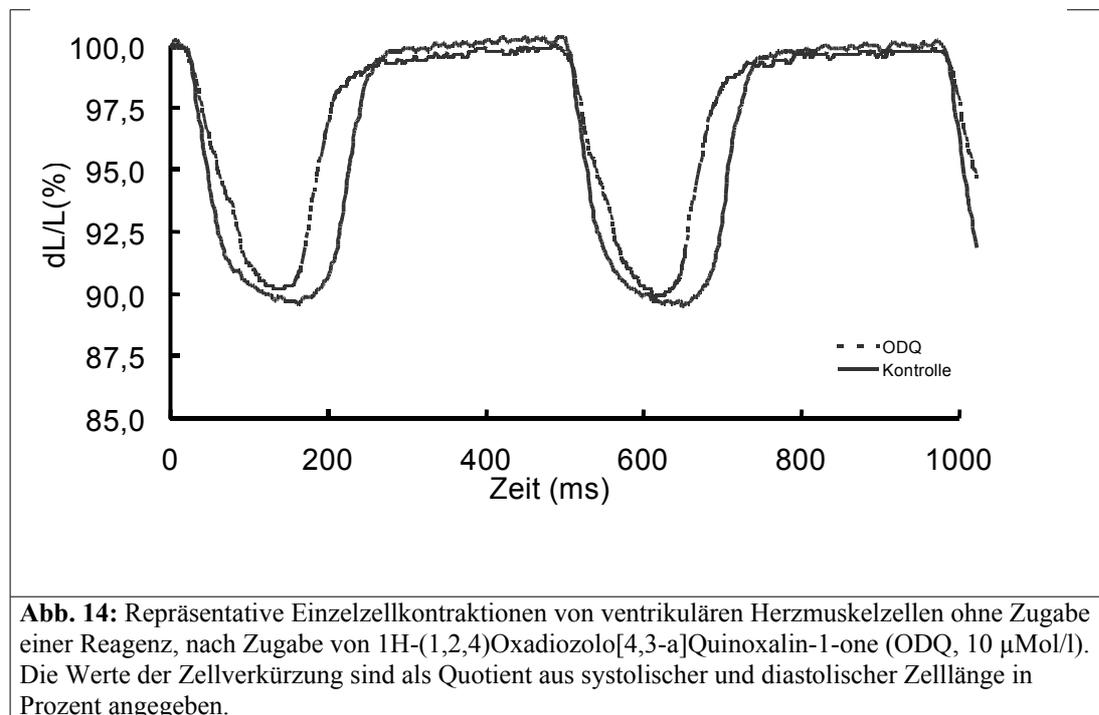


Abb. 14: Repräsentative Einzelzellkontraktionen von ventrikulären Herzmuskelzellen ohne Zugabe einer Reagenz, nach Zugabe von 1H-(1,2,4)Oxadiazolo[4,3-a]Quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ Mol/l). Die Werte der Zellverkürzung sind als Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge in Prozent angegeben.

Der Effekt von ODQ auf die Zellverkürzung unter Anwesenheit von SNAP wurde auch bei höheren Konzentrationen von SNAP (10 $\mu\text{Mol/l}$) untersucht. Unter diesen Konzentrationen veränderte SNAP selbst nicht die Kontraktilität, aber unter der Zugabe von ODQ führte dies zu einer Abnahme der Zellverkürzung (**Tabelle 3, Abb. 15**).

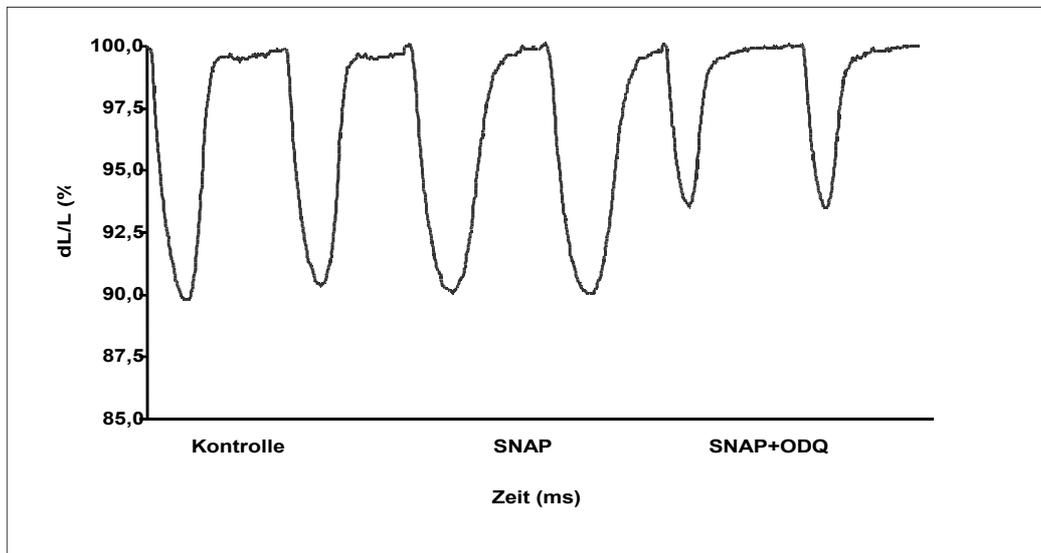


Abb. 15: Repräsentative Einzelzellkontraktionen von ventrikulären Herzmuskelzellen ohne Zugabe einer Reagenz, nach Zugabe von S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 10 $\mu\text{Mol/l}$) und nach Zugabe von S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 10 $\mu\text{Mol/l}$) und 1H-(1,2,4)Oxadiozolo[4,3-a]Quinoxalin-1-one (ODQ, 10 $\mu\text{Mol/l}$). Die Werte der Zellverkürzung sind als Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge in Prozent angegeben.

Die Bedeutung der löslichen Guanylatzyklase auf die Zellverkürzung von Kardiomyozyten wurde genauer in Experimenten untersucht, in denen die lösliche Guanylatzyklase durch YC-1 (30 $\mu\text{Mol/l}$) direkt aktiviert wurde. Wie schon bei den NO-Donatoren beobachtet, bewirkte YC-1 eine frequenzabhängige Zunahme der Zellverkürzung (**Abb. 16**).

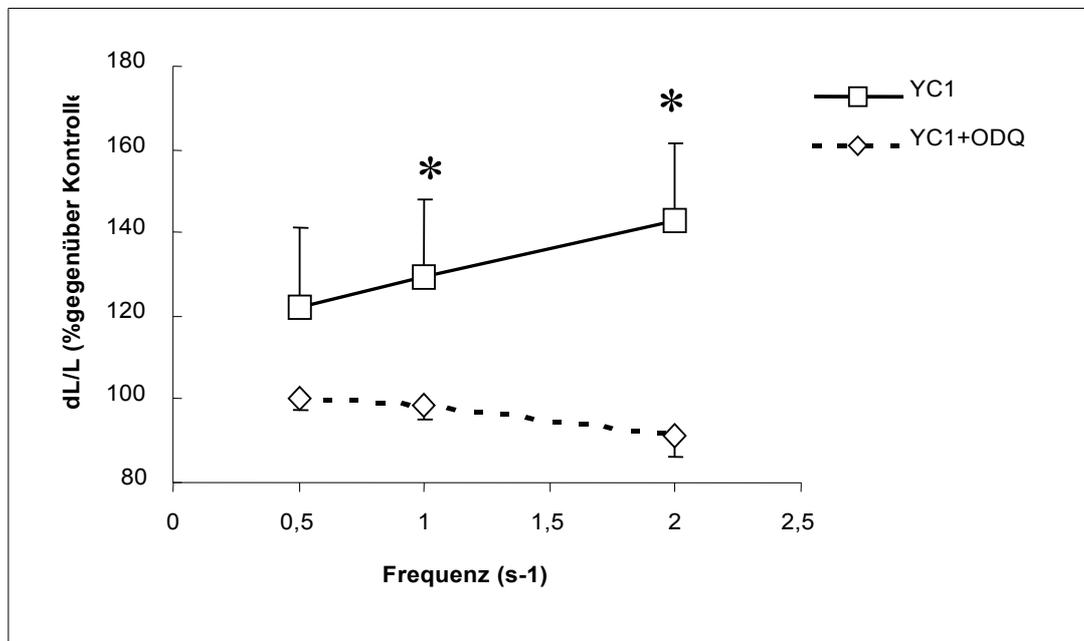


Abb. 16: Der Einfluss von 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzyl Indazol (YC1, 30 $\mu\text{Mol/l}$) und 1H-(1,2,4)Oxadiazolo[4,3-a]Quinoxalin-1-one (ODQ, 10 $\mu\text{Mol/l}$) auf die Zellkontraktion. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5, 1 u. 2 Hz stimuliert. Dabei ist der prozentuale Zuwachs der relativen Zellverkürzung ($dL/L = \text{Zellverkürzung} / \text{diastolische Zelllänge}$) bei Zugabe der Reagenzien gegenüber Kontrolle angegeben. Angabe in Mittelwerten \pm Standardfehler mit * = $p < 0.05$ gegenüber unbehandelter Kontrollzellen.

Der positiv kontraktile Effekt von YC-1 kam in einer signifikanten Zunahme der absoluten und prozentualen Zellverkürzung, der Kontraktionsrate, der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit und der Zeit bis zu 90 % der maximalen Relaxation zum Ausdruck (**Tabelle 4**).

Dieser Effekt konnte ebenfalls durch ODQ aufgehoben werden (**Abb. 16**).

Table 4: Der positiv kontraktile Effekt von YC1:

	N	Länge (μm)	Verkürzung (μm)	dL/L (%)	TTP (ms)	Con _{max} ($\mu\text{m/s}$)	Con-Rate (s ⁻¹)	Rel _{max} ($\mu\text{m/s}$)	Rel-Rate (s ⁻¹)	R90 (ms)
Kontrolle	16	89.25±4.25	7.90±0.78	9.29±0.73	131±4	214±18	27.85±1.24	130±8	14.71±1.41	39±3
YC1	16	95.62±5.42	11.39±0.92*	11.67±0.29*	171±6*	245±15	22.18±0.78*	180±67*	15.79±0.53	26±10*
YC1+ODQ	16	107.30±0.31	9.11±0.31#	8.49±0.27#	118±3#	217±12	23.82±0.39	143±8	15.68±0.71	19±1*

Isolierte Herzmuskelzellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 2 Hz stimuliert ohne Zugabe einer Reagenz als Kontrolle oder nach Zugabe von YC1 (10 $\mu\text{Mol/l}$) oder YC1+ODQ (10 $\mu\text{Mol/l}$). Die Zelllänge ist angegeben in μm , die Zellverkürzung als maximale Verkürzung in μm absolut und als Prozent der diastolischen Zelllänge (dL/L), die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (TTP) und von maximaler Kontraktion bis zur 90%igen Relaxation (R90) ist in ms angegeben. Die Kinetik der Kontraktion ist als Geschwindigkeit (Con_{max} und Rel_{max}) in $\mu\text{m/s}$ und als Konstante (rate) in s⁻¹ angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler * mit p<0.05 gegenüber Kontrolle, bzw. # mit p<0.05 gegenüber YC1.

Eine repräsentative Aufzeichnung von Einzelzellkontraktionen zeigt (**Abb. 17**).

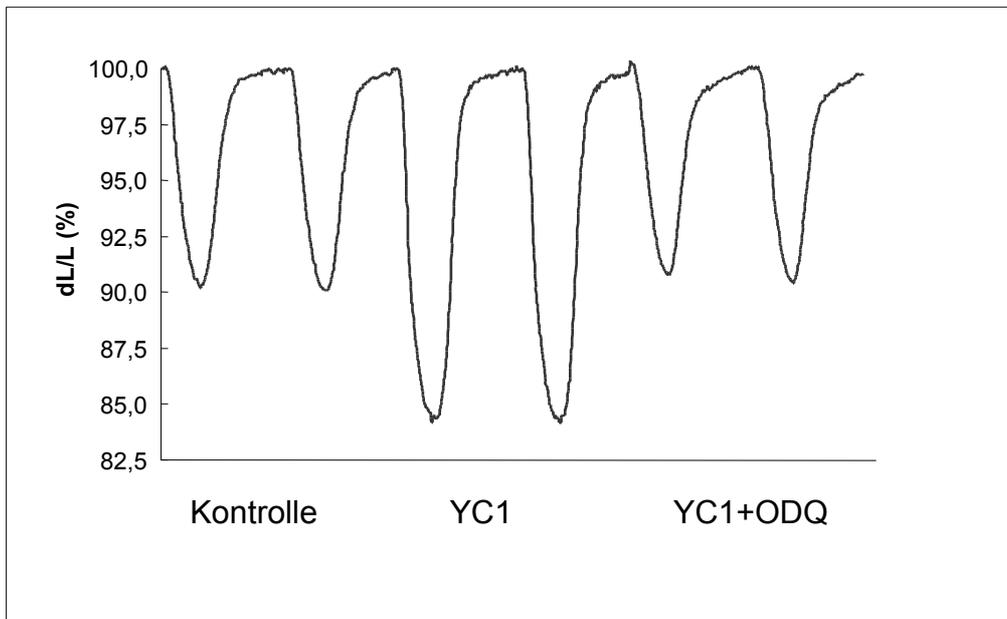
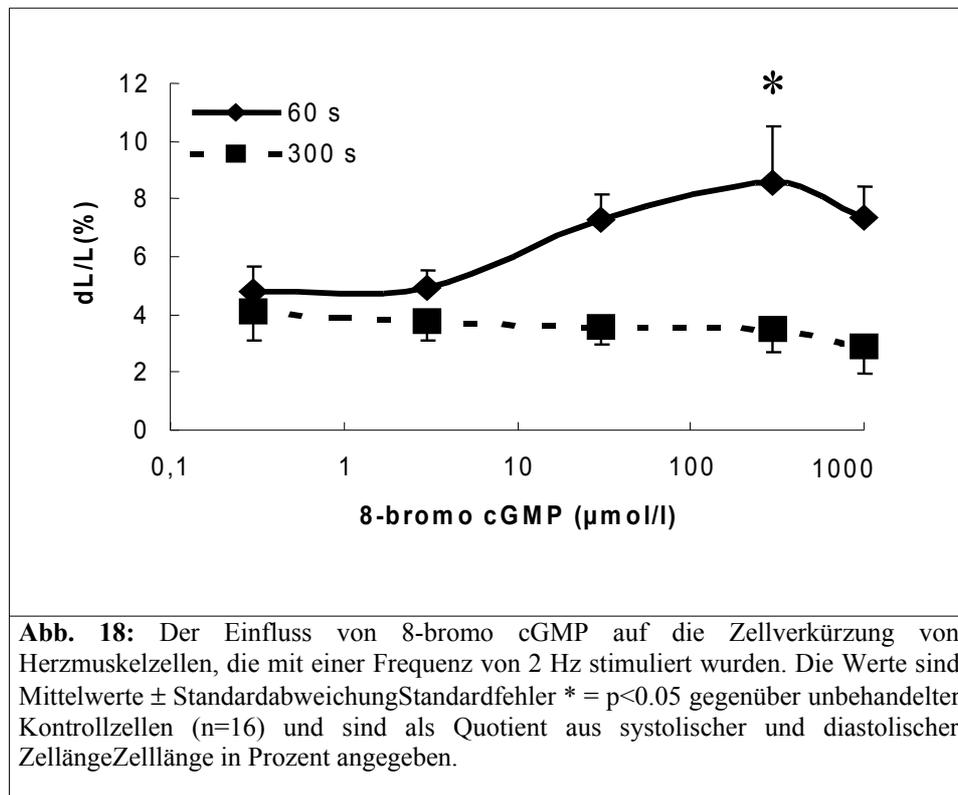


Abb. 17: Repräsentative Einzelzellkontraktionen von ventrikulären Herzmuskelzellen ohne Zugabe einer Reagenz, nach Zugabe von 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzyl Indazol (YC1, 30 $\mu\text{Mol/l}$) und YC1 plus 1H-(1,2,4)Oxadiozolo[4,3-a]Quinoxalin-1-one (ODQ, 10 $\mu\text{Mol/l}$). Die Werte der Zellverkürzung sind als Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge in Prozent angegeben.

Der direkte Effekt von cGMP auf die Zellverkürzung von ventrikulären Kardiomyozyten, die mit 2 Hz stimuliert wurden, wurde in Experimenten mit 8-Bromo-cGMP, einem cGMP-Analogon, näher untersucht. Dabei wurde 8-Bromo-cGMP in die Kulturschalen appliziert und man beobachtete anschließend eine schnelle, passagere und konzentrationsabhängige Zunahme der Zellverkürzung (Abb. 18).



4.4. Interaktion von NO mit dem β -adrenergen System

Der Anstieg der zellulären Konzentrationen von cGMP und cAMP durch SNAP ließ eine Wechselwirkung mit dem β -adrenergen System vermuten. Um genauer zu untersuchen, welcher Zusammenhang zwischen dem NO-abhängigen Anstieg von cGMP und der positiv kontraktile Antwort von SNAP besteht, wurden die Experimente mit SNAP und Isoprenalin (als β -Adrenozeptor-Agonist) durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 100 nMol/l Isoprenalin und 1 μ Mol/l SNAP inkubiert und es zeigte sich, dass die kontraktile Antwort gegenüber der Inkubation nur mit Isoprenalin deutlich gesteigert war. Diesen Effekt konnte man durch Zugabe von ODQ wieder aufheben. Durch Zugabe von YC-1 statt SNAP konnte man den zusätzlichen positiv kontraktile Effekt von SNAP imitieren (**Abb. 19A**). Repräsentative Einzelzellkontraktionen zeigt **Abb. 19B**.

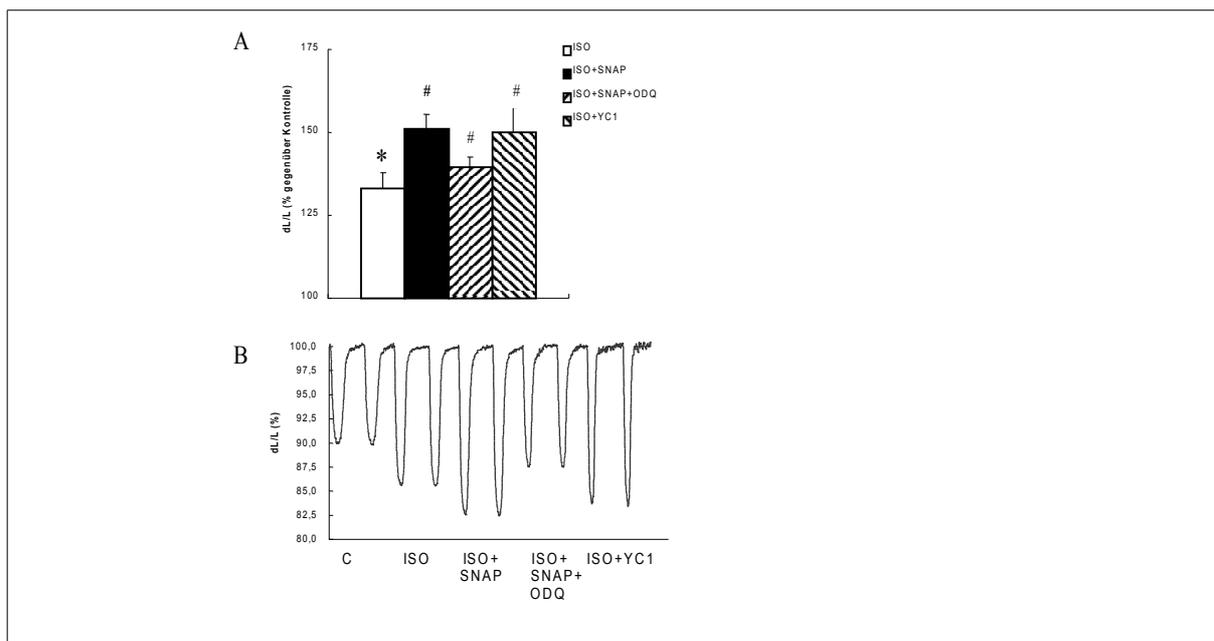


Abb. 19:

A: Der Einfluss von S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 1 μ Mol/l), 1H-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ Mol/l), 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole (YC1, 30 μ Mol/l), und die Kombination der Reagenzien auf den positiv kontraktile Effekt von Isoprenalin (ISO, 100 nMol/l). Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert. Dabei ist der prozentuale Zuwachs der relativen Zellverkürzung ($dL/L = \text{Zellverkürzung} / \text{diastolische Zelllänge}$) bei Zugabe der Reagenzien gegenüber Kontrolle angegeben. Angabe in Mittelwerten + Standardfehler * mit $P < 0,05$ gegenüber unbehandelter Kontrollzellen und # mit $P < 0,05$ gegenüber Isoprenalin alleine. **B:** Repräsentative Einzelzellkontraktionen unter den oben genannten Bedingungen. Die Werte der Zellverkürzung sind als Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge in Prozent angegeben.

Ob eine direkte Aktivierung der Adenylatzyklase durch cGMP den positiv kontraktile Effekt von NO verursacht, wurde mit Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase,

untersucht. Dabei konnte die Zellverkürzung von Forskolin nicht durch NO-Donatoren potenziert werden. (**Abb. 20, Tabelle 5**).

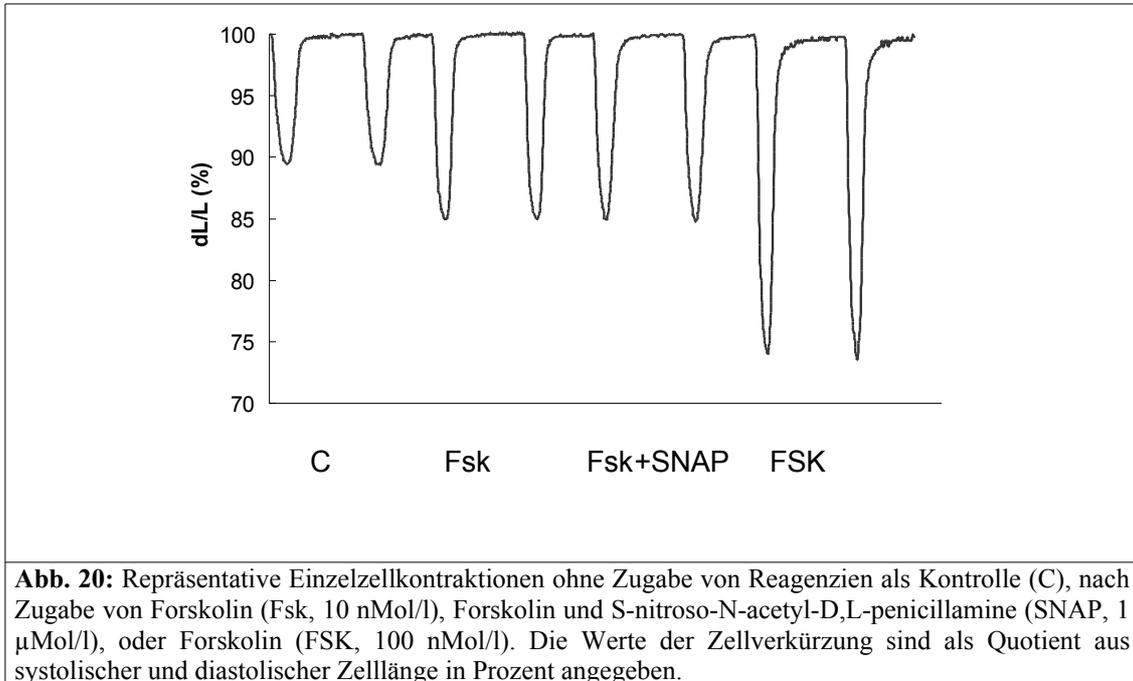


Tabelle 5: Einfluss von Sp-NONO auf den positiv kontraktile Effekt von Forskolin

	N	Länge (μ m)	Verkürzung (μ m)	dL/L (%)	TTP (ms)	Con _{max} (μ m/s)	Con-Rate (s ⁻¹)	Rel _{max} (μ m/s)	Rel-Rate (s ⁻¹)	R90 (ms)
Kontrolle	16	93.19±12.33	5.58±1.08	6.35±0.96	111±16	220±36	39.70±6.87	151±44	26.75±6.41	50±12
Forskolin	16	96.41±11.53	9.05±2.15*	8.75±1.40*	78±7*	298±37*	39.16±8.54	267±72*	32.58±7.20*	23±6*
Forskolin+ Sp-NONO	16	102.16±11.51	8.88±0.74*	8.50±0.77*	81±8*	286±32	33.97±4.19	278±60*	33.71±7.13*	30±11*
FORSKOLIN	8	106.99±6.84	17.64±1.05* [#]	16.49±0.68* [#]	85±1*	645±52* [#]	36.57±11.21	537±11* [#]	30.44±3.71	11±1* [#]

Isolierte Herzmuskelzellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 2 Hz stimuliert ohne Zugabe einer Reagenz als Kontrolle oder nach Zugabe von Spermine-NONOate (Sp-NONO; 100 nmol/l), Forskolin (10 nmol/l), FORSKOLIN (100 nmol/l) oder o.g. Kombination zweier Reagenzien. Die Zelllänge ist angegeben in μ m, die Zellverkürzung als maximale Verkürzung in μ m absolut und als Prozent der diastolischen Zelllänge (dL/L), die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (TTP) und von maximaler Kontraktion bis zur 90%igen Relaxation (R90) ist in ms angegeben. Die Kinetik der Kontraktion ist als Geschwindigkeit (Con_{max} und Rel_{max}) in μ m/s und als Konstante (Rate) in s⁻¹ angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler * mit p<0.05 gegenüber Kontrolle, bzw. # mit p<0.05 gegenüber Forskolin.

4.5. Interaktion von SNAP mit der α_s -Untereinheit von G-Proteinen

Um die Wechselwirkung von cGMP mit dem β -adrenergen System genauer zu untersuchen wurden die Zellen zunächst mit 100 nMol/l Isoprenalin und 1 μ Mol/l SNAP inkubiert, was den bekannten positiv kontraktile Effekt zeigte. Anschließend wurden beide Substanzen jeweils mit NF 449 (10 μ Mol/l), einem potenten Antagonisten an der α_s -Untereinheit von G-Proteinen (Hohenegger et al., 1998) inkubiert. Die alleinige Inkubation der Kardiomyozyten mit NF 449 veränderte nicht die Zellverkürzung der Zellen (Abb. 20B). Bei Zugabe von NF449 zu mit SNAP vorinkubierten Zellen hingegen kam es zu einer signifikanten Inhibierung des positiv kontraktile Effekts von SNAP (Abb. 20A). Wie erwartet inhibierte NF449 auch den positiv kontraktile Effekt von Isoprenalin. Die Aufzeichnung repräsentativer Einzelzellkontraktionen zeigt Abb. 20B.

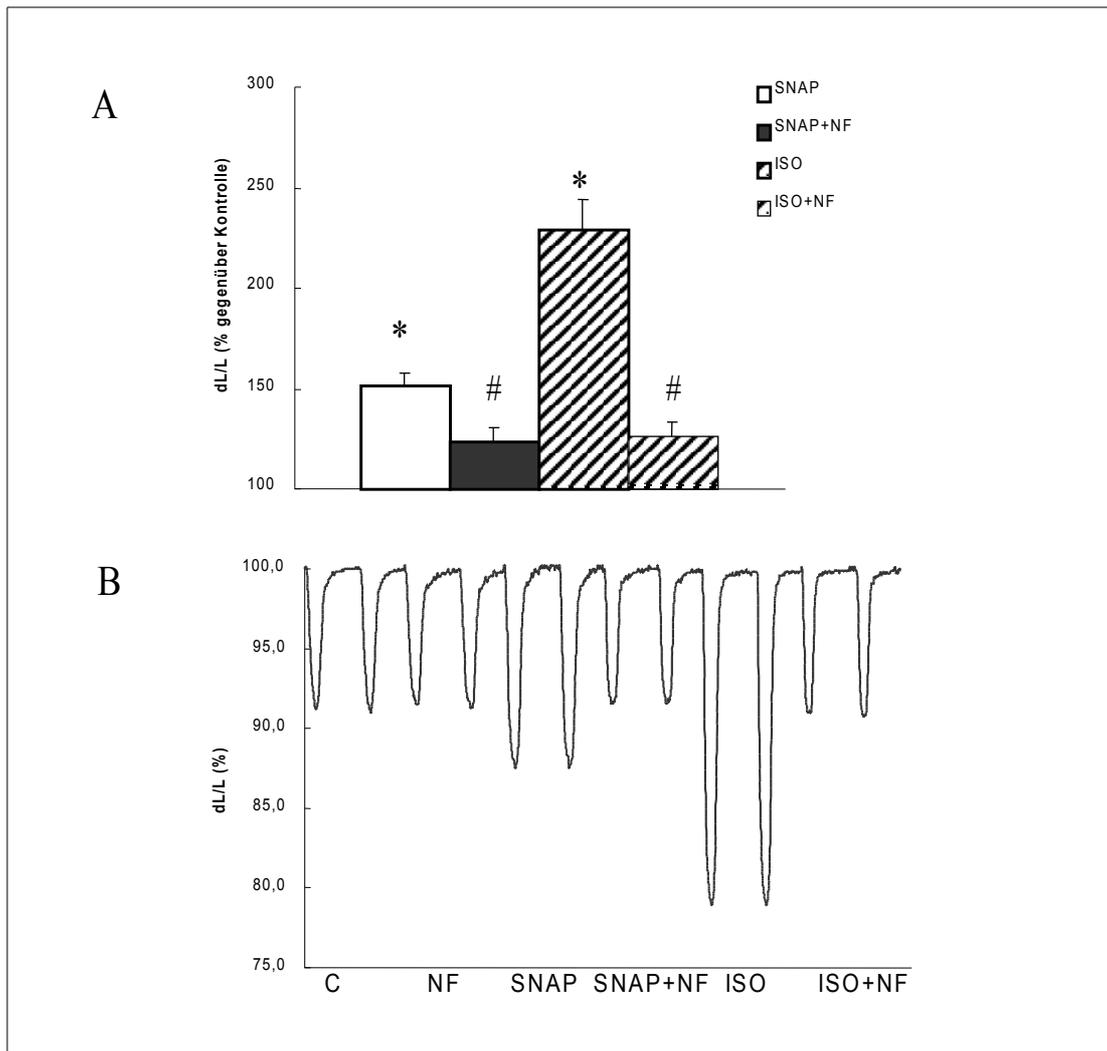


Abb. 21:

A: Der Einfluss von (4,4',4'',4''')-[carbonyl-bis-[imino-5,1,3-benzenetriyl-bis-(carbonylimino)]]tetrakis-(benzene-1,3-disulfonate) (NF449, NF, 10 $\mu\text{Mol/l}$) auf den positiv kontraktile Effekt von S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 1 $\mu\text{Mol/l}$) und Isoprenalin (ISO, 100 nMol/l). Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert. Dabei ist der prozentuale Zuwachs der relativen Zellverkürzung ($dL/L = \text{Zellverkürzung} / \text{diastolische Zelllänge}$) bei Zugabe der Reagenzien gegenüber Kontrolle angegeben. Angabe in Mittelwerten + Standardfehler * mit $P < 0,05$ gegenüber unbehandelter Kontrollzellen und # mit $P < 0,05$ gegenüber keiner Zugabe von NF.

B: Repräsentative Einzelzellkontraktionen unter den oben genannten Bedingungen. Die Werte der Zellverkürzung sind als Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge in Prozent angegeben.

5. Diskussion

5.1. Hauptbefunde

In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz geeigneter Agonisten und Antagonisten der Mechanismus des positiv kontraktiven Effekts von NO an isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte im Bereich positiver Zellverkürzungs/Frequenz-Beziehung dargelegt werden. Dabei wurden die folgenden Befunde erhoben.

5.1.1. Beteiligung von cGMP am positiv kontraktiven NO-Effekt

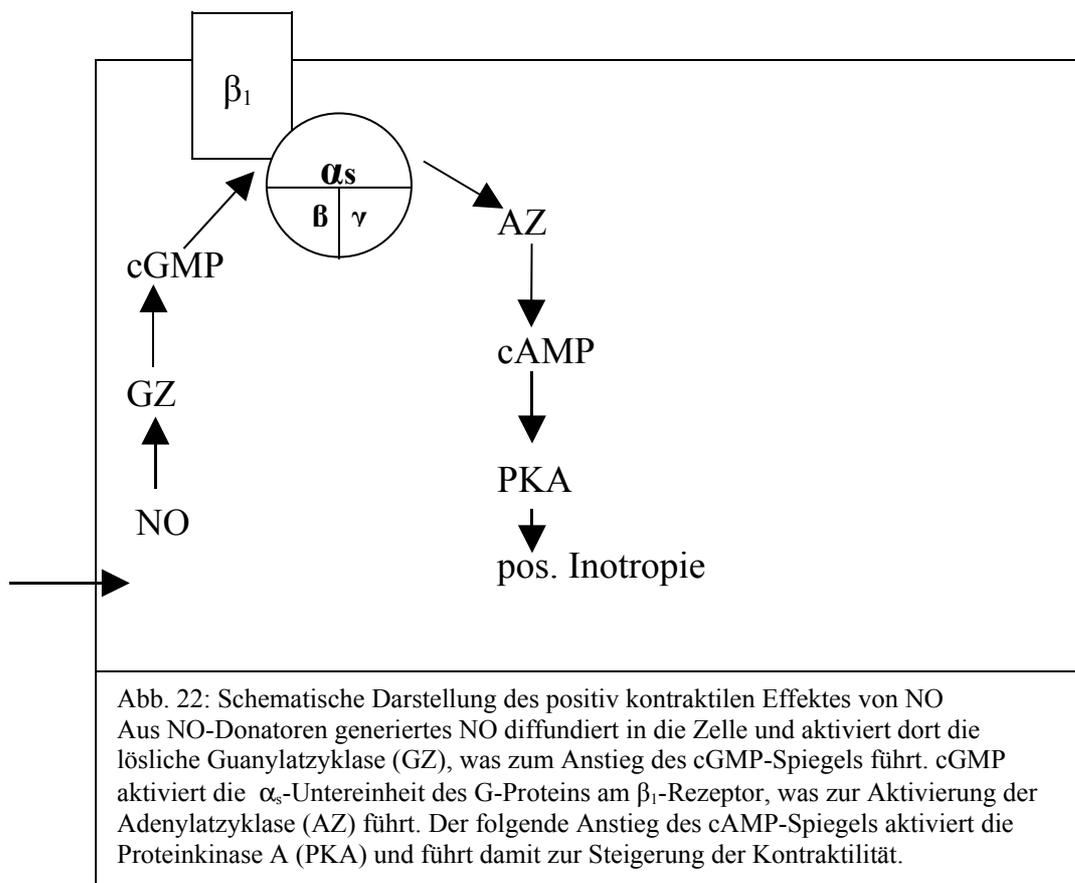
Unter Zugabe niedriger Konzentrationen von NO-Donatoren wurde eine signifikante Zunahme der Zellverkürzung beobachtet, gemessen an der Zunahme der absoluten und relativen Zellverkürzung, der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Kontraktionsrate. Es konnte auf verschiedenen Stufen gezeigt werden, dass dieser Effekt durch cGMP vermittelt wurde. Wie schon an Herzmuskelzellen der Ratte nach Zugabe von NO ohne elektrische Stimulation gezeigt, führen NO-Donatoren zu einer Zunahme des cGMP-Spiegels (Kojda et al., 1995, 1996, und Taimor et.al., 2000). Nun konnte mit niedrigen Konzentrationen an NO-Donatoren gezeigt werden, dass dieser Effekt bei elektrischer Stimulation mit 2 Hz besonders ausgeprägt ist. Der positiv kontraktive Effekt konnte mit YC-1, einem direkten Aktivator der löslichen Guanylatzyklase, imitiert werden. Nach Zugabe von ODQ, einem Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase, blieb der positiv kontraktive Effekt der NO-Donatoren aus. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass NO die Kontraktilität von Herzmuskelzellen durch cGMP steigert.

An Papillarmuskelzellen der Katze, die ebenfalls eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung besitzen, zeigte Mohan et al (1996), dass die positiv kontraktile Wirkung von NO cGMP-abhängig ist, was sich mit meinen Beobachtungen deckt.

5.1.2. Beteiligung der α_s -Untereinheit von G-Proteinen an dem positiv kontraktile Effekt von NO

Ein weiterer wesentlicher Befund ist, dass der positiv kontraktile Effekt von NO über eine Aktivierung der $G_{s\alpha}$ -Proteine mit anschließender Aktivierung der Adenylatzyklase vermittelt wird.

Mit NF 449, einem Antagonisten an der α_s -Untereinheit von G-Proteine, konnte der positiv kontraktile Effekt von SNAP ebenso wie der von Isoprenalin aufgehoben werden.



Forskolin, ein direkter Aktivator der Adenylatzyklase, bewirkte in einer Konzentration von 10 nMol/l eine deutliche Zunahme der Zellverkürzung, die sich unter Zusatz von SNAP oder Spermine-NONO nicht zusätzlich steigern ließ. Eine direkte Aktivierung der Adenylatzyklase durch NO oder cGMP konnte damit nicht nachgewiesen werden.

Nachdem durch voneinander unabhängige Versuche gezeigt werden konnte, dass der positiv kontraktile Effekt von NO über cGMP und $G_{s\alpha}$ -Proteine vermittelt wird, stellte sich die Frage, ob dies durch direkte Interaktion von cGMP und $G_{s\alpha}$ -Proteinen, oder durch Aktivierung

cGMP-abhängiger Proteinkinasen zustande kommt. Kojda et al., (1996) führten dazu Versuche mit KT 5823, einem Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch, wobei der positiv kontraktile Effekt durch niedrige Konzentrationen von NO-Donatoren unbeeinflusst blieb, der negativ kontraktile Effekt durch hohe Konzentrationen von NO-Donatoren jedoch aufgehoben wurde. Daraus lässt sich folgern, dass der positiv kontraktile Effekt durch die direkte Interaktion von cGMP mit G_{sa} -Proteinen vermittelt wird. Gleichzeitig scheint der negativ kontraktile Effekt über cGMP-abhängige Proteinkinasen vermittelt zu werden.

5.1.3. Beteiligung von cAMP an dem positiv kontraktile Effekt von NO

Mittlerweile ist gut belegt, dass NO zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels in ventrikulären Herzmuskelzellen führt. Dies wurde zuletzt für organische Nitrate und spontane NO-Donatoren unter nicht schlagenden Bedingungen gezeigt (Kojda et al., 1995; Kojda et al., 1996; Taimor et al., 2000). Einen weiteren Mechanismus der Signalübertragung stellt die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase dar (Kojda et al., 1996; Vila-Petroff et al., 1999). Bestimmungen der intrazellulären Konzentrationen der second-messenger cGMP und cAMP zeigten gleichsam einen deutlichen Anstieg bei Inkubation der Zellen mit niedrigen Konzentrationen an NO-Donatoren. Das Ausbleiben des positiv kontraktile Effekts unter Coinkubation von SNAP mit Rp-cAMPS, einem Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase zeigte, dass der positiv kontraktile Effekt von NO-Donatoren cAMP-vermittelt ist.

Dass NO auch über andere Signalwege, wie z.B. über PKC Zellfunktionen beeinflusst (Ping et al., 1999; Liang & Knox, 1999), konnte gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte in den von mir durchgeführten Versuchen bei Coinkubation von SNAP mit BIM, einem Inhibitor der PKC, gegenüber SNAP alleine kein signifikanter Unterschied in der Zellverkürzung registriert werden, woraus zu schließen ist, dass die PKC keinen Einfluss auf den positiv kontraktile Effekt von NO hat.

5.2. Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Entsprechend dem konzentrationsabhängigen Kontraktionsverhalten konnten in den Untersuchungen von Kojda et al. (1996) unterschiedliche zeitliche Verläufe der NO-Effekte beobachtet werden. So fand sich ein rasch einsetzender aber zeitlich begrenzter positiv kontraktiler Effekt bei niedrigen Konzentrationen von NO-Donatoren und ein verzögerter, aber anhaltend negativ kontraktiler Effekt bei hohen Konzentrationen an NO-Donatoren. Kojda et al. (1996) konnten zeigen, dass dieser vorübergehende positiv kontraktile Effekt nach Zugabe von KT 5823, einem spezifischen Inhibitor cGMP-abhängiger Proteinkinasen, in einen anhaltenden Effekt überführt werden kann. Diese Befunde lassen vermuten, dass die zeitliche Begrenzung des positiv kontraktilen Effektes auf die Akkumulation von cGMP und die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen zurück zu führen ist. Dadurch wird der positive Effekt nach einem zeitlichen Intervall durch den negativen Effekt aufgehoben. Mit dieser Überlegung deckt sich auch die Beobachtung, dass 8-bromo-cGMP, ein cGMP-Analogon, kurz nach Inkubation der Zellen eine passagere Zunahme der Zellverkürzung zeigt, die dann nach längerer Inkubation (300 Sekunden) nicht mehr nachweisbar war.

5.3. Vergleich mit anderen Studien

Vila Petroff et al. (1999) beschrieben eine cGMP-unabhängige Steigerung der Zellverkürzung und postulierten eine direkte Aktivierung der Adenylatzyklase durch NO. Sie fanden unter anderem einen anhaltenden positiv kontraktilen Effekt trotz Inhibierung der löslichen Guanylatzyklase durch Coinkubation von SNAP und ODQ. Dies konnte in meinen Versuchen mit SNAP und ODQ nicht bestätigt werden. Wesentlicher Unterschied zu Vila Petroffs Versuchsansatz, bei dem die Zellen mit einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz stimuliert wurden und dabei eine negative Zellverkürzungs-Frequenz-Beziehung zeigten ist, dass in meinen Versuchen fast ausschließlich (>95 %) Zellen mit einer positiven Zellverkürzungs-Frequenz-Beziehung verwendet und diese mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert wurden. Der Grund für die Durchführung meiner Versuche mit einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz beruht auf der Erkenntnis, dass Herzmuskelzellen der Ratte eine biphasische FFR besitzen, die von 0,5 bis 1 Hz negativ und von 1 Hz bis 2 Hz positiv ist (Bozak et al., 1991; Kojda et al., 1996, diese Studie). Layland und Kentish beobachteten 1999 an Trabekelzellen der Ratte bei Stimulationsfrequenzen von 5 bis 7 Hz, was der Herzfrequenz der Ratte in vivo entspricht, ebenfalls eine positive FFR.

Damit entspricht das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen in den vorliegenden Versuchen eher den Verhältnissen *in vivo*.

Abi-Gerges (2002) fand, dass NO-Donatoren die β -adrenerg vermittelte Stimulation von spannungsabhängigen L-Typ-Ca-Kanälen verstärken, wobei sich dieser Effekt nicht durch ODQ abschwächen ließ. Daraus folgerten die Autoren, dass dieser Effekt cGMP unabhängig vermittelt wird.

Dass dieser Effekt ursächlich für den hier untersuchten positiv kontraktile Effekt von NO an Herzmuskelzellen ist, lässt sich bezweifeln, weil in den vorliegenden Versuchen NO-Donatoren alleine, ohne β -adrenerge Stimulation (z.B. mit Isoprenalin), die Kontraktilität verstärkten (Kojda et al., 1996, Vila-Petroff et al., 1999, diese Studie).

Als ein möglicher Mechanismus, über den NO die kardiale Kontraktilität erhöht, wurde immer wieder die Inhibierung einer cAMP-spaltenden Phosphodiesterase durch NO diskutiert (Kojda et al., 1996). Dieses Enzym, das eine hohe Spezifität besitzt cAMP zu hydrolysieren, ist in großen Mengen im Säugetierherzen vorhanden. Vila-Petroff et al., (1999) haben gezeigt, dass SNAP auch nach Inhibierung der Phosphodiesterase mit IBMX noch einen positiv kontraktile Effekt besitzt. In meinen Untersuchungen verstärkte SNAP die positiv kontraktile Wirkung von Isoprenalin, nicht aber die von Forskolin, obwohl beide Stoffe gleichermaßen durch Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer cAMP-Erhöhung führen. Eine Inhibierung der Phosphodiesterase durch NO hätte jedoch eine Kontraktilitätssteigerung beider Stoffe zur Folge haben müssen, was sich in meinen Versuchen nicht zeigte und damit gegen eine Inhibierung der cAMP-spaltenden Phosphodiesterase durch NO spricht.

5.4. Limitierungen

Wie in allen anderen vergleichbaren Studien gibt es auch in dieser Studie einige limitierende Faktoren bezüglich der Pharmakologie und unspezifischer Effekte der hier verwendeten Substanzen.

Bei SNAP, das häufig in der Literatur verwendet wird, gibt es Nebeneffekte hinsichtlich des Kontraktionsverhaltens damit inkubierter Zellen, die bei anderen NO-Donatoren nicht beobachtet werden.

So konnte eine konzentrationsabhängige Verkürzung des Parameters „Zeit bis zur maximalen Kontraktion“ bei NAP oder SNAP und unter Anwesenheit von ODQ gezeigt werden. Dabei war die Dynamik der Zellkontraktionen, die durch den Parameter Kontraktionsrate charakterisiert wird, im Vergleich zu NO nicht beeinträchtigt.

YC-1 kann viele Effekte von NO-Donatoren imitieren. Wie hier gezeigt werden konnte, führt YC-1 zu einem geringen Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels, vergleichbar mit dem geringen Effekt von NO-Donatoren unter Konzentrationen die in dieser Untersuchung verwandt wurden (Taimor et al., 2000).

Der Effekt von YC-1 auf die prozentuale Zellverkürzung war vergleichbar dem von NO-Donatoren und zusätzlich frequenzabhängig und durch ODQ zu inhibieren.

Dennoch hat YC-1 geringe Auswirkungen auf den Parameter „Zeit bis 90 % Relaxation“, der durch ODQ verlängert wird, und cGMP unabhängig ist. Auf die Kontraktionsgeschwindigkeit hat YC-1 eher gering hemmende Einflüsse als verstärkende, ebenso auf die Kontraktionsrate. In diesen beiden angesprochenen Punkten erfüllt YC-1 nicht die Charakteristika des NO-Effektes. Da die Dynamik der Zellkontraktionen in anderen vorhergehenden Studien nicht dokumentiert wurde, bleibt ein Vergleich zu diesen Studien offen.

Es ist wichtig zu beachten, dass die vorliegenden Versuche auf der Verwendung und Kombination verschiedener NO-Donatoren (SNAP und Sp-NONO) und verschiedener Agonisten und Inhibitoren der Guanylatzyklase (YC-1, 8-bromo-cGMP und ODQ) basiert, um den Einfluss der o.g. Limitierungen möglichst gering zu halten.

Eine weitere Einschränkung ist die Durchführung der Einzelzellmessungen bei Raumtemperatur statt bei einer physiologischen Temperatur von 37°C. Verglichen mit Daten aus der Studie von Kojda et al.(1996), in der die Zellen bei einer Temperatur von 37°C untersucht wurden, zeigt sich jedoch kein Unterschied im Kontraktionsverhalten der Kontrollzellen und der mit SNAP inkubierten Zellen. Dies mag vielleicht auch daran liegen dass die Kulturschalen, Inkubationsmedien und Reagenzien in einem Wärmeschrank oder Wasserbad bei 37°C aufbewahrt wurden und dort unmittelbar zu den Messungen entnommen wurden, so dass die Temperatur des Versuchsmediums bei rascher Durchführung deutlich über der Raumtemperatur lag. Genaue Temperaturmessungen wurden jedoch nicht durchgeführt.

Eine so genannte Durchlauferwärmung wie Kojda et al. (1996) dies verwendeten führt dagegen zu dem Problem, dass Zellen sich infolge der Flüssigkeitsströmung von der Kulturschale lösen können, was die Messung wesentlich erschwert.

5.5. Schlussfolgerung

Aus den Befunden der vorliegenden Arbeit kann die Aussage getroffen werden, dass der positiv kontraktile Effekt von NO in niedrigen Konzentrationen im positiven Kraft-Frequenz-Bereich von Herzmuskelzellen der Ratte durch eine direkte Interaktion von cGMP mit der α_s -Untereinheit von G-Proteinen vermittelt wird.

5.6. Ausblick

Weitere Untersuchungen könnten die Rolle des hier beschriebenen positiv kontraktilen Effektes von NO als möglichen Kompensationsmechanismus im Rahmen der Herzinsuffizienz untersuchen. Dabei müssten Untersuchungen angestellt werden, inwieweit sich dieser Mechanismus auch beim Menschen wiederfindet. Sollte dies übertragbar sein könnte die Gabe von Nitraten bei der Myokardischämie bedingten Herzinsuffizienz, neben der Nachlastsenkung, einen neuen Stellenwert durch Steigerung der Inotropie erlangen.

6. Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte eine positiv kontraktile Wirkung in nanomolaren Konzentrationen und eine negativ kontraktile Wirkung in mikromolaren Konzentrationen. Der Mechanismus der positiv kontraktilen Wirkung konnte bisher nicht geklärt werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus des positiv kontraktilen Effektes von NO an Herzmuskelzellen der Ratte im positiven Kraft-Frequenz-Bereich zu untersuchen. Dazu wurden isolierte Herzmuskelzellen der Ratte in einem elektrischen Feld mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert und mit geeigneten Agonisten und Antagonisten inkubiert. Die Kontraktionsparameter wurden mit einer optischen Einheit und einer speziellen Software erfasst.

Unter diesen Bedingungen steigerte SNAP (1 $\mu\text{Mol/l}$) und Spermin-NONO (100 nMol/l) passager die Zellverkürzung. Co-Inkubation mit ODQ (10 $\mu\text{Mol/l}$), einem Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase, hob diesen Effekt auf. Mit YC-1 (30 $\mu\text{Mol/l}$), einem Aktivator der löslichen Guanylatzyklase, konnte der positiv kontraktile Effekt von NO-Donatoren imitiert werden, gleichfalls wurde dieser Effekt durch ODQ aufgehoben. SNAP und Spermin-NONO potenzierten den positiv kontraktilen Effekt von Isoprenalin (100 nMol/l), einem β -Adrenozeptor-Agonisten, aber nicht von Forskolin (10 nMol/l), einem Aktivator der Adenylatzyklase. Mit NF 449 (10 $\mu\text{Mol/l}$), einem Antagonist an der α_s -Untereinheit von G-Proteinen, konnte der positiv kontraktile Effekt von SNAP und Isoprenalin signifikant abgeschwächt werden.

Daraus lässt sich schließen, dass der positiv kontraktile Effekt von NO in niedriger Konzentration durch die direkte Interaktion von cGMP mit der α_s -Untereinheit von G-Proteinen verursacht wird.

Conclusion:

Nitric oxide (NO) causes a positive contractile effect in nanomolare and a negative contractile effect in micromolare concentration on isolated rat cardiomyocytes. The mechanism of the positiv contractile effect is still unclear.

Task of the present studie was to investigate the mechanism of the positive contractile effect of NO on rat ventricular cardiomyocytes in a range of positive force/frequency relationship. Cardiomyocytes were paced in an electric field with a frequence of 2 Hz and were incubated with several agonists and antagonists. The contraction parameters were recorded with an special optical unit and a special Software.

Under these conditiones SNAP (1 $\mu\text{Mol/l}$) and Spermin-NONO (100 nMol/l) increased the cell shortening transient. Coincubation with ODQ (10 $\mu\text{Mol/l}$) an inhibitor of soluble guanylyl cyclase (sGC) abolished this effect. With YC-1 (30 $\mu\text{Mol/l}$) an activator of sGC the positiv contractile effect of the NO donors could be mimicked. As well this effect was abolished by ODQ. SNAP and Spermin-NONO potentiated the positive contractile effect of isoprenaline (100 nMol/l) but not of forskoline (10 nMol/l). Inhibition of the α_s subunit from the G protein by NF 449 attenuated the positive contractile response of SNAP and isoprenaline.

The conclusion of the present studie is that the positive contractile effect of NO in low concentration is mediated by direct interaction of cGMP with the α_s subunit of G proteins.

7. Literatur:

ABI-GERGES, N., SZABO A.S., OTERO, A.S., FISCHMEISTER, R. & MERY, P.F.(2002). NO donors potentiate the β -adrenergic stimulation of $I_{Ca,L}$ and the muscarinic activation of $I_{K,ACh}$ in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 540, 411-424.

ARSTALL, M.A., BAILEY, C., GROSS, W.L., BAK, M., BALLIGAND, J.-L. & KELLY, R.A. (1998). Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 979-988.

BORZAK, S., MURPHY, S. & Marsh, J.D. (1991). Mechanisms of rate staircase in rat ventricular cells. *Am. J. Physiol.* 260, H884-H892.

FRAMPTON, J.E., HARRISON, S.M., BOYETT, M.R. & Orchard, C.H. (1991). Ca^{2+} and Na^{+} in rat myocytes showing different force-frequency relationship. *Am. J. Physiol.* 261, C739-C750.

FURCHGOTT, R. F. AND ZAWADZKI, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond.)* 288: 373-376,

GARTHWAITE, J (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14: 60-67, 1991

GILLESPIE, J. S., LIU, X. AND MARTIN, W. (1990). The neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genital system. In: Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System, ed. by S. Moncada and E. A. Higgs 147-164, Elsevier Science Publishers B.V.

HIBBS, J. B., JR., TAINTOR, R. R., VAVRIN, Z., GRANGER, D. L., DRAPIER, J. -C., AMBER, I. J. AND LANCASTER, J. R., JR. (1990). Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: A molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System, ed. by S. Moncada and E. A. Higgs 189-223, Elsevier, Amsterdam.

HOHENEGGER, M., WALDHOER, M., BEINDL, W., BÖING, B., KREIMEYER, A., NICKEL, P., NANOFF, C. & FREISSMUTH, M. (1998). Gs α -selective G protein antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 346-351.

KAYE, D.M., WIVIOTT, S.D., BALLIGAND, J.-L., SIMMONS, W.W., SMITH, T.W. & KELLY, R.A. (1996). Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 78, 217-224.

KOJDA, G., BRIXIUS, K., KOTTENBERG, K., NIX, P., SCHLÜTER, K.-D., PIPER, H.M. & NOACK, E. (1995). The new NO donor SPM3672 increases cGMP and improves contraction in rat cardiomyocytes and isolated heart. *Eur. J. Pharmacol.* 284, 315-319.

KOJDA, G., KOTTENBERG, K., NIX, P., SCHLÜTER, K.-D., PIPER, H.M. & NOACK, E. (1996). Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 78, 91-101.

LAYLAND, J. & KENTISH, J.C. (1999). Positive force- and [Ca²⁺]_i-frequency relationship in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am. J. Physiol.* 276, H9-H18.

LIANG, M. & KNOX, F.G. (1999). Nitric oxide activates PKC α and inhibits Na⁺-K⁺-ATPase in opossum kidney cells. *Am. J. Physiol.* 277, F859-F865.

MOHAN, P., BRUTSAERT, D.L., PAULUS, W.J. & SYS, S.U. (1996). Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circ* 93, 1223-1229.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.

MONCADA, S. AND HIGGS, E. A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329, 2002-2012.

MÜLLER-STRAHL, G., KOTTENBERG, K., ZIMMER, H.-G., NOACK, E. & KOJDA, G. (2000). Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J. Physiol.* 522, 311-320.

NGUYEN, T., BRUNSON, D., CRESPI, C. L., PENMAN, B. W., WISHNOK, J. S. AND TANNENBAUM, S. R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3030-3034.

PING, P., TAKANO, H., ZHANG, J., TANG, X.-L., QIU, Y., LI, R.C.X., BANERJEE, S., DAWN, B., BALAFONOVA, Z. & BOLLI, R. (1999). Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits. *Circ. Res.* 84, 587-604.

RAND, M. J. (1992). Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19: 147-169.

SCHLÜTER, K.-D., WEBER, M., SCHRAVEN, E. & PIPER, H.M. (1994). NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action. *Am. J. Physiol.* 267, H1461-H1466.

SNYDER, S. H. AND BREDT, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* 266: 68-71.

STAMLER, J.S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936.

STOYANOVSKY, D., MURPHY, T., ANNO, P.R., KIM, Y.M. & SALAMA, G. (1997). Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 21, 19-29.

TAIMOR, G., HOFSTAETTER, B. & PIPER, H.M. (2000). Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc. Res.* 45, 588-594.

TODA, N. (1995). Nitric oxide and the regulation of cerebral arterial tone. *In Nitric Oxide in the Nervous System*, ed. by S. Vincent, pp. 207-225, *Academic Press Ltd., Orlando*.

VILA-PETROFF, M.G., YOUNES, A., EGAN, J., LAKATTA, E.G. & SOLLOT, S.J. (1999). Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 84, 1020-1031.

VORNANEN, M. (1992) Force-frequency relationship, contraction duration and recirculating fraction of calcium in postnatally developing rat heart ventricles: correlation with heart rate. *Acta Physiol. Scand.* 145, 311-321.

XU, L., EU, J.P. MEISSNER, G. & STAMLER, J.S. (1998). Activation of cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279, 234-237.

8. Anhang

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.“

Stuttgart, 18. Januar 2007

Danksagung:

Bei allen, die mich bei der Durchführung meiner Doktorarbeit auf irgendeine Weise unterstützt haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schlüter für die Überlassung des Themas und die stets zuverlässige und engagierte Betreuung vom Anfang bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei den MTA des Physiologischen Institutes für die praktische Unterstützung im Laboralltag bedanken.

Vor allem möchte ich meinen Eltern danken, die mich auf meinem bisherigen Weg immer unterstützt und damit das Studium ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Kirstin für das aufgebrachte Verständnis und die Geduld in den letzten Jahren bedanken.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name: Markus Johannes Langer
Geburtsdatum: 20.05.1975
Geburtsort: Offenbach am Main
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981-1985: Grundschule St. Blasius in Frickhofen
1985-1994: Gymnasium der Fürst-Johann-Ludwig-Schule in Hadamar
13.06.1994: Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulstudium:

24.04.1996: Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der JLU-Gießen
04/1998: Ärztliche Vorprüfung
04/1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der JLU-Gießen
04/2001: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der JLU-Gießen
04/2001-04/2002: Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
04/2002: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der EKU-Tübingen

Berufsausbildung/Berufstätigkeit:

07/94-10/95: Ausbildung zum Rettungssanitäter und Zivildienst im Rettungsdienst des DRK Westerwald
11/95-03/96: Rettungssanitäter im Rettungsdienst des DRK Hochtaunus
08/2002-02/2004: Arzt im Praktikum am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, Abteilung für Nephrologie und allgemeine Innere Medizin, Chefarzt Prof. Kuhlmann
seit 02/2004: Facharztweiterbildung am Zentrum für Innere Medizin am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
Chefärzte Prof. Stange/Aulitzky/Sechtem/Kuhlmann/Becker

Publikationen:

10/2003 M. Langer, D.Lüttecke, K-D Schlüter: *Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship.* Eur. J. Physiol. (2003) 447: 289-297