

**Einfluss von Bisindolylmaleimid-5 auf die Funktion ventrikulärer
Kardiomyozyten und der post-ischämischen Funktionserholung des
Herzens**

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

vorgelegt von

Sabrina Bühler

aus
Mannheim

Gießen, 2011

Aus dem physiologischen Institut
Direktor: Prof. Dr. R. Schulz
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof.Dr. K.-D. Schlüter
Gutachter: Prof. Dr. A. Günther

Tag der Disputation: 08.08.2012

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Einleitung	4
1.1 Definition und Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms	4
1.2 Ionenströme während des kardialen Aktionspotentials	7
1.3 Human Ether-a-go-go Related Gene (hERG)-Kanal	10
1.4 Proteinkinase C	11
1.5 Ziel der Arbeit	12
2. Material	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Medien	15
2.3 Puffer	17
2.4 Geräte und Laborbedarf	18
2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur	18
2.4.2 System zur Erkennung der Zellgrenzen während der Kontraktion	18
2.4.3 Langendorff-System	19
2.4.4 Extraktion von RNA aus den Rattenkardiomyozyten	19
2.4.5 Protein- und RNA-Gehaltsmessungen	20
2.4.6 PCR	20
2.4.7 Sonstige Geräte	20
2.4.8 Verbrauchsmaterialien	20
2.4.9 Software	21

3.	Methoden	22
3.1	Versuchstiere	22
3.1.1	Präparation isolierter Kardiomyozyten	22
3.2	Herstellung einer Zellkultur	24
3.2.1	Vorplattieren	24
3.2.2	Ausplattieren	24
3.3	Elektrische Stimulation der Kardiomyozyten	25
3.3.1	Vorbereitung	25
3.3.2	Messvorgang	25
3.3.3	Prinzip der Messwerterfassung	26
3.3.4	Messprotokoll	28
3.4	Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzens	29
3.4.1	Prinzip des Langendorff-Modells	29
3.4.2	Präparation der Rattenherzen	30
3.4.3	Versuchsdurchführung	30
3.4.3.1	Parameter	30
3.4.3.2	Versuchsprotokoll	31
3.5	Proteingehaltsmessungen der Perfusate	32
3.5.1	Prinzip der Spektralphotometrie	32
3.5.2	Probenvorbereitung und Messung	34
3.6	Bestimmung des DNA-Gehalts der Kardiomyozyten aus dem Ischämie-Reperfusionsversuch mittels PCR	34
3.6.1	RNA-Isolierung aus Kardiomyozyten für real-time PCR	34
3.6.2	Bestimmung der RNA-Konzentration am Spektralphotometer	35
3.6.3	Reverse Transkription zur cDNA-Synthese	36
3.6.4	Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion	37
3.6.4.1	Prinzip der real-time PCR	37
3.6.4.2	PCR Reaktionsmix	39

3.6.4.3	Verwendete Primer	39
3.6.4.4	Laufprogramm	39
3.6.4.5	Auswertung der PCR	40
3.7	Statistik und Auswertung	45
4.	Ergebnisse	46
4.1	Einfluss unterschiedlicher Bisindolylmaleimid-1-Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	46
4.1.1	Einfluss auf die Zellverkürzungsamplitude	46
4.1.2	Einfluss auf die frequenzabhängige Zellverkürzung Normiert auf die diastolische Zelllänge	47
4.1.3	Kontraktionsverhalten bei einer Stimulation von 0,5 Hz	49
4.2	Einfluss von ISO und BIM-1 auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	54
4.2.1	Frequenzabhängiges Kontraktionsverhalten	54
4.2.2	Kontraktionsverhalten bei einer Stimulation von 0,5 Hz	56
4.3	Einfluss von CEC und BIM-5 auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	61
4.3.1	Kontraktionsverhalten von Chelerythrine bei unterschiedlichen Frequenzen	61
4.3.2	Kontraktionsverhalten von BIM-5 bei unterschiedlichen Frequenzen	65
4.3.3	Frequenzabhängiges Kontraktionsverhalten bei Kombination von CEC und BIM-5	69
4.4	Einfluss verschiedener Substanzen auf die linksventrikuläre Funktion der Rattenherzen im Langendorff-Modell	73
4.4.1	LVDP im Ischämie-Reperfusionsversuch	73
4.4.2	LVeDP im Ischämie-Reperfusionsversuch	77

4.4.3	Aortendruck im Ischämie-Reperfusionsversuch	79
4.5	Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Herzfunktion	82
4.5.1	Einfluss auf den linksventrikulär diastolischen Druck im Ischämie-Reperfusionsversuch	82
4.5.2	Einfluss auf den Aortendruck im Ischämie-Reperfusionsversuch	83
4.5.3	Einfluss auf die Herzfrequenz-Variabilität	84
4.5.4	Proteingehalt im Perfusionat	85
4.5.5	Einfluss auf das Herzgewicht	86
4.6	Auswirkung der Substanzen auf die Expression verschiedener humoraler Faktoren	87
5.	Diskussion	91
5.1	Bisindolylmaleimid-1 und seine Wirkung auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten	91
5.2	Auswirkungen von Bisindolylmaleimid-5 auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten	93
5.3	Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten durch die Wirkung von Chelerythrin	94
5.4	Auswirkungen von Bisindolylmaleimid-5 und Chelerythrin auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten	95
5.5	Schlussfolgerung	96
6.	Zusammenfassung	97
7.	Summary	99
8.	Literaturverzeichnis	100

9.	Eidesstattliche Erklärung	106
10.	Danksagung	107

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Aqua bidest.	Zweifach demineralisiertes Wasser
BNP	Brain natriuretic peptid
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy DNA
cGMP	cyclisches Guanosin-3,5-monphosphat
DAG	Diacylglycerin
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DEPC-Wasser	Diäthylpyrokarbonat-Wasser
DTT	Dithiotreitol
EAG-Gen	Ether-a-go-go Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
Fw-Primer	Forward primer
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-
	Ethansulfonsäure
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene
HF	Herzfrequenz
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ISO	Isoprenalin
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit

LVDP	left ventricular developed pressure
LVeDP	left ventricular enddiastolic developed pressure
L-Diast	diastolische Zellverkürzung
MARCKS	myristiliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non-ST-elevation myocardial infarction
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
P _{sys}	Systolischer Druck
P _{dia}	Diastolischer Druck
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PP	Aortendruck
dP	Änderung des Perfusionsdrucks
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
RACK	Rezeptor für aktivierte Proteinkinase C
rev-Primer	Reverse Primer
RT	Reverse Transkriptase
Rpm	Rounds per minute
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SERCA	Sarcoplasmatic/endoplasmatic reticulum Calcium ATPase

STEMI

ST-elevation myocardial infarction

Taq

Thermus aquaticus

TBS

Tris-gepufferte Salzlösung

TCA

Trichloressigsäure

Tris

Tris-hydroxymethylaminomethan

x g

x-fache Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1 Definition und Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms

Bei dem Begriff „Akutes Koronarsyndrom (ACS)“ handelt es sich um einen Sammelbegriff für verschiedene akute Durchblutungsstörungen am Herzen, welche die gleiche Klinik aufweisen. Dazu zählt man die instabile Angina pectoris ohne Anstieg der Troponine I oder T, den NSTEMI „non-ST-segment-elevation myocardial infarction“ mit Anstieg von Troponin I oder T und zuletzt der STEMI „ST-segment-elevation myocardial infarction“ als typischer Myokardinfarkt mit ST-Hebungen und Anstieg von Troponin I oder T (Abb.1.1-1).

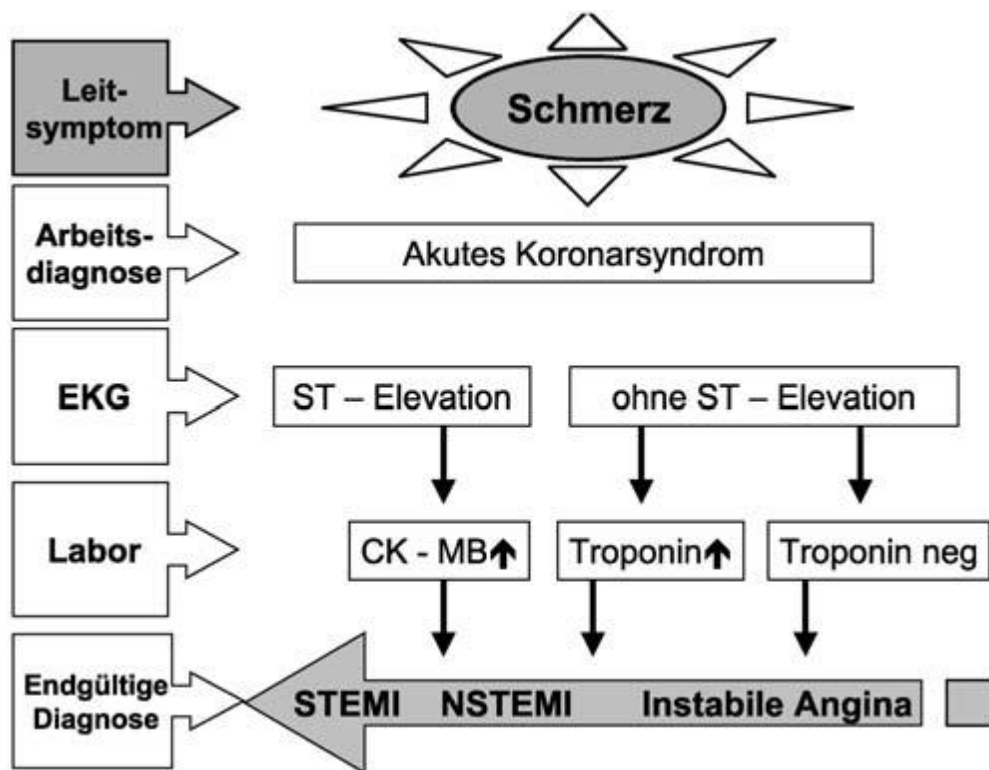


Abb. 1.1-1 Terminologie des akuten Koronarsyndroms

C.W. Hamm, Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom, 2004

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen in den Industrienationen die häufigste Todesursache dar, gefolgt von Krebserkrankungen. Dabei schätzt man die Inzidenz der akuten Myokardinfarkte in Deutschland pro Jahr auf 300/100.000 mit einer Lebenszeitprävalenz für Männer von ca. 30 % und Frauen von ca. 15 % (m : w = 2 : 1) (Gerd Herold, 2008). 40 % der Infarktpatienten versterben schon am ersten Postinfarkttag, über die Hälfte bereits in der ersten Stunde nach Symptombeginn und in den ersten vier Wochen sind bereits 50 % aller Infarktpatienten verstorben (Gerd Herold, 2008). Diese Daten stammen aus dem Monica-Projekt (Monitoring of International Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases), das 1978 durch die WHO initiiert wurde und sich über einen Zeitraum von 10 Jahre erstreckte, dabei beteiligten sich weltweit 21 Länder. Nach Einführung der neuen Definition und Klassifikation bei akuten Thoraxschmerzen im Jahr 2000 wurden Patientendaten im ACOS-Register gesammelt und im Jahr 2002 ausgewertet, dabei zeigte sich bei 15.891 Patienten in 46 % einen STEMI, in 41 % einen NSTEMI und in 13 % wurde eine instabile Angina Pectoris diagnostiziert. Die Einjahres-Letalität lag in der STEMI-Gruppe bei 15,2 % und der NSTEMI-Gruppe bei 14 %. Dies konnte auf die Multimorbidität und das Alter der Patienten in der Gruppe der NSTEMI zurückgeführt werden.

Das ACS entsteht meist auf dem Boden einer bestehenden KHK und stellt eine lebensbedrohliche Manifestation der Atherosklerose dar. Typischerweise kommt es durch eine Plaqueerosion oder –ruptur zu einer lokalen Thrombusbildung, die dann aufgrund der damit verbundenen humoralen Reaktion zu einer Vasokonstriktion führen kann und somit den Blutfluss noch weiter reduziert. Im Falle eines STEMI verschließt der gebildete Thrombus das komplette Gefäßlumen. Dies ist in der Regel bei einem NSTEMI nicht der Fall, da normalerweise der Blutfluss erhalten bleibt und sich ein sogenannter thrombozytenreicher Abscheidungsthrombus bildet, der allerdings nach distal embolisieren kann und dort Mirkrozellnekrosen hervorruft (Christian W.Hamm, 2009).

Leitsymptom der ACS ist ein infarkttypischer Brustschmerz länger als 20 Minuten, der auf Nitrate kaum anspricht, eventuell besteht eine Schmerzausstrahlung, Schwäche,

Angst und vegetative Begleitsymptomatik, Herzrhythmusstörungen bis hin zum Kammerflimmern, Blutdruckveränderungen und Zeichen der dekompenzierten Linksherzinsuffizienz. Folglich beschreibt das akute Koronarsyndrom einen klinischen Symptomkomplex und stellt keine abschließende Diagnose dar. Die weitere Einteilung erfolgt laborchemisch, durch spezifische Veränderungen im EKG und weiterführend durch bildgebende Verfahren.

Im Falle des akuten Myokardinfarkts ist neben der Größe des betroffenen Areals auch der Zeitpunkt der Reperfusion des verschlossenen Gefäßes für die Prognose des Patienten entscheidend. Durch frühzeitige Eröffnung des Gefäßes können so Gewebsnekrosen limitiert werden und die Funktionsfähigkeit des betroffenen Areals weitgehend erhalten bleiben. Je nach Ausmaß der Zellnekrosen kommt es zu strukturellen Umbau- und Anpassungsvorgängen im Herzen („remodeling“), man spricht auch von mechanischem und elektrischem Remodeling. In der Infarktnarbe führt dies zu einer progredienten Ausdünnung und Expansion, wohingegen es im nicht betroffenen Myokard zu einer kompensatorischen Hypertrophie mit sekundärer Dilatation und ventrikulärer Funktionseinschränkung kommt. Desweiteren besteht das Risiko für Rhythmusstörungen, die zu einer verminderten Herzfrequenzvariabilität und Baroreflexsensitivität führen, mit der Gefahr am plötzlichen Herztod zu versterben.

Nach Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes kommt es zur postokklusiven Hyperämie, die hauptsächlich Folge einer Vasodilatation durch lokale Metabolitenanhäufung und dem P_{O_2} -Abfall im Gewebe während der Ischämie ist. Der post-ischämisch zunehmende Funktionsverlust der Zellen resultiert unter anderem aus der neurohumoralen Aktivierung, wie man sie von der chronischen Herzinsuffizienz kennt (Abb.1.1-2). Diese neurohumoralen Adaptationsvorgänge werden durch die Wirkung der ACE-Hemmer weitgehend reduziert (Gerd Herold, 2008). Die zellulären Vorgänge, die für die nach Wiedereröffnung des Gefäßes entstehenden Umbauprozesse des Myokards verantwortlich sind, sind noch weitgehend unverstanden. Ziel gegenwärtiger Forschung ist es, die Reperusionsstrategie so zu

optimieren, dass ein möglichst günstiges Remodeling erreicht wird. Dies betrifft strukturelle und elektrophysiologische Aspekte.

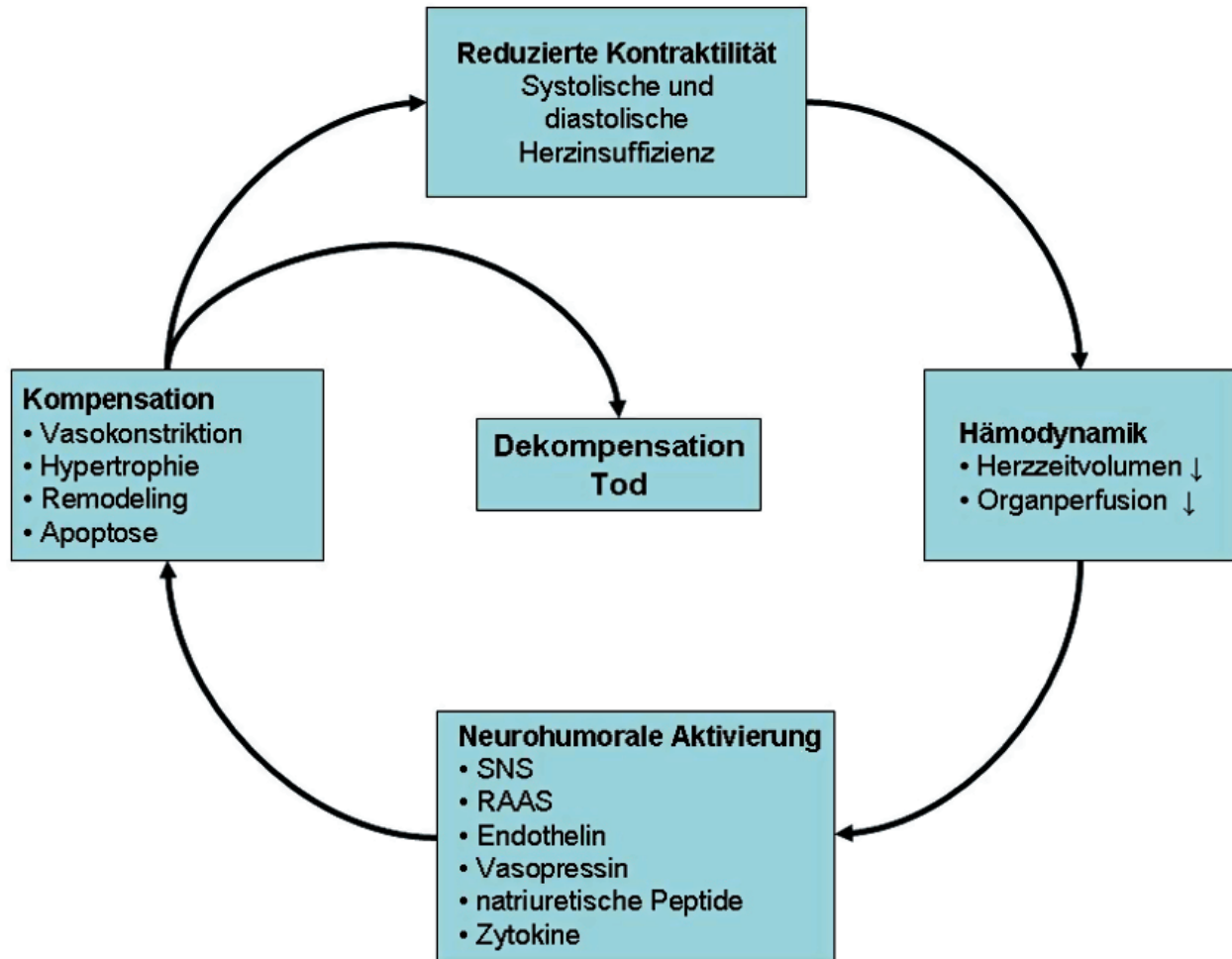


Abb. 1.1-2 Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz (SNS=sympathisches Nervensystem; RAAS=Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)

Schunkert und Weil, Clin Res Cardiol, 2006

1.2 Ionenströme während des kardialen Aktionspotentials

Unter einem Aktionspotential versteht man eine transiente Änderung des Membranpotentials ausgelöst durch einen Reiz, der zu einer Depolarisation über ein

Schwellenpotential der Zelle hinaus führt. Man unterscheidet im zeitlichen Verlauf des Aktionspotentials mehrere Phasen voneinander (Abb. 1.2-1). Die Initiationsphase beschreibt die Überschreitung des Schwellenpotentials, gefolgt von der Depolarisation mit Aufstrich und „overshoot“ mit dem Übergang zur Plateauphase. Abschließend folgt die Repolarisationsphase.

Die Grundlage für diese Änderungen des Membranpotentials sind zeit- und spannungsabhängige Änderungen der Membranpermeabilität für Natrium-, Calcium- und Kaliumionen. Diese wiederum sind abhängig vom spannungsabhängigen Schaltverhalten der Natrium-, Calcium- und Kaliumkanälen.

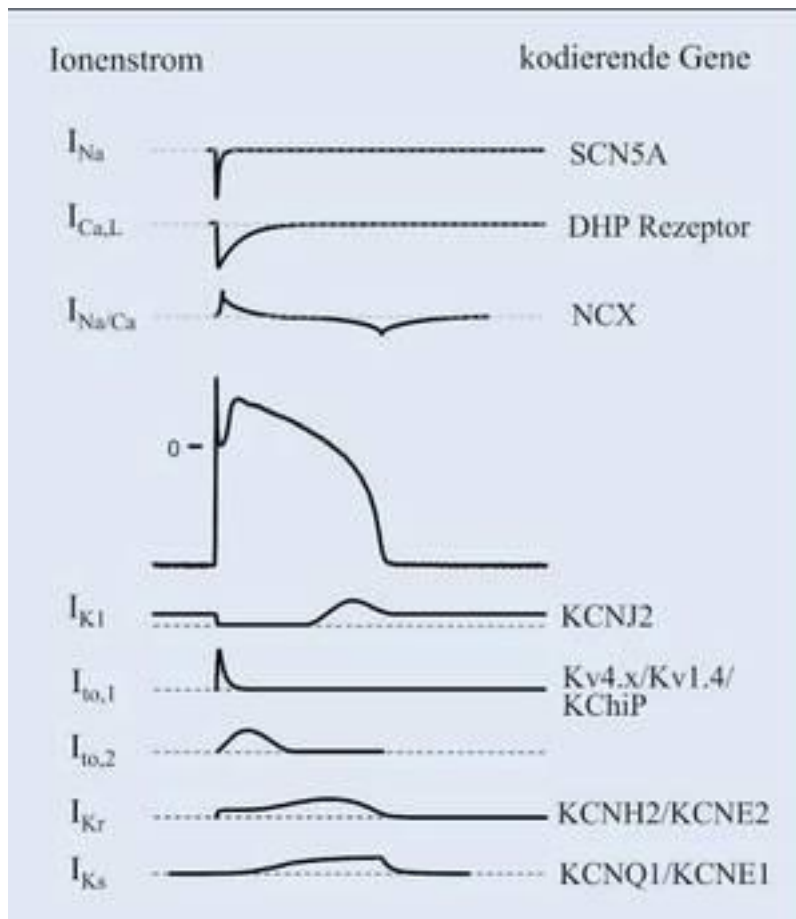


Abb. 1.2-1 Schematische Darstellung eines Aktionspotentials einer ventrikulären Kardiomyozyte. Unter und über dem Aktionspotential sind schematisch die

wesentlichen Ionenströme, sowie die nach derzeitigem Kenntnisstand kodierenden Gene aufgeführt.

U. C. Hoppe, 2001

Verantwortlich für die Generierung des Aktionspotentials ist die zunehmende Natriumleitfähigkeit bei Überschreitung des Schwellenpotentials, dabei erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle und der nachfolgende Natriumeinstrom I_{Na} nimmt mit zunehmender Depolarisation zu. Hierbei handelt es sich um einen selbstverstärkenden Prozess. Mit der Umpolarisation der Membran in Form eines „overshoot“ kommt es zu einer Inaktivierung der Natriumkanäle und nachfolgendem Stopp des I_{Na} . In der anschließenden Plateauphase kommt es zu einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Calcium, der von einem lang anhaltenden langsam inaktivierenden Calciumstrom I_{Ca} getragen wird (Wang, 1998). Während die Kaliumpermeabilität zu Beginn des Aktionspotentials abnimmt, nimmt sie in den nachfolgenden Phasen wieder zu. Dies führt dazu, dass ein schneller Kaliumaustrom I_{Kr} in der Plateau- und Repolarisationsphase, sowie ein sehr langsam reaktivierender Kaliumaustrom I_{Ks} in der Plateauphase nachweisbar ist. Seine Wirkung auf die Gesamtrepolarisation in der späten Plateauphase ist durch I_{Ks} aufgrund seiner langsamen Reaktivierung am Größten. Desweiteren zeichnet sich dieser Strom durch seine fehlende Inaktivierung und sehr langsame Deaktivierung aus (Towbin, 2000), der bei hohen Stimulationsfrequenzen von (patho-) physiologischer Relevanz sein soll (Mitcheson, 1999). Für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials sind einwärtsrektifizierende Kaliumströme von Bedeutung, die sich durch ihre Regulation und dem Ausmaß ihrer Einwärtsrektifizierung unterscheiden (Barry und Nerbonne, 1996). Veränderungen im Zusammenspiel dieser sensiblen Systeme durch z.B. Konzentrationsänderungen oder Kanalblockaden führen zu diversen Arrhythmien und funktionellen Herzstillständen.

1.3 Human Ether-a-go-go Related Gene (hERG)-Kanal

Der hERG-Kanal gehört zu der Familie der EAG (ether-a-go-go)-Kaliumkanäle und wurde 1964 erstmals bei Versuchen mit hypererregbaren Mutationen an *Drosophila melanogaster* beschrieben (Kaplan und Trout 3rd, 1969). Erst viel später, beginnend ab 1991 konnte EAG identifiziert und den Kaliumkanälen zugeordnet werden (Bauer und Schwarz, 2001). Die Namensgebung erfolgte damals aufgrund des typischen Beinschlags der *Drosophila melanogaster*, der als „Go-Go-Tanz-ähnlich“ beschrieben und als Reaktion auf eine Äthernarkose gewertet wurde.

Als Besonderheit bei ihrem Schaltverhalten zeigen die hERG-Kanäle einwärtsgleichgerichtete Eigenschaften (Shi, 1997; Bauer, 1998), d.h. es fließt wesentlich mehr Strom einwärts als auswärts (Sanguinetti, 1995; Smith, 1996). Dies resultiert aus der raschen Regeneration des Kanals aus der Inaktivierung während der Repolarisationsphase. Die Stromkinetik des Kanals weist somit einige Besonderheiten auf, dazu gehört auch die sehr schnelle und spannungsabhängige Inaktivierungskinetik, neben den vergleichsweise langsamen Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgängen (Wang, 1997; Zhou, 1998) (Abb.1.3-1). Dabei kommt es durch die Deaktivierung des Kanals zu einer langsamen Abnahme des Stromflusses. Dieser Mechanismus ist entscheidend für die normale, kardiale Repolarisation (Spector, 1996) und verhindert somit das Entstehen von Arrhythmien durch ektope Depolarisation (Smith, 1996; Lu, 2001). Betrachtet man das Aktionspotential am Herzen, unterscheidet man in der Phase des späten repolarisierenden K^+ -Stroms, den schnell reaktivierenden I_{Kr} von dem langsam reaktivierenden I_{Ks} (Sanguinetti, 1990). Hier ist der hERG-Kanal für den schnellen Kaliumausstrom I_{Kr} und somit die Repolarisation mitverantwortlich. Somit erholen sich die Kanäle aus der Inaktivierung während der einsetzenden Repolarisierung und es kommt erneut zum Ionenstrom durch den Kanal. Dieser Strom ist abhängig von der Repolarisationsrate und nimmt sofort ab, wenn die elektromechanischen Kräfte für den Kalium-Ausstrom abnehmen und die Kanäle langsam deaktiviert werden (Lu, 2001).

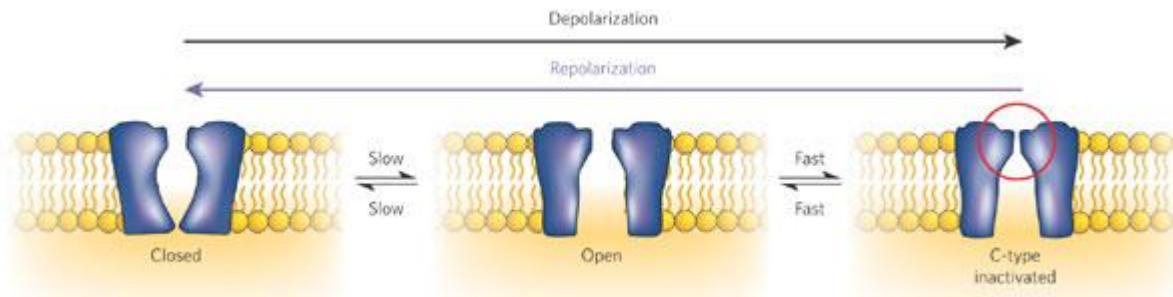


Abb. 1.3-1 hERG-Kanal in geschlossenem, offenem und inaktiviertem Zustand in Abhängigkeit von der transmembranären Spannung

M. C. Sanguinetti und M. Tristani-Firouzi, Nature, 2006

Infolge einer Blockade des hERG-Kanals kommt es durch die Verlängerung des Aktionspotentials des Herzens zu einem sogenannten langen QT-Syndrom einhergehend mit malignen Arrhythmien des Herzens.

1.4 Proteinkinase C

Das Enzym Proteinkinase C aus der Familie der Proteinkinasen spielt eine zentrale Rolle bei der zellulären Signaltransduktion, da sie das Signal von Hormonen und Neurotransmitter weiterleitet. Es existieren zurzeit zwölf Isoenzyme der PKC, die in drei Gruppen aufgeteilt und durch unterschiedliche Kofaktoren aktiviert werden. Die cPKC (classic) wird durch Ca^{2+} und Diacylglycerin, nPKC (novel) durch Diacylglycerin und aPKC (atypical) Ca^{2+} - und Diacylglycerin-unabhängig aktiviert.

Bei der klassischen Variante der PKC wird für deren Funktion Ca^{2+} benötigt, DAG erhöht desweiteren die Affinität für Calcium derart, dass eine Aktivität schon bei physiologischen Konzentrationen vonstattengeht. Der Komplex aus PKC und Ca^{2+} verlagert sich dann Richtung Zellmembran, da dort die Zielproteine, sogenannte MARCKS-Proteine (myristiliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat) über ein

Lipidmolekül in der Zellmembran verankert sind und über deren Modifikation physiologische Vorgänge wie Zellbewegung, Sekretion, Membrantransport und Regulation des Zellzyklus verändert werden können. Die Verankerung des PKC- Ca^{2+} -Komplexes in der Zellmembran in der Nähe der Zielproteine wird über sogenannte RACK-Proteine (Rezeptor für aktivierte Proteinkinase C) vermittelt.

Die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien erfolgt in erster Linie über die Bindung von Hormonen oder Neurotransmittern an ihren G-Protein gekoppelten Rezeptor. Über diese Bindung kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP_3 bindet anschließend an Rezeptoren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und setzt somit Ca^{2+} frei. Die Wirkung der PKC kommt beim zellulären Wachstum zum Tragen. Eine Fehlsteuerung in diesem Bereich führt unter anderem zum Tumorwachstum und kann die Entstehung von diabetischen Spätkomplikationen fördern. Eine Anwendung von PKC-Inhibitoren findet sich bereits bei der Tumorbekämpfung und kann möglicherweise auch die Mikroangiopathie bei Diabetikern günstig beeinflussen. Im Herzen ist eine Aktivierung der PKC maßgeblich am hypertrophen Wachstum beteiligt (Schreckenberget al., 2004).

1.5 Ziel der Arbeit

Vor dem Hintergrund der okklusionsbedingten Ischämie, einhergehend mit Nekrosebildung und Funktionsverlust, stellt sich die Frage nach einer medikamentösen Therapie zur Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit betroffener Kardiomyozyten und Reduktion des Remodelings. Bisher stellt die einzig protektive Maßnahme zur Reduktion des Funktionsverlustes die schnelle Reperfusion des verschlossenen Gefäßes dar. Die weiterführende Therapie basiert auf einer Verlangsamung des Funktionsverlustes mit Übergang in eine Herzinsuffizienz.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollten die Auswirkungen der Inhibitoren des hERG-Kanals und der Proteinkinase C auf das Kontraktionsverhalten normotensiver Rattenherzen von Wistar Tieren untersucht werden, mit dem Ziel, neue Ansätze zum Schutz der Zellen vor weiterem Funktionsverlust zu finden.

Diese Untersuchung erfolgte in zwei unterschiedlichen Systemen, zum Einen mittels isolierter Kardiomyozyten im Zellkulturmodell, um so die hämodynamischen und systemischen Interaktionen auszuschalten und definierte Wirkstoffkonzentrationen zu bestimmen. Zum Anderen wurden im Langendorff-Modell die Effekte am schlagenden Herzen nach einer definierten Ischämiephase mit anschließender Reperfusionsphase untersucht. Die Arbeit befasst sich mit der Wirkstoffgruppe der Bisindolylmaleimide, die je nach Modifikation PKC und hERG-Kanal hemmende Effekte aufweist (D. Thomas et al., 2004). Dabei handelt es sich um eine chemische Modifikation des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin, einem Antibiotikum aus *Streptomyces*.

2. Material

2.1 Chemikalien

ABsolute SYBR Green Fluorescein	Thermo Scientific, Schwerte (cab. AB-1219/B)
ANP	Invitrogen, Eggenstein
BNP	Invitrogen, Eggenstein
Bisindolylmaleimide 1	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Bisindolylmaleimide 5	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chelerythrin	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cytosin-Beta-Arabinofuranosid	Sigma-Taufkirchen
DTT	Invitrogen, Eggenstein
dNTP	Invitrogen, Eggenstein
Ethanol	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glucose	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
HEPES	Roche Applied Science, Mannheim
HPRT	Invitrogen, Eggenstein
Isoprenalin	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Fluka, Sigma-Aldrich Holding AG Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ CLSII	Biochrom, Berlin
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen

L-Phenylephrine	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium/Earl`s Salts	Biochrom, Berlin
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karsruhe
M-MLV-RT	Invitrogen, Eggenstein
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karsruhe
Natrium-Calcium-Austauscher (NCX)	Invitrogen, Eggenstein
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karsruhe
NaHCO ₃	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karsruhe
Oligo dt	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Eggenstein
RNAsin	Promega GmbH, Mannheim
RT-Puffer	Invitrogen, Eggenstein
SERCA	Invitrogen, Eggenstein
TriFast	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Medien

Calciumchlorid-Stammlösung:

CaCl ₂	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-Beta-Arabinofuranosid	100 µM
auf pH 7,4 titriert und steril infiltriert	

M 199-HEPES gepuffertes Perfusions-Medium:

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

Powell-Medium:

NaCl	110 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCL	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
Glucose	11 mM
mit Carbogen begast	

Vorplattiermedium:

CCT/HEPES-Stammlösung	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Waschmedium:

CCT-Kulturmedium	x ml
Gentamycin	1 ‰ (vol/vol)

Langendorff-Perfusionslösung:

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,0 mM
Glucose	5,0 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8 mM
NaHCO ₃	24 mM

Reaktionsmix für cDNA Synthese:

RT-Puffer	2 µl
Oligo dt	1 µl
dNTP	1 µl
DTT	0,5 µl
RNAasin	0,2 µl
M-MLV-RT	0,3 µl

real-time PCR-Mix:

ABsolute SYBR Green Fluorescein	10 µl
Primer	0,6 µl
Aqua bidest	6,4 µl

2.3 Puffer

Kollagenasepuffer:

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

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	30 mg

2.4 Geräte und Laborbedarf

2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Instituts der J.-L.-Universität Gießen
Gewebehacker	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Cytoperm, Heraeus, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.4.2 System zur Erkennung der 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 Instituts
der J.-L.-Universität Gießen

2.4.3 Langendorff - System

Schlauchpumpe

Ismatec Reglo Dig NS-4/8V1.13

Umwälzpumpe

MGW Lauda Typ DP8/17

Relaisbox

Univ. Relaisbox R2 Elec. MGW Lauda

Druckaufnehmer

Combitrans 1-fach Set Mod. II

J.-L.-Universität Gießen Braun

Thermokammer

Eigenbau des Physiologischen
Instituts der J.-L.-Universität Gießen

Datenregistrierung

Eigenprogrammierung des
Physiologischen Instituts
der J.-L.-Universität Gießen
mittels LabVIEW von Nat. Instruments

2.4.4 Extraktion von RNA aus den Rattenkardiomyozyten

Gewebehacker

Ultra-Turrax T2Janke&Kunkel IKA Werke,
Staufen

UV-Kammer

UV Stratalinker 2400 Stratagene, USA

Schüttler

IKA Vortex Genius 3, IKA Werke, Staufen

Zentrifuge

Allegra 25R, Beckman Coulter

2.4.5 Protein- und RNA-Gehaltmessungen

Spektralphotometer

NanoDropND-1000,
peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.4.6 PCR

Zentrifuge

Microfuge 18, Beckman Coulter

Thermocycler

Cyclogene, Techne

Thermal Cycler

my iQ Cycler, Bio-Rad Laboratories
GmbH, München

2.4.7 Sonstige Geräte

Glasgeräte

Schott, Mainz

Heizrührer

Janke&Kunkel, Staufen

pH-Meter

WTW, Weilheim

Pipetten

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Wasserbad

Julabo, Seelbach

Wasserdemineralisationsanlage

Millipore, Eschborn

Gefrierschrank (-80°C)

Hera freeze, Thermo Scientific, Schwerte

Gefrierschrank (-20°C)

Liebherr Comfort

Kühlschrank

K2320, Liebherr, Ochsenhausen

2.4.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalröhrchen

Sarstedt, Nürnberg

Eppendorf-Gefäße (1,5 ml)

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

PCR-Tubes

Thermo Scientific, Schwerte

Kulturschalen (Typ Falcon 3004)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Schleicher&Schuell, Dassel

2.4.9 Software

Excel	Microsoft
MUCEL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
my iQCycler	iQ 5 Software, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Isolation von Kardiomyozyten erfolgte aus circa 12 Wochen alten, männlichen Wistar Ratten mit einem Gewicht von 200-300 g. Diese Tiere stammten aus der hauseigenen Züchtung des Tierstalls des physiologischen Instituts der Justus Liebig Universität Gießen und hatten während der gesamten Zucht freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter von Altromin R. Die Haltung erfolgte nach den Empfehlungen für Versuchsratten und tierschutzgerecht in standardisierten Käfigen.

3.1.1 Präparation isolierter Kardiomyozyten

Die hier verwendete Methode zur Isolation von Kardiomyozyten aus Rattenherzen stammte von Piper et al. 1982 und stellt ein schonendes Verfahren zur Herauslösung der Kardiomyozyten aus den Herzmuskelzellverbänden dar.

Vor Beginn der Präparation erfolgte die Vorbereitung der Langendorff-Perfusionanlage durch Powell Medium und Carbogenbegasung. Das Powell Medium wurde in die Anlage eingeleitet, das System gespült, anschließend blasenfrei befüllt und auf 37°C erwärmt.

Die Wistar Ratten wurden mittels Diethylethernarkose für circa ein bis zwei Minuten narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Mittels Schere und Skalpell wurde der Thorax eröffnet und in einem Arbeitsgang Herz und Lunge herausgetrennt, um diese daraufhin in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung zu legen. Das ruhende Herz konnte nun von Lunge und Mediastinalgewebe befreit werden um mittels Perfusionskanüle über die Aorta ascendens an die Langendorff-Perfusionsanlage angeschlossen und retrograd perfundiert zu werden. Die initiale Einleitung von 40 ml Powell Medium wusch das restliche Blut aus dem Rattenherzen heraus.

Ein eingeleiteter Kollagenasepuffer von 50 ml perfundiert das Herz mit einer Flussgeschwindigkeit von 2-3 ml/min für ungefähr 30 min rezirkulierend.

Das angedaute Rattenherz wurde nach der Perfusion von der Langendorff-Apparatur entfernt und die Ventrikel von Aorta und Atrien freipräpariert. Erst zertrennte der Gewebehacker mit einer Schnittbreite von 0,7 mm die abgetrennten Ventrikel, später zerkleinert man diese noch manuell mit zwei Skalpellen. Zur weiteren Auftrennung wurde der Gewebebrei unter ständiger Carbogenbegasung für ungefähr 10 min in 30 ml Kollagenasepuffer gelegt und durch ständiges auf- und abpipettieren gefördert.

Da die gewonnene Suspension einen Gewebemix darstellte, wurde diese zunächst durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und anschließend für 3 min bei 400 U/min (ca. 25g) zentrifugiert. Da sich nun Zelltrümmer, Bindegewebsstücke und Kollagenaselösung von den intakten Zellen ablösten und somit abpipettiert werden konnten, wurde das übrige Filtrat mit den Myozyten nochmals in Powell-Medium, sowie zusätzlich 100 µl CaCl_2 100 mM gegeben und durch erneute Zentrifugation bei 400 U/min (ca. 25 x g) für 2 min bearbeitet.

Die hohe Dichte des in Powell-Medium vorhandenen CaCl_2 100 mM führte bei der Sedimentation der intakten Ca^{2+} -toleranten Herzmuskelzellen zu einer Aufkonzentration, die Suspension wurde nochmals in 200 µl CaCl_2 100 mM gegeben und durch aufschütteln resuspendiert. Anschließend wurden entsprechend der Anzahl präparierter Herzen Reagenzgläser zur Hälfte mit Powell-Medium mit 500 µl CaCl_2 100 mM befüllt und die Suspension darauf verteilt. Die letzte Zentrifugation für 1 min bei 300 U/min (ca. 15 x g) beförderte die Aggregate aus vorwiegend intakten Myozyten bodenwärts und bilden dort ein lockeres Sediment. Das nun überstehende Medium wurde bis auf das Sediment, welches zu ca. 80% aus intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand, abgesaugt.

3.2. Herstellung einer Zellkultur

3.2.1 Vorplattieren

Um ein Anhaften der Kardiomyozyten an der Gewebekulturschale mit einem Durchmesser von 35 mm (Falcon Nr. 3004) sicherzustellen, wurde zunächst jeweils 1 ml des Vorplattiermediums auf die Gewebekulturschalen gegeben und anschließend für 2-3 Stunden in dem Brutschrank bei 37°C gelagert. Da FCS als Nährmedium Wachstumsfaktoren enthält, förderte es die Anhaftung der Zellen auf dem Schalenboden. Somit konnte nach der hier genannten Zeitspanne das Vorplattiermedium abgesaugt und mit dem Ausplattieren begonnen werden.

3.2.2 Ausplattieren

In diesem Arbeitsschritt wurde die zuvor gewonnene Zellpopulation in ein CCT-Kulturmedium (24 ml pro Herz) gegeben und zu einer homogenen Suspension vermischt. Mittels einer Pipette wurde dann genau 1 ml der Zellsuspension auf jeweils eine der zuvor vorbereiteten Gewebekulturschalen ausplattiert und für eine Dauer von 2-3 Stunden in den Brutschrank bei 37°C und CO₂ freien Bedingungen inkubiert. In der genannten Zeitspanne bestand für die intakten Kardiomyozyten genügend Zeit zu sedimentieren und sich auf dem Boden der Gewebekulturschale anzuheften. Um sicherzustellen, dass der Versuch nicht durch eine übermäßige Anzahl an defekten Zellen oder Zelltrümmern gestört wird, wusch man jede Schale zweimal mit jeweils 1 ml Waschmedium und saugt anschließend das Medium mit den defekten Zellen ab. Es verblieb eine Kulturschale mit jeweils 1 ml CCT-Waschmedium und 90% intakten Kardiomyozyten, die sich auf dem Grund jeder Gewebekulturschale angeheftet hatten. Diese Kultur konnte nun im direkten Anschluss im Messverfahren weiterverarbeitet werden.

3.3 Elektrische Stimulation der Kardiomyozyten

3.3.1 Vorbereitung

Nach dem Versuchsprotokoll wurden die Zellkulturen direkt weiterverarbeitet und 2 Minuten vor der Messung mit den entsprechenden Substanzen versetzt (siehe Ergebnisteil).

3.3.2 Messvorgang

Vor jeder Messung mussten die Zellen eine kurze Akklimatationsphase von 37°C auf Raumtemperatur (24°C) durchlaufen und wurden dann auch mit den zu testenden Substanzen versetzt. Nach dieser Zeitspanne wurden die Kulturschalen mit einem nachfolgend beschriebenen präparierten Deckel verschlossen, der die Aufgabe hatte, einen relativ homogenen Stromfluss in dem Medium und somit an den Kardiomyozyten zu erzeugen. Der Deckel wies vier Löcher in der Anordnung eines Quadrates auf, durch jeweils zwei dieser Löcher verlief ein Draht mit direkter Verbindung, ebenfalls in der Anordnung eines Quadrates, so dass sich letztendlich zwei Drahtquadrate in der selben Größe gegenüberstanden, der eine an die Kathode, der andere an die Anode eines Stimulators angeschlossen. Der untere Teil der beiden Drahtquadrate verlief horizontal im Medium und es sollte auf diese Weise ein homogenes Feld erzeugt werden. Um nun eine vorgegebene einheitliche Kontraktion der Kardiomyozyten zu erreichen, wurden die Zellen von zwei entgegengesetzten Rechteckspannungen in der Stärke von 60 Volt mit biphasischen Stromstößen von jeweils 0,5 ms stimuliert. Die somit aufgewungene Stromstoßfrequenz wurde als Kontraktionsfrequenz umgesetzt und Spontankontraktionen beseitigt. Kardiomyozyten, die nicht in der Lage waren dieser Frequenz zu folgen, wurden nicht in das Messprotokoll aufgenommen oder berücksichtigt. Dem Versuchsprotokoll entsprechend wurde mit drei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen gearbeitet: 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz.

3.3.3 Prinzip der Messwerterfassung

Mit dem System zur Erkennung von Zellgrenzen der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg wurden die Messwerte erfasst, in einem Computer über Interface-Spannungen und Analog-Digital-Wandler registriert und gespeichert. Zu Beginn stellte man eine Kulturschale mit dem präparierten Deckel auf den Objektisch des Mikroskops, welche mit zwei Kameras ausgestattet war. Bei der Einen handelte es sich um eine normale Videokamera, die das Okularbild auf einem Monitor wiedergab. Bei der Zweiten um eine Zeilenkamera, die generell nur eine lichtempfindliche Zeile aufwies, somit mehr Pixel als ein Flächensensor darauf unterbrachte und daher eine schnellere Lesegeschwindigkeit besaß. Die einfallenden Protonen generierten Elektronen, die als Ladungen auf den Kondensatoren Spannungen produzierten, welche später mit Hilfe eines Analog-Digital-Wandlers im Computer gespeichert werden konnten. Durch die entsprechenden Helligkeitsübergänge an den Zellgrenzen konnten nun die elektrischen Signale dargestellt und übertragen werden.

Um jedoch eine Kontraktion mit der Zeilenkamera aufnehmen zu können, musste man zunächst die Zelle längs mit ihren Enden auf das Bild der eindimensionalen Zeile einpassen. Um dies zu erreichen, zentrierte man zunächst das Okularbild der Zelle durch Bewegen der Kulturschale auf dem Objektisch und drehte danach die Zeilenkamera, bis die Enden im Erfassungsbereich lagen.

Über das Interface wurden die mittlerweile elektrischen Signale an einen Oszillographen gesannt und dargestellt. Der Horizontalverstärker war auf eine feste Ablenkzeit von 0,1 ms/cm eingestellt, während der Vertikalverstärker auf 5 V/div stand und intern getriggert wurde, dies erzeugte ein stehendes Bild. Auf dem Oszillographen stellten sich die verschiedenen wahrgenommenen Helligkeitsunterschiede der Zeilenkamera in vertikaler Auslenkung dar.

Da sich bei einer Zellkontraktion die Amplituden der Zellgrenzen in horizontaler Richtung bewegten, konnte man diese elektrischen Signale beobachten.

Der Oszillograph wurde als Zwei-Kanaloszillograph betrieben, indem man eine feste Spannung des Interfaces am zweiten Kanal anschloss. Diese Spannung stellte sich als eine horizontale Linie auf dem Oszillograph dar und wurde extern über das Interface getriggert. Um nun die Zelllänge und Zellkontraktion beurteilen zu können, wurde ein Triggermarker des Interfaces vor die Amplituden des Zellbildes gesetzt. Wenn die Spannung des Zellbildes (Amplitude des Zellbildes) nun den Wert des Triggermarkers (Amplitude des Triggermarkers) erreichte, begann der Oszillograph die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Sehen konnte man dies im zweiten Kanal an einem Sprung aus der Null-Position in horizontaler Richtung nach oben. Veränderte sich nun die Position der Zellgrenze aufgrund einer Verkürzung des Zelle, so veränderte sich auch die Position, an welcher der Wert des Triggermarkers erreicht wurde, welche wiederum durch eine Positionsveränderung der Horizontalen angezeigt wurde.

Die Interface-Spannung wurde vom Oszillographen an einen Computer weitergeleitet und dort von dem Programm Mucell der Firma Scientific Instruments GmbH bearbeitet. Dieser registrierte die Spannung, welche zuvor die Amplitude und Position der Horizontalen bewegte, zu verschiedenen Zeitpunkten und stellte somit die Zelllänge in Abhängigkeit von der Zeit als Kurve dar.

Mit Beginn der Aufnahme von jeweils drei Einzelmessung erkannte das Programm den Anfang einer Kontraktion und ermittelte die folgenden Mittelwerte vier aufeinanderfolgender Kontraktionen:

L Diast	maximale diastolische Zelllänge in Mikrometern
TTP	Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion in Millisekunden ("Time-to-Peak")
Amplitude	minimale systolische Zelllänge in Mikrometern
TTP50	Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden
R50	Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke

Contraction V	maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
Relaxation V	maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Relaxationskurve)
$\Delta L/L$	Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge. Prozentuale Angabe der Zellverkürzung während der Kontraktion.

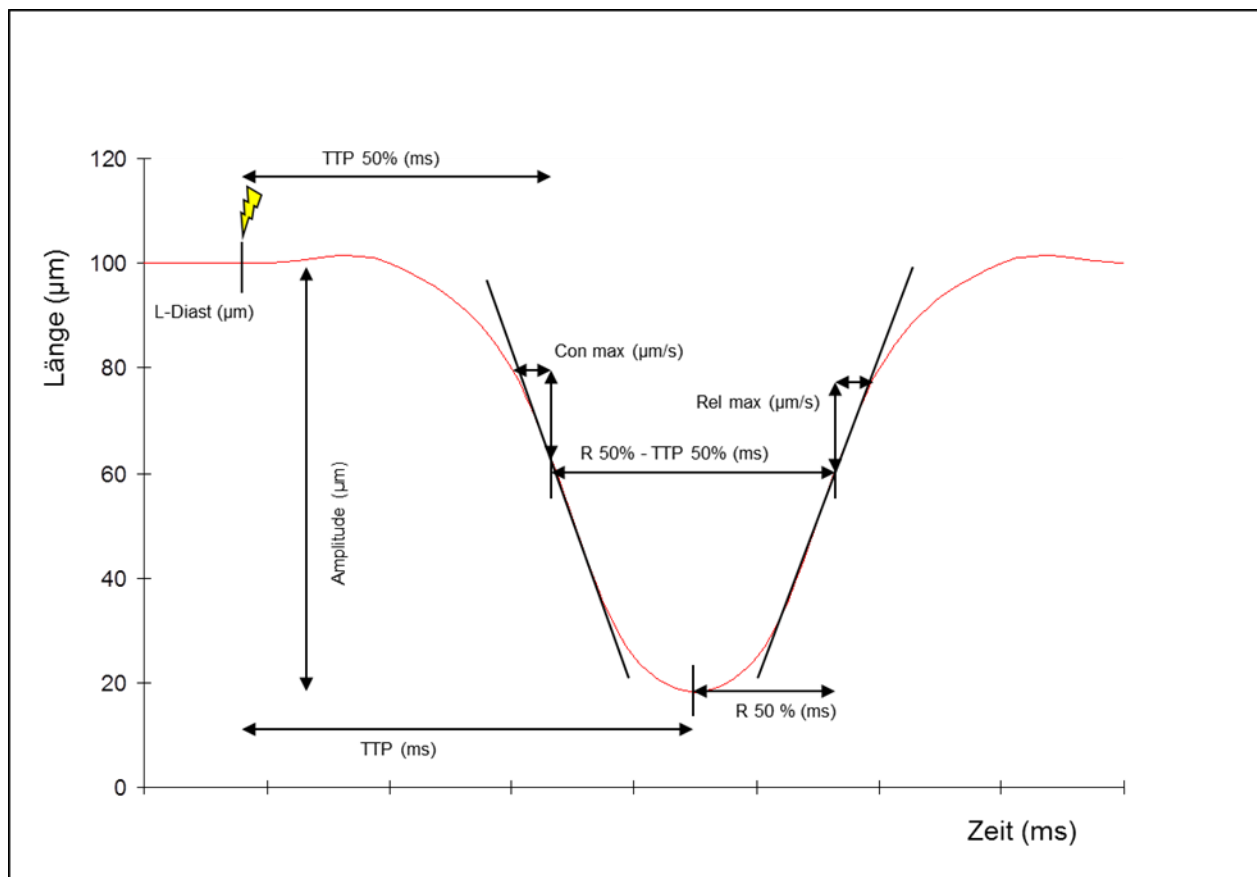


Abb. 3.3.3-1 Darstellung der Messparameter

3.3.4 Messprotokoll

Es wurde mit drei verschiedenen Frequenzen 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz gearbeitet, die wie oben beschrieben, jeweils vier aufeinanderfolgende Kontraktionen ermittelte. Das

Programm Mucel erfasste die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Parameter und sendete diese an das Programm Excel, welches aus den vier Messungen den Mittelwert, die Standardabweichung und den Median bildete.

3.4 Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzens

3.4.1 Prinzip des Langendorff-Modells

Das Langendorff-Modell wurde 1896 von Oskar Langendorff entwickelt und stellt ein Verfahren zur Erfassung biochemischer, physiologischer, morphologischer und pharmakologischer Parameter während der Herzaktion dar. Hierbei wird dem isolierten Herzen eine geeignete Nährstofflösung zugeführt und das Herz so über mehrere Stunden schlagen gelassen. Dabei handelt es sich unter standardisierten Bedingungen um ein funktionell und metabolisch stabiles System. Was man sich hierbei zu Nutze gemacht hat, war die Unabhängigkeit von systemischen Beeinflussungen, wie der sympathisch und parasympathischen Regulation, Änderungen des systemisch und pulmonalen Gefäßwiderstandes und die damit verbundene Änderung des ventrikulären Füllungszustandes. Jedoch war man auch in der Lage, experimentelle Bedingungen wie ventrikuläre Drücke, Koronarperfusion, Oxygenierung des Perfusats und Herztemperatur entsprechen einzustellen. Der diastolische Druck wurde mittels eines in den linken Ventrikel eingeführten, mit saliner Lösung befüllten Latexballons auf 10 - 12 mmHg eingestellt. Der mit dem Ballon verbundene Druckaufnehmer konnte kontinuierlich den systolischen und diastolischen Druck messen. Die Koronarperfusion wurde mit Hilfe einer Rollerpumpe auf einen Druck von 46 - 48 mmHg während der Stabilisierungsphase eingestellt und durch einen weiteren Druckaufnehmer registriert, um spätere Änderungen aufzeichnen zu können. Die Oxygenierung des Herzens bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37°C wurde mit 95% O₂ und 5% CO₂ sichergestellt. Ein weiterer Vorteil in diesem System war die Möglichkeit dem isoliert schlagendem Herz eine bestimmte Substanz direkt in die koronare Zirkulation zu

zuleiten um somit bestimmte Effekte unter dem Aspekt der Ischämie und Reperfusion beobachten zu können.

Das präparierte Rattenherz wurde in der in Eigenbau hergestellten Langendorff-Apparatur in einer Thermostatkammer platziert, hierzu brachte man eine Edelstahlkanüle oberhalb der Aortenklappe in die Aorta, sicherte sie zuerst mit einer Krokodilklemme, später mit einer Ligatur um die Aorta ascendens zwischen dem Sinus coronarius und dem Truncus brachiocephalicus. Über diese Kanüle konnte retrograd die Langendorff-Perfusionslösung eingeleitet werden. Aufgrund der geschlossenen Aortenklappe floß die Lösung dann orthograd in den Koronararterien und gelangte über den Sinus venosus in das rechte Atrium und von dort aus wiederum in den rechten Ventrikel bis in die Pulmonalarterie. An dieser Stelle wurde das Perfusat in der Reperusionsphase minütlich aufgefangen und für spätere Messungen in einem Gefrierschrank bei -80°C eingefroren. In der Zwischenzeit wurde über das linke Atrium ein flüssigkeitsgefüllter Latexballon in den linken Ventrikel platziert um so einen diastolischen Druck von 10 - 12 mmHg simulieren zu können.

3.4.2 Präparation der Rattenherzen

Die Tiere wurden der hauseigenen Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität entnommen und wie unter Punkt 3.1.1 präpariert.

3.4.3 Versuchsdurchführung

3.4.3.1 Parameter

Die Messeinrichtungen der Langendorff-Apparatur waren mit dem Computer verbunden und gaben ihre Messdaten an das Programm Phylab weiter. Im einzelnen wurden gemessen:

HF [Schläge/min] Herzfrequenz

P_{sys} [mmHg]	systolischer Druck
P_{dia} [mmHg]	diastolischer Druck
PP [mmHg]	Aortendruck
LVDP [mmHg]	linksventrikulär entwickelter Druck ($P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}}$)
dP/dt_{max} [mmHg/s]	maximale Rate des Druckanstiegs während der Kontraktion
dP/dt_{min} [mmHg/s]	maximale Rate der Druckabnahme während der Relaxation
Temperatur Kammer	Temperatur der Langendorff-Kammer
Temperatur Wasser	Temperatur des Perfusats

3.4.3.2 Versuchsprotokoll

In der initialen Phase des Ischämie-Reperfusionsversuchs nach Kanülierung der Aorta wurde durch die Langendorff-Lösung ein Perfusionsdruck von 46 - 48 mmHg aufgebaut, der Ballonkatheter in den linken Ventrikel eingebracht und entsprechend befüllt.

5 Minuten nach Beginn der Stabilisierungsphase wurden alle Rattenherzen mit einem externen Schrittmacher auf eine Frequenz von 240 Schläge/min rhythmisiert, um 5 Minuten später in die 45 minütige Ischämiephase des Experiments einzutreten. Mit Einleiten der Post-Ischämiephase wurde dem Perfusat dann die jeweiligen Substanzen BIM 1, BIM 5 und Chelerytherin einzeln oder in Kombination für 10 Minuten beigelegt. Danach stellte man die Substanzzugabe ein und perfundierte das Herz für weitere 120 Minuten mit Langendorff-Lösung. Am Ende der Perfusionsphase wurde das Herz nochmals mit dem externen Schrittmacher auf die Herzfrequenz von 240 Schläge/min rhythmisiert. Während der gesamten Zeit registrierte man die Auswirkungen der Reperfusion in Abhängigkeit von der Applikation. Am Ende des Versuchs wurde das Herz von der Langendorff-Apparatur entfernt, die Vorhöfe abgetrennt und verworfen, der linke Ventrikel vom Rechten separiert, wobei das Herzseptum dem linken Ventrikel zugeordnet wurde und dieser linke Ventrikel bei -80°C eingefroren.

Einen zusammenfassenden Überblick über den Versuchsablauf gibt die Abb. 3.4.3.2-1 wieder:

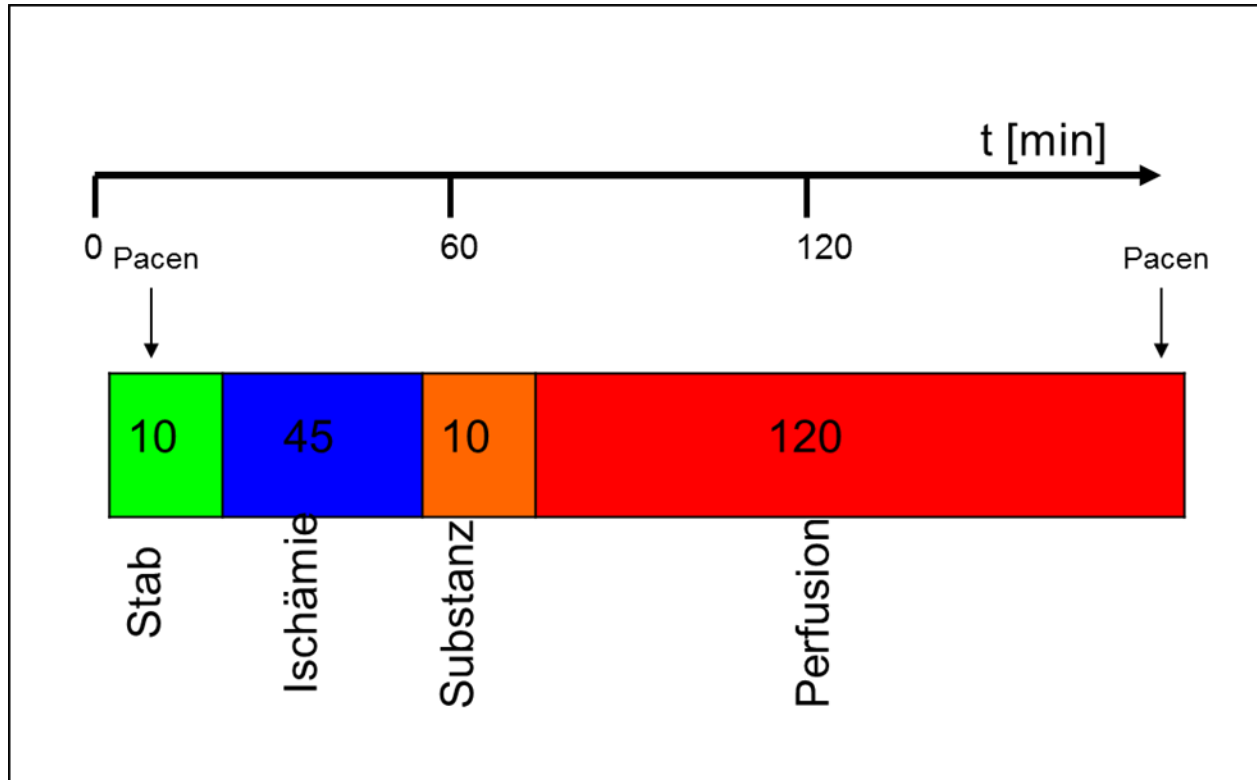


Abb. 3.4.3.2-1 Versuchsprotokoll Langendorff

3.5 Proteingehaltsmessungen der Perfusate

In diesem Schritt des Experiments wurde das zuvor eingefrorene Perfusat aufgetaut und an einem Spektralphotometer der Proteingehalt gemessen.

3.5.1 Prinzip der Spektralphotometrie

Bei dem bei der Messung eingesetzte UV/Vis-Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 von peqLab handelte es sich um ein Einstrahlphotometer mit linearem Silizium-CCD-Array als Detektor und einer Xenon-Blitzlampe als Lichtquelle. Um nun aus der Probe einen Proteingehalt bestimmen zu können, wurde die Probe mit einem definierten

Spektrum des Lichtes, in diesem Fall 220 - 750 nm, beleuchtet. Dieses Spektrum wurde wiederum in schmale Bänder mit einer Bandbreite von 3 nm zerlegt, mit einer Wellenlängengenauigkeit von 1 nm, wobei jeder dieser Kanäle einen digitalisierten Lichtstärkewert lieferte. Erreicht wurde dies mit Hilfe des UV/IR Interferenzfilters F590, der polychromatisches Licht in monochromatisches Licht spaltete. Die am Photodetektor eintreffende Lichtintensität wurde in elektrische Signale umgesetzt und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (1) in Abhängigkeit von der Absorption berechnet. Dies lieferte die Transmission (2), also die relative Durchlässigkeit und stellte als dekadischer Logarithmus die Extinktion (3) dar, die ein Maß für die Konzentration der Moleküle in der Probe war und die Möglichkeit zur quantitativen Konzentrationsbestimmung lieferte.

$$(1) \quad I_{\text{Trans}} = I_0 \times e^{-\mu d}$$

$$(2) \quad T = I_{\text{Trans}} / I_0$$

$$(3) \quad E = \log (I_{\text{Trans}} / I_0) = \log T^{-1} = \text{const} \times n = \epsilon_{\lambda} c d$$

I_{Trans}	hindurchgelassene Intensität
I_0	auf die Probe auftreffende Intensität
$\mu \text{ [m}^{-1}\text{]}$	Absorptions- oder Schwächungskoeffizient
$d \text{ [cm]}$	Dicke der Schicht
T	Transmission
E	Extinktion
const	Konstante, hängt von der Wellenlänge ab
$n \text{ [cm}^{-3}\text{]}$	Anzahldichte der absorbierenden Moleküle
ϵ	dekadisch molarer Extinktionskoeffizient
$\lambda \text{ [nm]}$	Wellenlänge
$c \text{ [mol/l}^{-1}\text{]}$	Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

Bei der durchgeführten Messung des Proteingehaltes wurde in dem vom Spektralphotometer vorgegebenen Wellenlängenbereich von 280 nm gemessen.

3.5.2 Probenvorbereitung und Messung

Bevor die Probe im Spektralphotometer gemessen werden konnte, musste sie zunächst aufgetaut werden. Der Nullabgleich erfolgte zuvor mit 1 µl aqua bidest. Die gelieferten Messwerte wurden nun zum Einen graphisch in einer Remissionskurve dargestellt und zum Anderen für den Messbereich von 280 nm quantitativ in mg/dl bestimmt.

3.6 Bestimmung des DNA-Gehaltes der Kardiomyozyten aus dem Ischämie-Reperfusionsversuch mittels PCR

3.6.1 RNA-Isolierung aus Kardiomyozyten für real-time PCR

Zur Isolierung der RNA wurden die zuvor eingefrorenen linken Ventrikel aus dem Ischämie-Reperfusionsversuch verwendet. Zu diesem Zweck wurde das Muskelgewebe in ein Einmalröhrchen gegeben und mit 1 ml TriFast überschüttet. Da TriFast Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält und Guanidinisothiocyanat durch seine stark denaturierende Eigenschaft in der Lage ist, Zellen zu lysieren, sowie RNAsen und andere Enzyme zu inhibieren, bildete dies die Grundlage zu Isolierung der RNA. Nachdem nun dem Gewebe das TriFast zugesetzt wurde, verwendete man zur groben Zerkleinerung einen Gewebehacker, so dass ein Gewebebrei entstand, der wiederum eine bessere Angriffsfläche für das TriFast lieferte. Anschließend wurde das Homogenat in ein Eppi umgefüllt und diesem 100 µl Chloroform zugeführt, nun konnte die gesamte Mischung mit einem Schüttler gut vermischt werden. Um die Auftrennung des Homogenates zu erreichen, wurde das Gemisch für 20 Minuten in der Zentrifuge bei 12500 Umdrehung/min bei 4°C geschleudert. Heraus kam eine Auftrennung des Homogenates in eine obere wässrige Phase mit der RNA, eine Interphase mit vorwiegend DNA und eine untere organische Phase mit Proteinen. Nun wurde aus der oberen RNA-haltigen Phase der Überstand von 500 µl mittels einer Pipette abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 500 µl Isopropanol

aufgefüllt. Diese neue Mischung stellte man dann bei 6°C über Nacht in den Kühlschrank. Die restlichen beiden Schichten des Homogenates konnten verworfen werden.

Nach Fällung der RNA mit dem Isopropanol konnte die Probe ein weiteres Mal für 20 Minuten zentrifugiert werden, denn wässrigen Überstand, den man dadurch vom dem RNA-Pellet am Boden isoliert hatte, wurde somit abgekippt und das Eppendorf-Gefäß mit 1 ml 70 %igen Ethanol resuspendiert und gewaschen, erneut 20 Minuten zentrifugiert, dekantiert und für eine Stunde offen stehen gelassen. Anschließend wurde dem Pellet 40 µl DEPC (Diäthylpyrokarbonat)-Wasser zugefügt und für 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Bevor die resuspendierte Probe bei -20°C weggefroren werden konnte, wurde sie noch mit dem Schüttler vermischt.

Alle Arbeitsschritte der RNA-Isolierung erfolgten auf Eis, um vorhandene RNAsen zu inhibieren.

3.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration am Spektralphotometer

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde erneut das UV/Vis-Spektralphotometer NanoDrop ND-1000, wie in 3.5.1 beschrieben, verwendet. Die Konzentrationsmessung der Probe erfolgte in ng/µl, da 2 µg der RNA in cDNA umgeschrieben werden und die Probe ein Volumen von 10 µl haben sollte, berechnete man das Probenvolumen wie folgt:

$$\frac{1000}{\text{Konzentration der RNA}} = x \mu l$$

Um nun eine Probenvolumen von 10 µl zu erhalten, mussten $x \mu l$ mit 2 multipliziert und mit aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt werden.

3.6.3 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Da in der Polymerase-Kettenreaktion ein spezifischer DNA-Abschnitt gesucht wurde, musste zunächst die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben werden, hierzu diente die mRNA als Matrize. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wurde nun die mRNA mit Oligo-dt hybridisiert, so dass ein RNA-DNA-Hybrid entstand. Da die RT als Teilaktivität eine Ribonuklease enthielt und diese zur Hydrolyse des RNA-Teils im Hybrid führte, konnte im zweiten Durchgang eine doppelsträngige cDNA durch die Reverse Transkriptase synthetisiert werden.

Diese Schritte der Synthese erfolgten im Thermocycler mit dem nachstehenden Programm:

15 Minuten	60°C	Denaturierung
Zufügen des Reaktionsmixs		
60 Minuten	37°C	Reverse Transkription
5 Minuten	95°C	Denaturierung der gewonnenen cDNA
5 Minuten	Herunterkühlen auf 5°C	

Das Probenvolumen zu Beginn betrug 10µl.

Während der ersten Phase der Synthese wurde der Reaktionsmix hergestellt, der mit der Anzahl der Proben zu multiplizieren war:

Reaktionsmix je Probe

RT-Puffer	2 µl
Oligo dt	1 µl
dNTP	1 µl
DTT	0,5 µl
RNAasin	0,2 µl
M-MLV-RT	0,3 µl

Das Volumen des hergestellten Reaktionsmixes betrug nach Zufügen von Aqua bidest. 10 µl, so dass ein Verhältnis Probe und Mix von 1:1 entstand.

Nach Fertigstellung der cDNA wurden 15 µl der cDNA in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 135 µl Aqua bidest. aufgefüllt, dadurch erreichte man eine Verdünnung von 1:10 für die nachfolgende PCR.

Anschließend konnte die cDNA bei -20°C weggefroren oder direkt weiterverwendet werden.

3.6.4 Quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion

3.6.4.1 Prinzip der real-time PCR

Die PCR stellt eine Methode zur exponentiellen Amplifikation bestimmter Genomabschnitte durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase dar und wurde 1985 von Kary Mullis beschrieben. Hierfür erhielt er 1993 den Nobelpreis für Chemie.

Für die Anwendung der PCR sind grundlegende Komponenten von Bedeutung, dazu gehört neben der zuvor genannten temperaturstabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), der Primer zur Festlegung des Startpunkts auf der DNA. Desweiteren benötigt man die DNA mit den zu amplifizierenden Sequenzen (Templates), Desoxyribonukleosidtriphosphate als Bausteine für die DNA, Mg^{2+} -Ionen für die Funktion der DNA-Polymerase, sowie eine Pufferlösung für ein geeignetes chemische Milieu. Um nun die PCR in Gang zu setzen, wurden alle genannten Komponenten als Reaktionsgemisch in Tubes gegeben und nach einem vorgegebenen Programm im Thermocycler zur Reaktion gebracht. Zur Amplifikation kommt es durch drei aufeinanderfolgende, sich ständig wiederholende Reaktionsschritte (Zyklus), angefangen mit der Denaturierung, anschließend daran das Annealing (Primerhybridisierung) und die Elongation.

Begonnen wurde mit der Denaturierung der komplementären DNA-Stränge bei 95°C, hierbei wurden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen. Im zweiten

Schritt erfolgte die Anlagerung der Primer an die DNA durch Hybridisierung bei einer Primer spezifischen Temperatur. Im letzten Schritt des Zyklus der Elongation wurde die Temperatur der Probe soweit angehoben bis die optimale Arbeitstemperatur (72°C) der DNA-Polymerase erreicht wurde. Diese verlängerte durch Anbau weiterer Nukleotide am 3'-Ende des Primers den neu entstehenden DNA-Strang. Die Zyklen wurden nach gewünschter Häufigkeit wiederholt. Bei jedem Zyklus kam es zu einer Verdopplung der Fragmente, bis eine Verlangsamung und ein Plateau-Effekt eintrat. Die Ursachen hierfür waren vielfältig, zum Einen stieg die Menge an Produkten wie DNA, Pyrophosphat und Monophosphatnukleotiden derart an, dass es zu einer Hemmung durch diese kam und die Produktfragmente häufiger miteinander hybridisierten. Zum Anderen wurden auch die Substrate langsam verbraucht, sowie die Polymerasen und Nukleotide durch die Hitze allmählich zerstört wurden. In der Regel wurden etwa 30 Zyklen durchlaufen.

Der Unterschied zwischen PCR und quantitativer real-time PCR besteht in dem interkalierenden fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green, der durch seine Eigenschaft in jedem Zyklus eine quantitative Messung am Ende ermöglicht. Bei SYBR Green handelt es sich um einen cyclischen Cyaninfarbstoff mit einer 100fach höheren Affinität zu DNA als Ethidiumbromid. Durch die Interkalierung des Farbstoffs an die DNA nimmt dessen Fluoreszenz zu und steigt proportional mit der Menge der PCR-Produkte an. Hierdurch kann eine Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Der Nachteil allerdings ist die sequenzunspezifische Bindung des Farbstoffs, so dass aus diesem Grund eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden muss. Hierbei wird durch die kontinuierliche Erhöhung der Temperatur die DNA denaturiert und der Farbstoff freigesetzt. Diese Freisetzung wird als Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA einer spezifischen PCR-Sequenz bei einer spezifischen und höheren Temperatur denaturiert als bei unspezifischen Produkten, kann eine Unterscheidung durch die Höhe der Schmelzkurve getroffen werden.

3.6.4.2 PCR Reaktionsmix

Von der unter 3.6.3 hergestellte cDNA wurde 3 µl mit 17 µl Reaktionsmix vermischt.

real-time PCR-Mix

Absolute SYBR Green Fluorescein	10 µl
Primer	0,6 µl
Aqua bidest	6,4 µl
cDNA	3 µl

3.6.4.3 Verwendete Primer

		Annealingtemperatur:
HPRT	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	fw 63°C
	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	rev
ANP	ATG GGC TCC TCC TCC ATC AC	fw 58°C
	TCT TCG GTA CCG GAA GCT G	rev
BNP	GGG CTG TGA CGG GCT GAG GTT	fw 58°C
	AGT TTG TGC TGG AAG ATA AGA	rev
NCX	CCG TAA TCA GCA TTT CAG AG	fw 53°C
	GCC AGG TTC GTC TTC TTA AT	rev
SERCA	CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA	fw 57°C
	AGG AGA TGA GGT AGC CGA TGA A	rev

3.6.4.4 Laufprogramm

Der ICycler durchlief ein 3 Stufen Programm in dem die jeweilige Annealingtemperatur der Primer berücksichtigt wurde:

Zyklus 1:	1x	95°C	3 Minuten	
Zyklus 2:	45x	95°C	90 Sekunden	Denaturierung
		x°C	30 Sekunden	Annealing
		72°C	30 Sekunden	Amplifikation
Zyklus 3:	100x	50-100°C	je 10 Sekunden	Schmelzkurve

3.6.4.5 Auswertung der PCR

Um nun quantitativ die Menge an DNA bestimmen zu können, muss ein Schwellenwert, der sogenannte Threshold, überschritten werden. Unterhalb dieses Schwellenwertes in den vorhergehenden Zyklen ist die Amplifikation soweit begrenzt, dass die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen als suboptimal gelten und die Templatemenge daher nicht gemessen werden kann. Erst mit dem exponentiellen Anstieg der Templatemenge kreuzt sie den Threshold, dieser Punkt wird als Ct-Wert (cycle threshold) beschrieben und gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund Fluoreszenz ansteigt. Dies ist in Abb. 3.6.4.5-1 zu sehen, hier stellen sich Threshold (orange) und DNA-Menge (blau) dar.

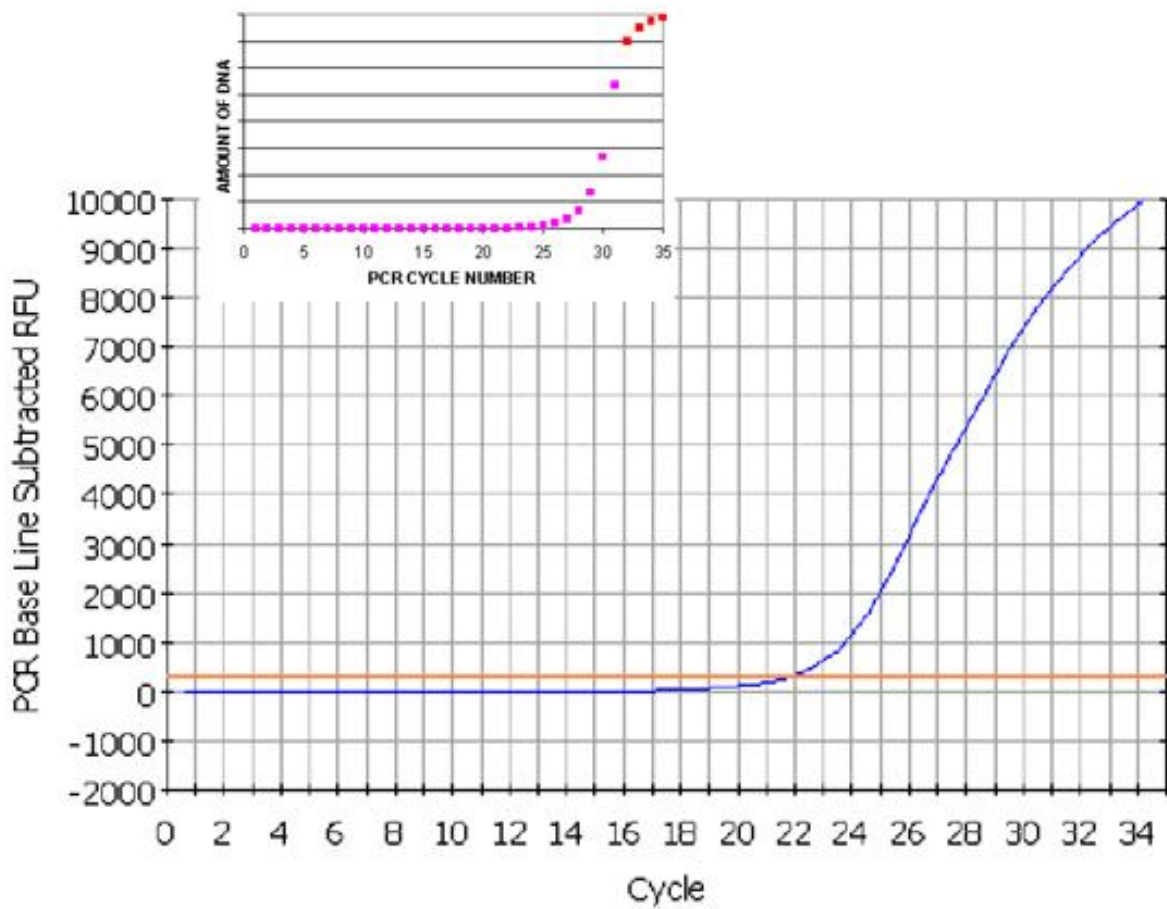


Abb. 3.6.4.5-1 Darstellung des real-time PCR Kurvenverlaufs

M. Hunt, Real Time PCR, 2010

Betrachtet man dies in einer logarithmischen Skala, erkennt man den linearen Zusammenhang zwischen DNA-Menge und Zyklushäufigkeit, dargestellt in der Abb. 3.6.4.5-2

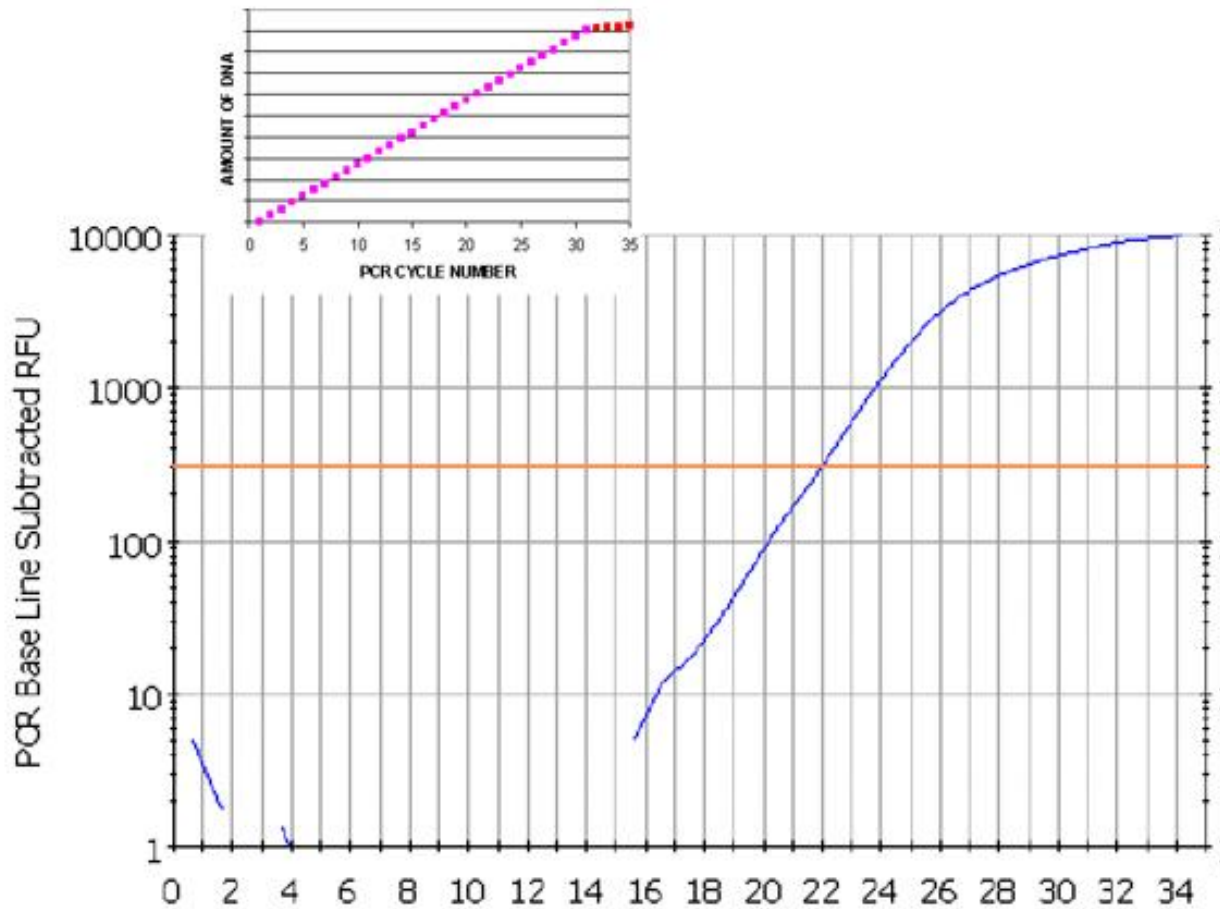


Abb. 3.6.4.5-2 Logarithmische Darstellung

M. Hunt, Real Time PCR, 2010

Überträgt man dies auf die Abb. 3.6.4.5-1, ersichtlich in Abb. 3.6.4.5-3, zeigt sich, dass es sich dabei um den kurzen exponentiellen Anstieg der Kurve zu Beginn handelt. Aufgrund der hohen Effizienz in dieser Phase der Kurve ist mit einer hohen Genauigkeit bei der Bestimmung zu rechnen.

Linear ~20 to ~1500

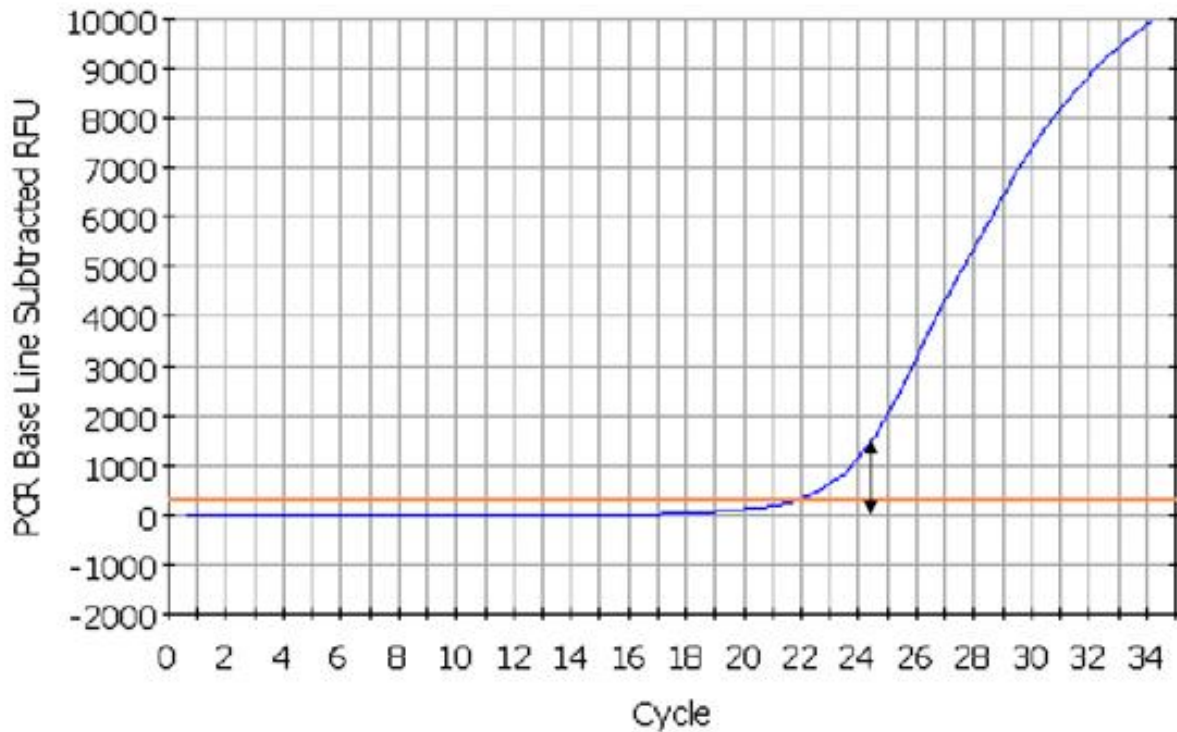


Abb. 3.6.4.5-3 Exponentieller Anstieg im Kurvenverlauf

M. Hunt, Real Time PCR, 2010

Wie schon zuvor beschrieben, kann sich das fluoreszierende SYBR Green auch an nicht erwünschte DNA anhaften und so zu einer Fluoreszenzzunahme führen. Die Unterscheidung wird mit Hilfe der Schmelzkurve anhand verschiedener Temperaturempfindlichkeiten getroffen. Dies ist in Abb. 3.6.4.5-4 zu sehen.

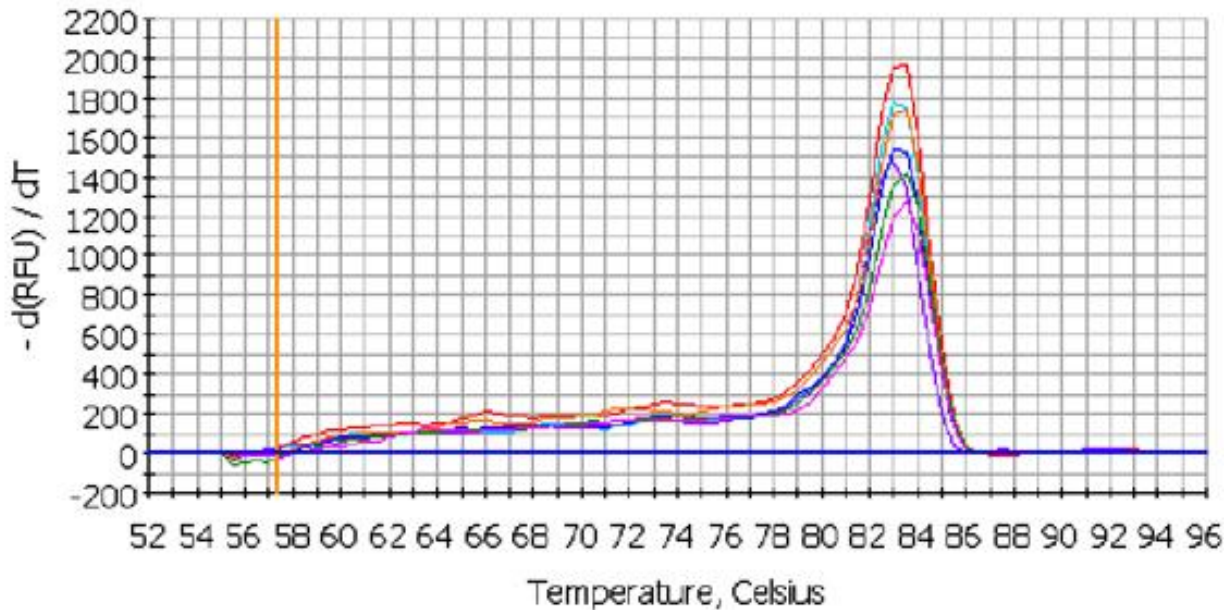


Abb. 3.6.4.5-4 Schmelzkurve

M. Hunt, Real Time PCR, 2010

Zur Quantifizierung stehen nun generell zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die absolute und relative Quantifizierung. Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um die Relative, die die Genexpressionen eines Zielgenes und eines nicht regulierten Housekeeping Gens aufeinander bezieht, man bezeichnet dies auch als Normalisierung der Expressionsergebnisse. Als Housekeeping Gen wurde HRPT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet. Der Vorteil liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da das Zielgen und das HKG gleichermaßen von Fehlern bei der reversen Transkription, Gewebe- und Matrixeffekten, sowie unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen in einer experimentellen Probe betroffen sind.

Zur Berechnung gibt es nun wiederum verschiedene Methoden, deren Effizienzen sehr unterschiedlich sind. Die genaueste Methode stellte die Berechnung anhand des zuvor beschriebenen exponentiellen Modells (Pfaffl Methode) dar. Hierfür werden zwei Maxima herangezogen, das erste Maximum entspricht dem ersten Ct-Wert der exponentiellen PCR Funktion, das zweite Maximum stellt den Punkt dar, ab dem die

Fluoreszenz nicht mehr exponentiell zunimmt. In der Regel werden 6-10 Ct-Werte zur Berechnung der Effizienz herangezogen. Unter einer 100%igen Effizienz versteht man die Verdopplung der Produktmenge mit jedem Zyklus. Bei dem hier genannten Berechnungsmodell erreicht man Effizienzen im Bereich von 1,65 bis 1,90 und dies stellt im Vergleich zu anderen Methoden, die Methode mit der höchste Genauigkeit bei der geringsten Varianz dar.

3.7 Statistik und Auswertung

Zu der Auswertung der einzelnen Experimente wurden diese zusammengefasst und als Median oder Mittelwert bestimmt. Wurden mehrer Gruppen miteinander verglichen, erfolgte die Ermittlung der Standardfehler mittels ANOVA mit nachfolgendem Duncan-Test als post-hoc-Analyse. Sollten zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde ein konventioneller T-Test für gepaarte Proben angewendet. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse mit $p < 0,05$.

Zur Darstellung der Expressionsergebnisse wurden Säulendiagramme verwendet. Jede der Säulen beinhaltet ein Großteil der Daten mit 95% nach der Normalverteilung.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss unterschiedlicher Bisindolylmaleimid-1-Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

4.1.1 Einfluß auf die Zellverkürzungsamplitude

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen (5×10^{-9} - 5×10^{-6} mol/l) von Bisindolylmaleimid-1 (BIM-1) auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten untersucht. Aus der Literatur geht hervor, dass es sich hierbei um einen Proteinkinase-C-Inhibitor, sowie hERG-Channel-Inhibitor handelt (Thomas, 2004). Die Zellen wurden 2 Minuten vor der elektrischer Stimulation mit BIM-1 inkubiert. Die Zellstimulation erfolgte durch unterschiedlichen Frequenzen von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte ein signifikant gesteigertes Kontraktionsverhalten der Zellen bei Konzentrationen von 5 μ M und einer Frequenz von 0,5 Hz (Abb. 4.1.1-1). Gemessen wurde auch die frequenzabhängige Amplitude unbehandelter Kulturschalen im Vergleich zu behandelten Kulturschalen unterschiedlicher Konzentrationen bei höheren Frequenzen.

Obwohl die Frequenz von 0,5 Hz eine unphysiologisch niedrig Stimulation für Rattenherzen darstellt, zeigte sich hier die ausgeprägte Zellverkürzungsamplitude (Abb. 4.1.1-1). Betrachtet man die Konzentrationen, erscheint die größte Ausprägung bei einer Konzentration von 5 μ M. Auch bei höheren Stimulationsfrequenzen blieb der Einfluß von BIM-1 erhalten.

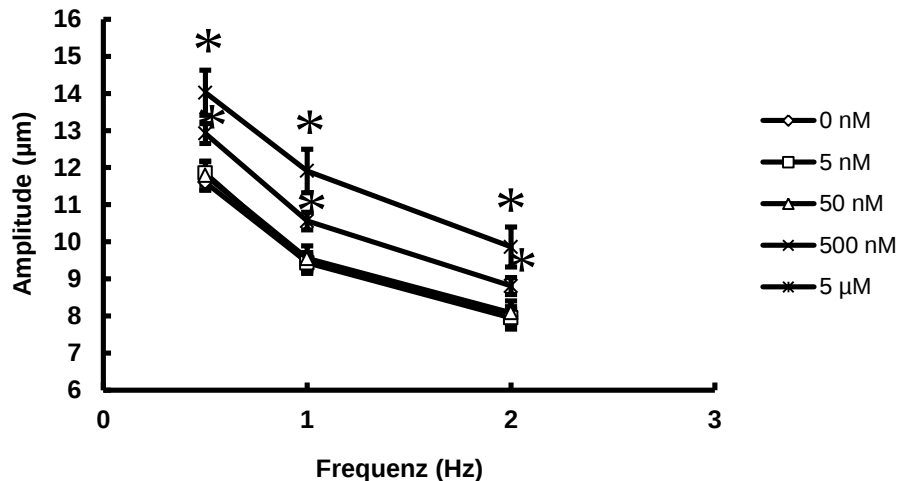


Abb. 4.1.1-1 BIM-1 konzentrationsabhängige Verkürzungsamplitude bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als minimale systolische Zelllänge in μm . ANOVA: $\ast = p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

4.1.2 Einfluß auf die frequenzabhängige Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge

Auch hier zeigt sich bei einer Konzentration von 5 μM eine signifikante Zellverkürzung während der Kontraktion, wobei diese bei einer Frequenz von 0,5 Hz wiederum am Stärksten erscheint (Abb. 4.1.2-1). Die lastfreie Zellverkürzung stellt hierbei das indirekte Maß für die Kontraktilität dar.

Bezieht man dies nun auf die Kontrollgruppe, welche im Maßstab auf 100% gesetzt wird, ergibt sich prozentual eine signifikante Zellverkürzung bei allen Frequenzen für 5 μM um ca. 30% (Abb. 4.1.2-2).

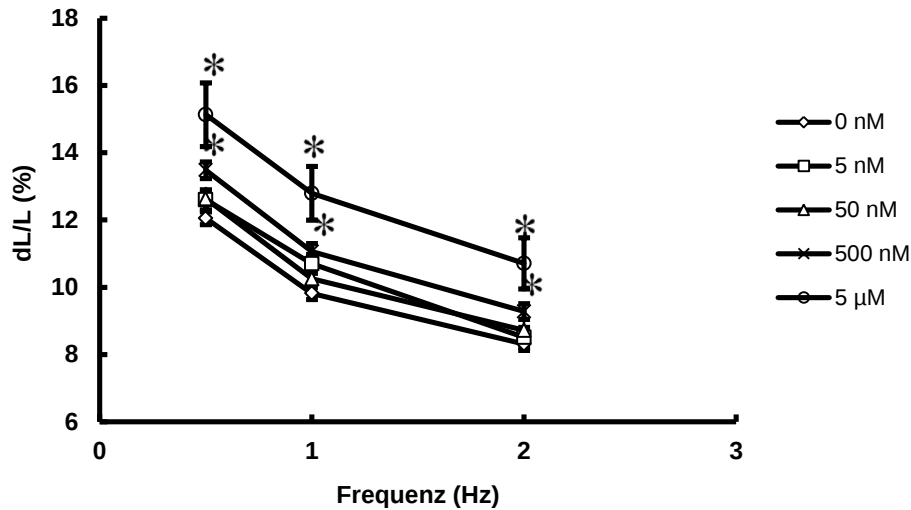


Abb. 4.1.2-1 BIM-1 konzentrationsabhängige relative Zellverkürzung bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

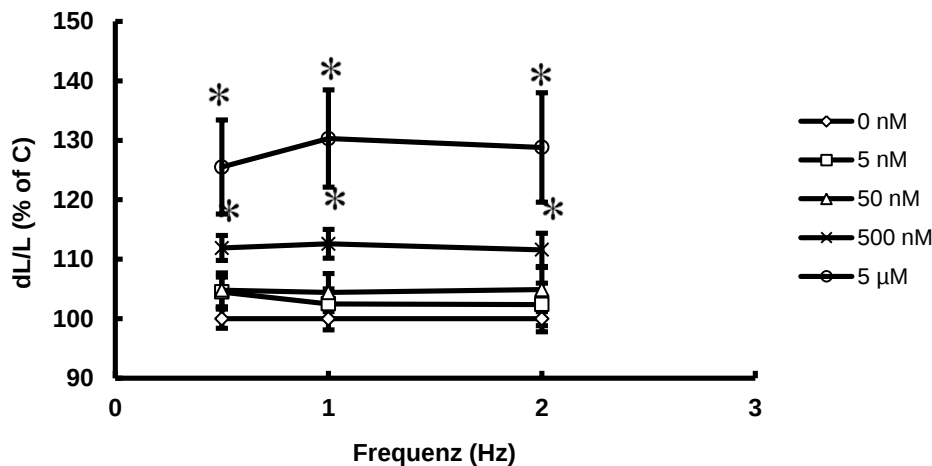


Abb. 4.1.2-2 Konzentrationsabhängige relative Zellverkürzung in prozentualer Angabe zur Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

4.1.3 Kontraktionsverhalten bei Stimulation einer von 0,5 Hz

Betrachtet man nun das Kontraktionsverhalten bei der ausgewählten Frequenz von 0,5 Hz, zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 nM) eine Zunahme der Amplitude mit steigender Konzentration, wobei hier das Maximum bei 5 μ M erreicht wird (Abb. 4.1.3-1). Ebenso ist aus den Abb. 4.1.3-2 und 4.1.3-3 eine signifikante Zunahme der Zellverkürzung ersichtlich. Das Maximum wird auch hier bei der Konzentration von 5 μ M erreicht.

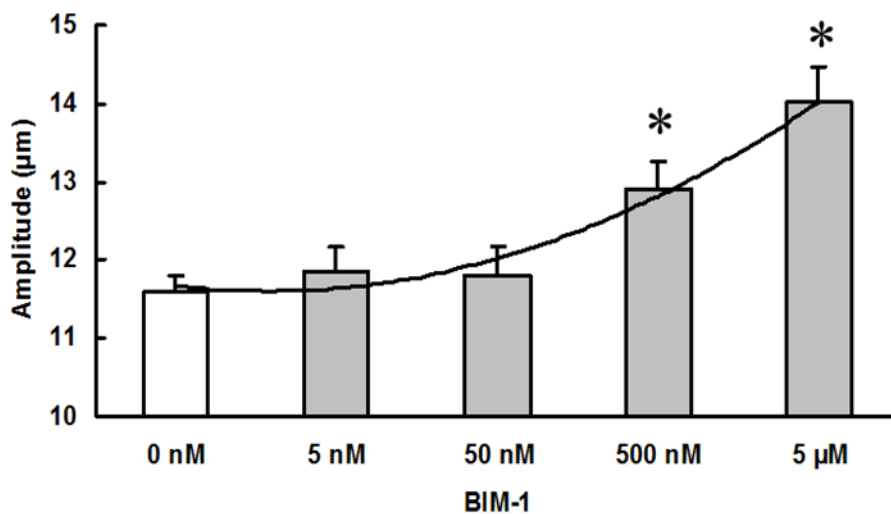


Abb. 4.1.3-1 Konzentrationsabhängige systolische Zelllänge bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als minimale systolische Zelllänge in μ m. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

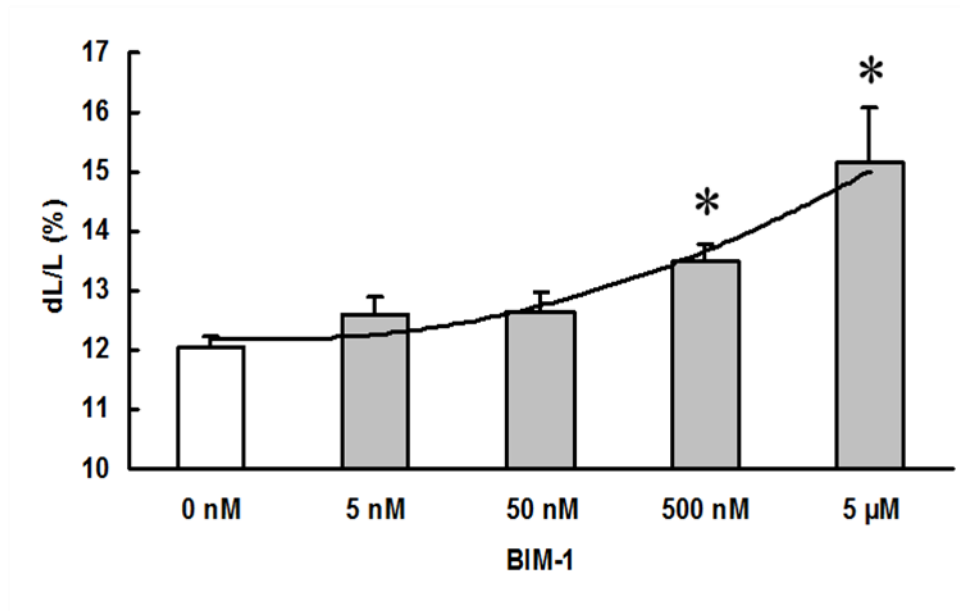


Abb. 4.1.3-2 Konzentrationsabhängige relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

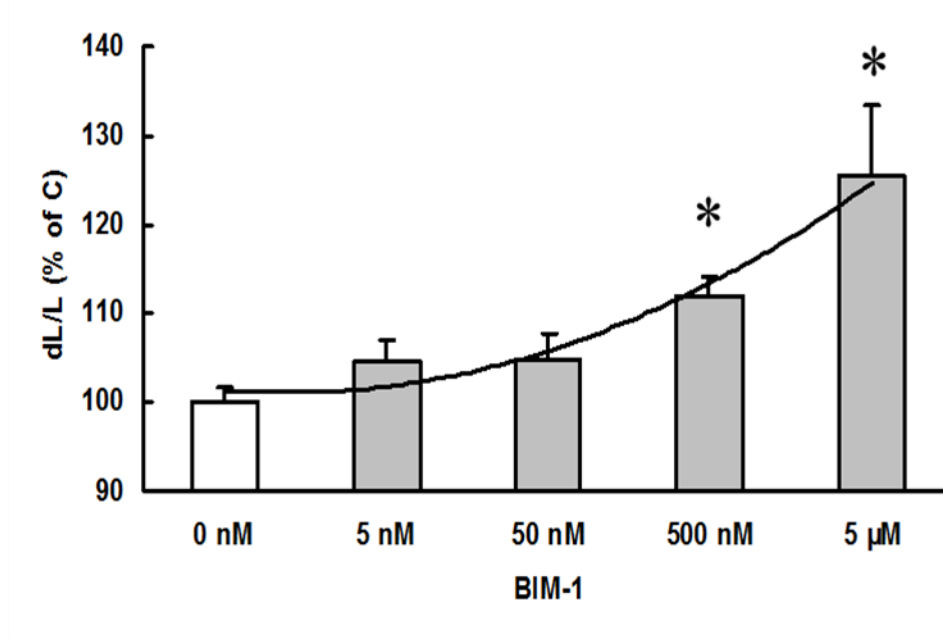


Abb. 4.1.3-3 Konzentrationsabhängige relative Zellverkürzung in prozentualer Angabe zur Kontrollgruppe bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

In Abb. 4.1.3.-4 ist zu erkennen, dass mit steigender Konzentration von BIM 1 auch die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit signifikant ansteigt.

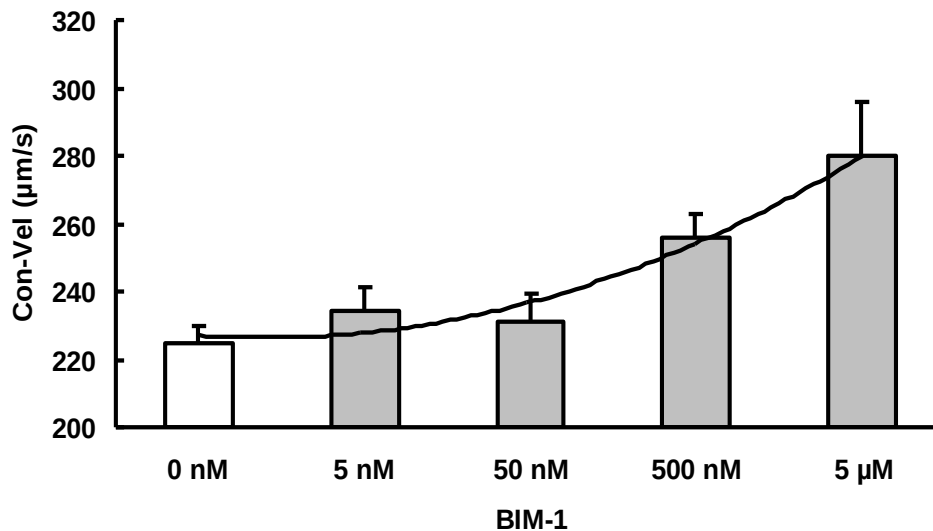


Abb. 4.1.3-4 Darstellung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve. n=36.

Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit steigt langsam mit zunehmender Konzentration von Bisindolylmaleimid-1 an, jedoch kommt es erst bei der Konzentration von 5 µM zu einem signifikanten Anstieg (Abb. 4.1.3-5).

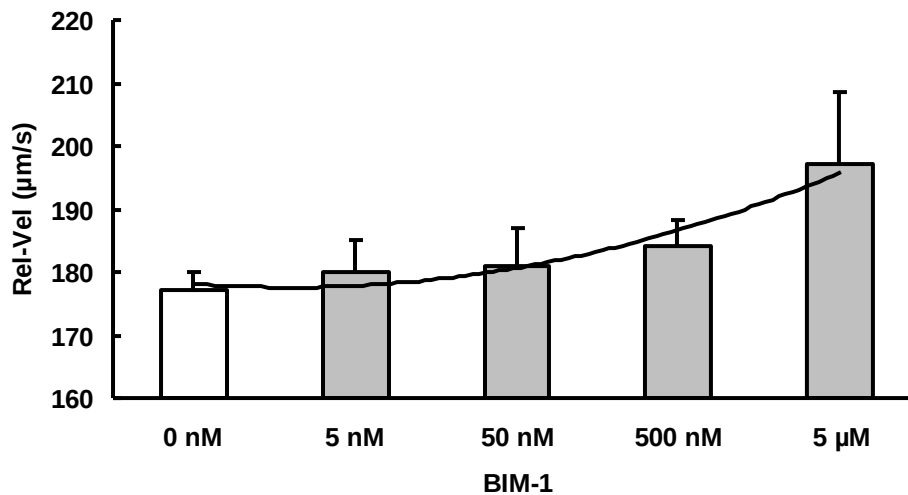


Abb. 4.1.3-5 Darstellung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Relaxationskurve. n=36.

Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von BIM-1 auf die TPP50 (Abb. 4.1.3-6) zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe erst eine Geschwindigkeitsabnahme aus der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion, um dann bei einer Konzentration von 5 µM eine Zeitzunahme gegenüber der Kontrollgruppen zu verzeichnen. Betrachtet man nun die R50 (Abb. 4.1.3-7), kommt es auch hier erst zu einer Abnahme der Zeit von der maximalen Kontraktion bis 50% der Relaxation, um dann bei den Konzentrationen von 500 nM und signifikant bei 5 µM über die Zeit der Kontrollgruppe anzusteigen.

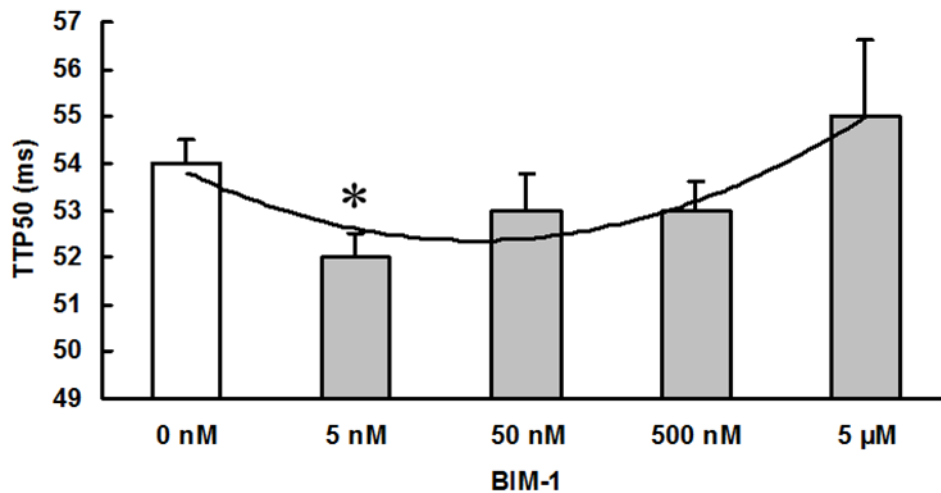


Abb. 4.1.3-6 Einfluss unterschiedlicher BIM-1 Konzentrationen auf die TPP50 bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

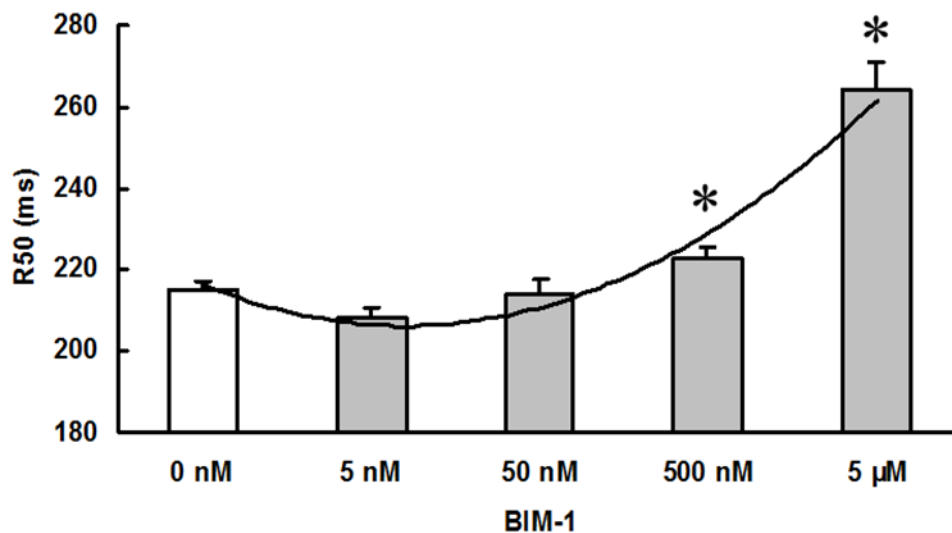


Abb. 4.1.3-7 Einfluss unterschiedlicher BIM-1 Konzentrationen auf die R50 bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der maximalen Zellkontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

4.2 Einfluss von ISO und BIM-1 auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

In den folgenden Versuchen wurde das Kontraktionsverhalten von BIM-1 in der Konzentration 5 μ M im Vergleich zu Isoprenalin in der Konzentration von 10 nM, sowie deren additive Effekte untersucht. Bei Isoprenalin handelt es sich um ein synthetisches racemisches Noradrenalin-Derivat, das als Sympathomimetikum selektiv die Beta-Adrenozeptoren anspricht.

4.2.1 Frequenzabhängiges Kontraktionsverhalten

In dieser Versuchsreihe wurde wiederum der Einfluss der schon bekannten Frequenzen von 2, 1 und 0,5 Hz auf das Kontraktionsverhalten untersucht. Die systolische Zelllänge (Abb. 4.2.1-1) zeigt bei niedriger Frequenz von BIM-1 ein signifikantes Maximum, bricht im Vergleich zu Isoprenalin, sowie deren Kombination mit BIM-1 bei höheren Frequenzen jedoch unter deren Niveau ein. Isoprenalin und die Kombination mit BIM-1 verlaufen weitgehend parallel zueinander und zeigen keinen signifikanten Unterschied. Das nahezu gleiche Bild ergibt sich bei der Darstellung des Kontraktionsverhaltens (Abb. 4.2.1-2) mit einer maximalen Ausprägung bei der Frequenz von 0,5 Hz.

Vergleicht man die relative Zellverkürzung (Abb. 4.2.1-3) nun mit der Kontrollgruppe, zeigt sich eine signifikante Zellverkürzung bei alle Frequenzen in allen Versuchsgruppen. Hier verläuft die BIM-1-Gruppe nahezu parallel zur Kontrollgruppe, wohingegen Isoprenalin und deren Kombination mit BIM-1 mit zunehmender Frequenz ansteigt.

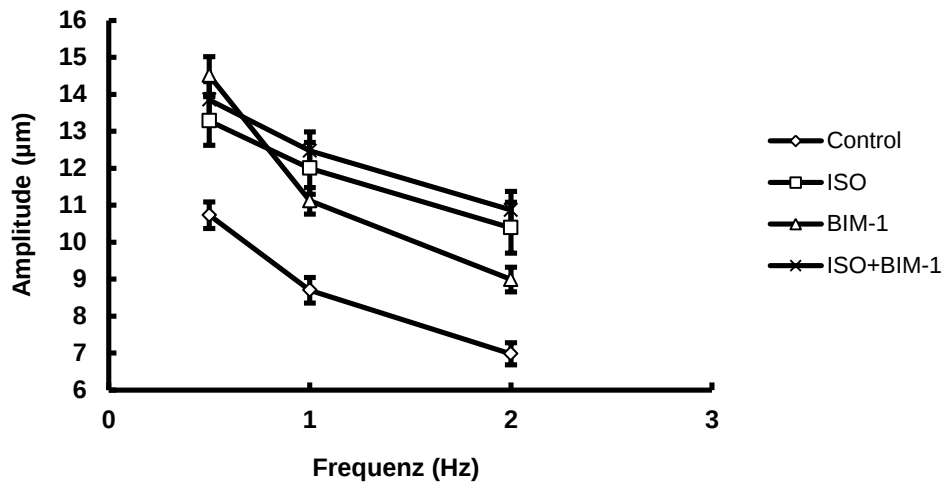


Abb. 4.2.1-1 Frequenzabhängige systolische Zelllänge durch den Einfluss von Isoprenalin und BIM-1.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als minimale systolische Zelllänge in μm . $n=36$.

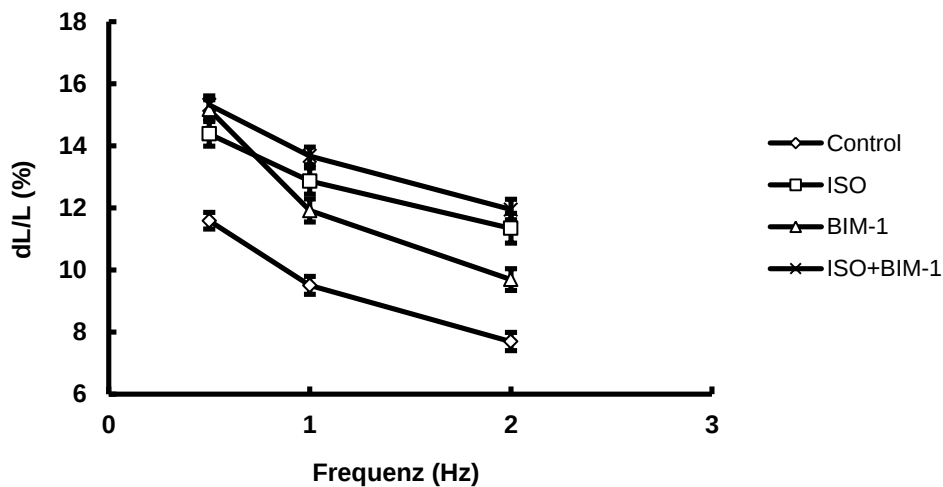


Abb. 4.2.1-2 Frequenzabhängige relative Zellverkürzung durch den Einfluss von Isoprenalin und BIM-1.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. $n=36$.

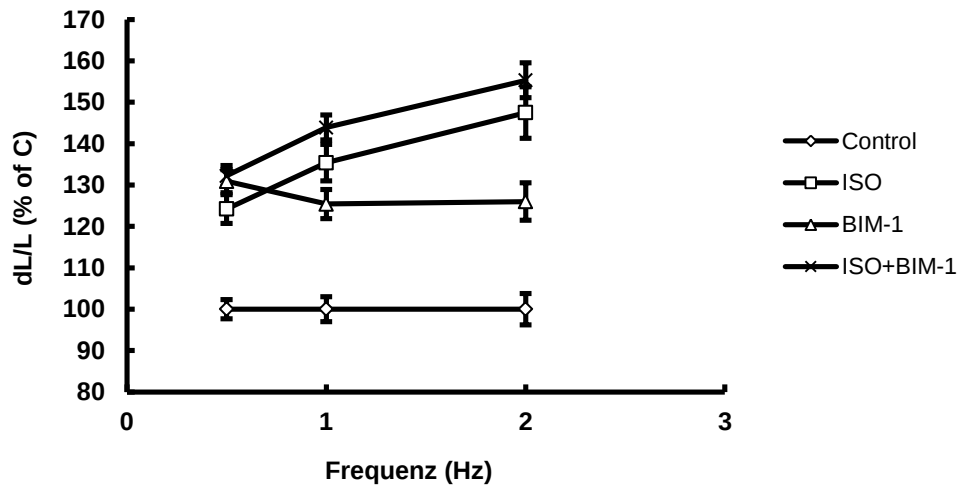


Abb. 4.2.1-3 Frequenzabhängige relative Zellverkürzung in prozentualer Angabe zur Kontrollgruppe durch den Einfluss von Isoprenalin und BIM-1.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. n=36.

4.2.2 Kontraktionsverhalten bei einer Stimulation von 0,5 Hz

Überträgt man nun die systolische Zelllänge (Abb. 4.2.2.-1) der Versuche mit Isoprenalin, Bisindolylmaleimid-1 und deren Kombination in ein Säulendiagramm, sieht man in allen drei Fällen einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe, ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Zellverkürzung (Abb. 4.2.2-2, Abb. 4.2.2-3).

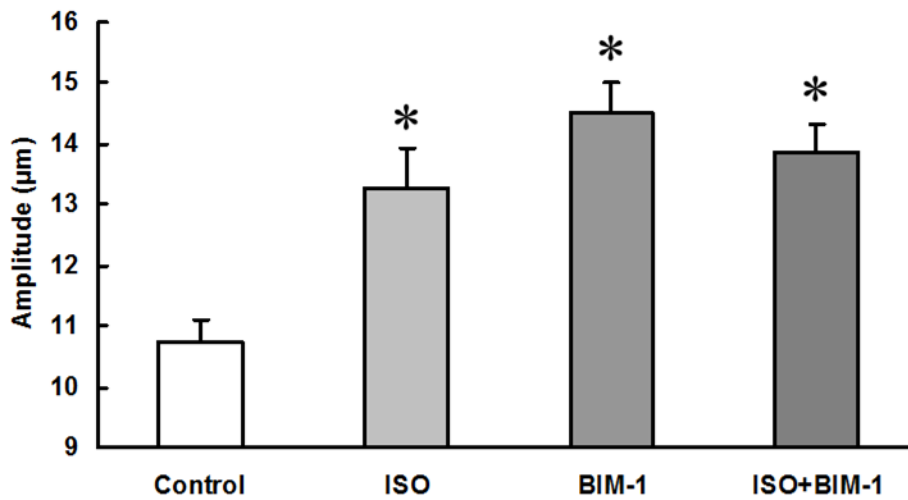


Abb. 4.2.2-1 Substanzabhängige systolische Zelllänge bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als minimale systolische Zelllänge in µm. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

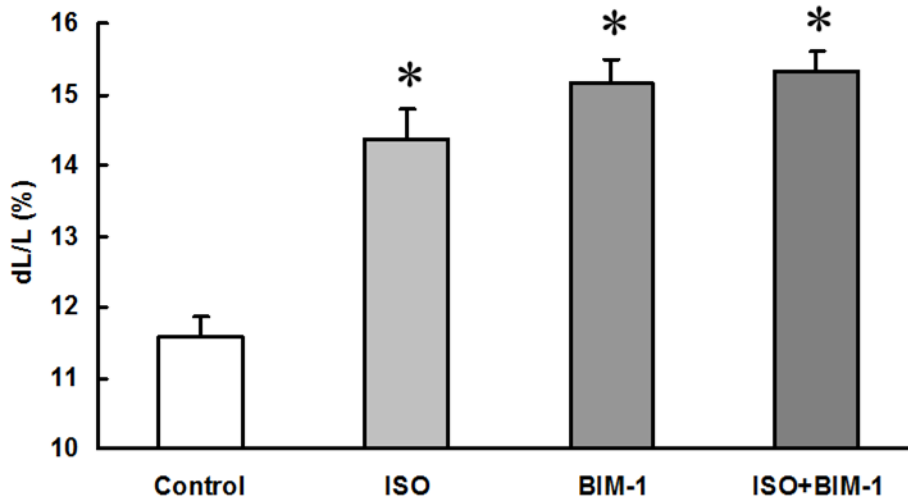


Abb. 4.2.2-2 Substanzabhängige relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

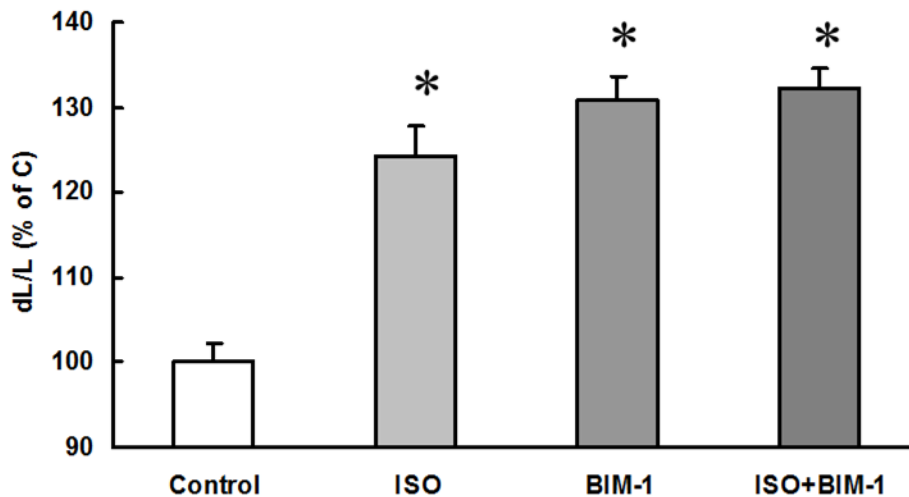


Abb. 4.2.2-3 Substanzabhängige relative Zellverkürzung in prozentualer Angabe zur Kontrollgruppe bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

Zwar kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 4.2.2-4) von Isoprenalin, BIM-1 und ISO+BIM-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch ist dieser im Fall von BIM-1 nicht so ausgeprägt, wie der Anstieg der beiden Anderen. Dieses Verhalten zeigt sich auch bei der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 4.2.2-5), aber weniger signifikant. Bei einem Blick auf die TTP50 (Abb. 4.2.2-6) kommt es nur bei ISO und ISO+BIM-1 zu einer signifikanten Geschwindigkeitszunahme, bei der R50 (Abb. 4.2.2-7) im Fall von BIM-1 dann zu einer Geschwindigkeitsabnahme.

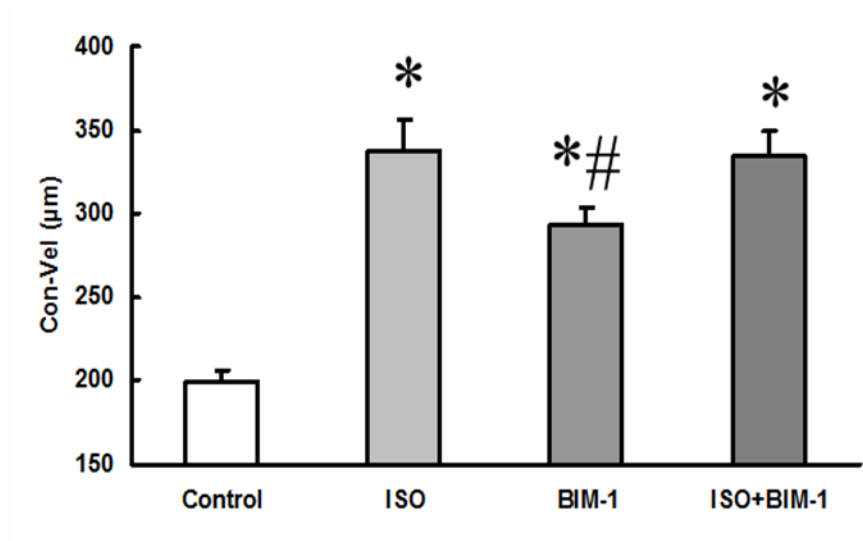


Abb. 4.2.2-4 Darstellung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve. ANOVA:

*= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), #= $p < 0,05$ vs ISO, $n=36$.

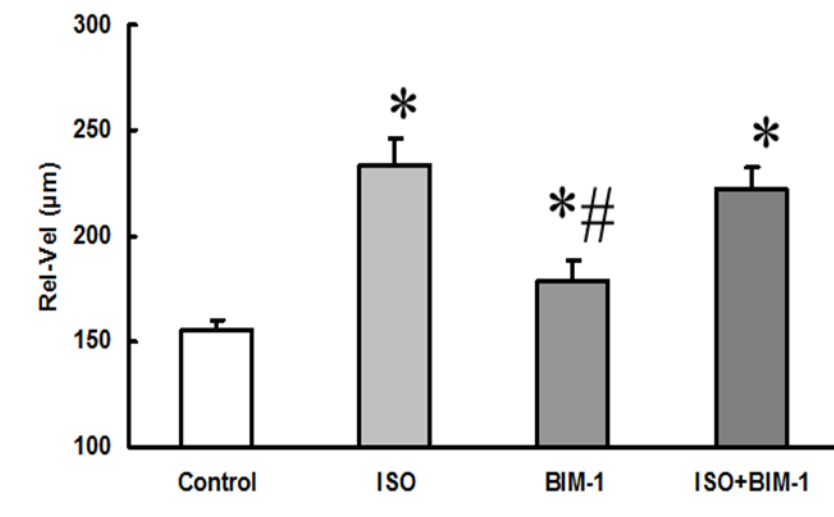


Abb. 4.2.2-5 Darstellung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Relaxationskurve. ANOVA:

*= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), #= $p < 0,05$ vs ISO, $n=36$.

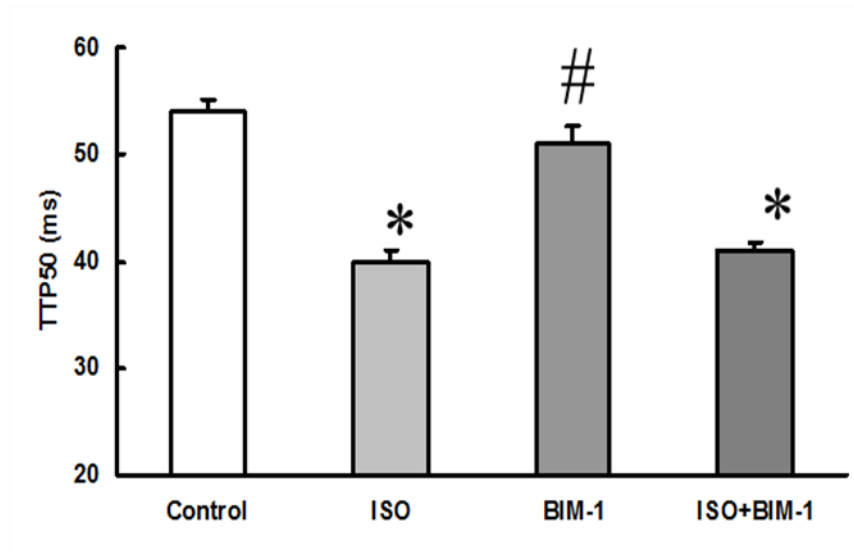


Abb. 4.2.2-6 Einfluss der Substanzen ISO und BIM-1 auf die TTP50 bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), #= $p < 0,05$ vs ISO, $n=36$.

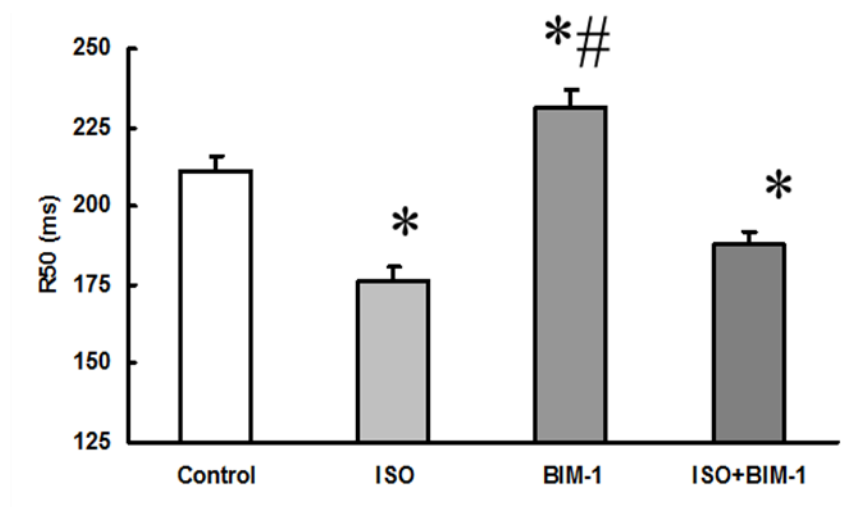


Abb. 4.2.2-7 Einfluss der Substanzen ISO und BIM-1 auf die R50 bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der maximalen Zellkontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), #= $p < 0,05$ vs ISO, $n=36$.

4.3 Einfluss von CEC und BIM-5 auf des Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

Da es sich bei BIM-1 um einen PKC-Inhibitor und hERG-Kanal-Inhibitor handelt, wurde nunmehr untersucht, ob eine selektive PKC-Hemmung mittels Chelerythrin (CEC) oder der hERG-Kanäle durch BIM-5 einen ähnlichen Effekt ausübt.

4.3.1 Kontraktionsverhalten von Chelerythrin bei unterschiedlichen Frequenzen

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden unbehandelte Kulturschalen mit CEC-behandelten Kulturschalen verglichen. Bei Chelerythrin handelt es sich um einen PKC-Inhibitor, der in der Konzentration von 1 μ M 2 min vor Messbeginn zu den Zellen gegeben wurde. Die Messung erfolgte mit den Stimulationsfrequenzen von 2, 1 und 0,5 Hz.

Beobachten lässt sich in eine signifikante Kontraktilitätsabnahme der Zellen bei einer Frequenz von 0,5 Hz gegenüber unbehandelten Zellen, die bei Frequenzzunahme noch stärker abnimmt. Entsprechend der Abnahme verhalten sich auch die Geschwindigkeiten der Kontraktion und Relaxation (Abb. 4.3.1-4 und Abb.4.3.1-5) abnehmend. Allerdings zeigt sich im Rahmen der Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 4.3.1-4) bei 0,5 Hz eine Ausnahme, da es hier zu keinem Abfall der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit kommt.

Die TTP50 (Abb. 4.3.1-6) und R50 (Abb. 4.3.1-7) präsentieren sich mit einer frequenzabhängigen Reduktion der Zeit bei der Zellkontraktion und Relaxation.

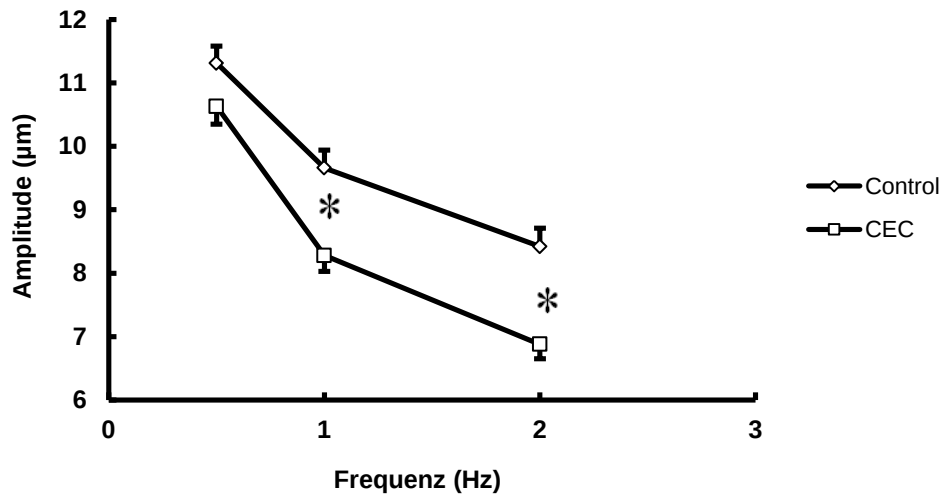


Abb. 4.3.1-1 Einfluss von CEC auf die systolische Zelllänge bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als minimale systolische Zelllänge in μm . ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

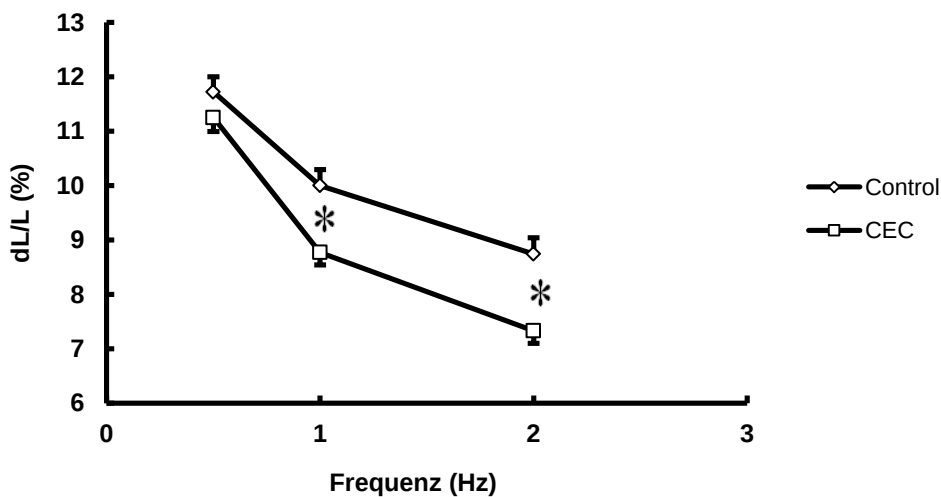


Abb. 4.3.1-2 Einfluss von CEC auf die relative Zellverkürzung bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

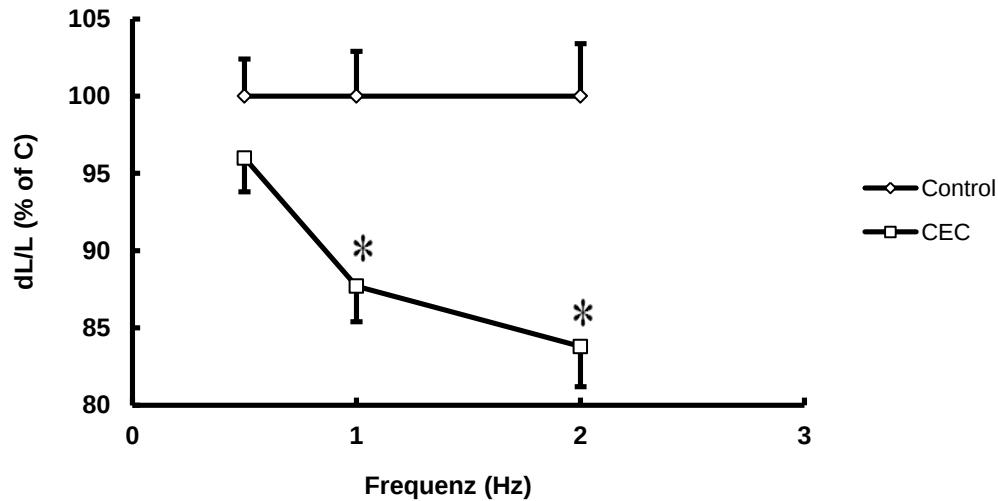


Abb. 4.3.1-3 Einfluss von CEC auf die relative Zellverkürzung in prozentualer Angabe zur Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

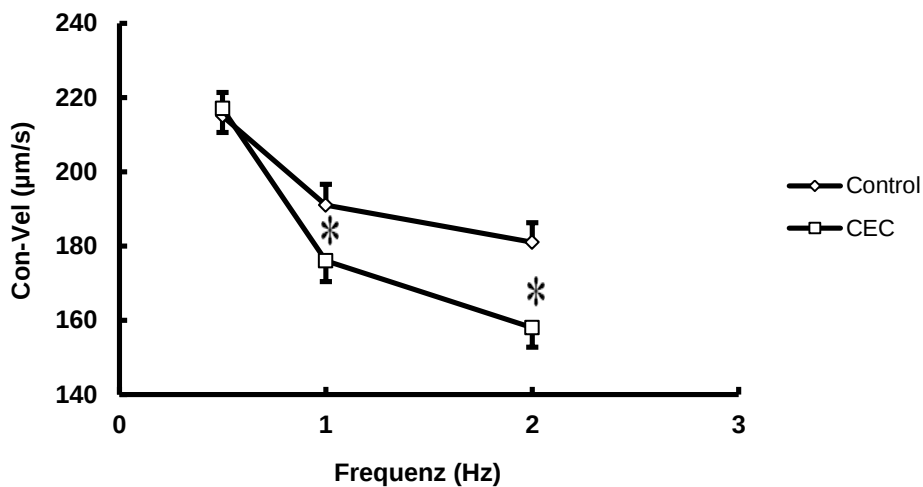


Abb. 4.3.1-4 Einfluss von CEC auf die maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

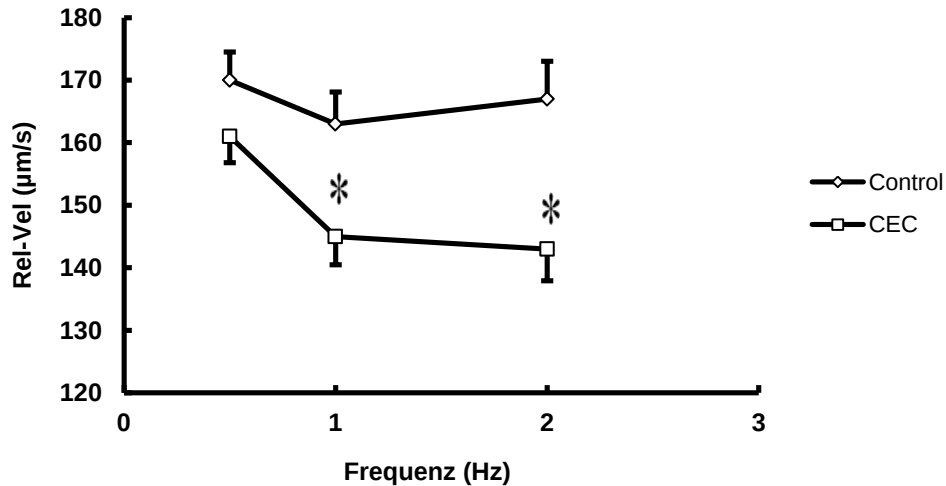


Abb. 4.3.1-5 Einfluss von CEC auf die maximalen Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Relaxationskurve. ANOVA:

*= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

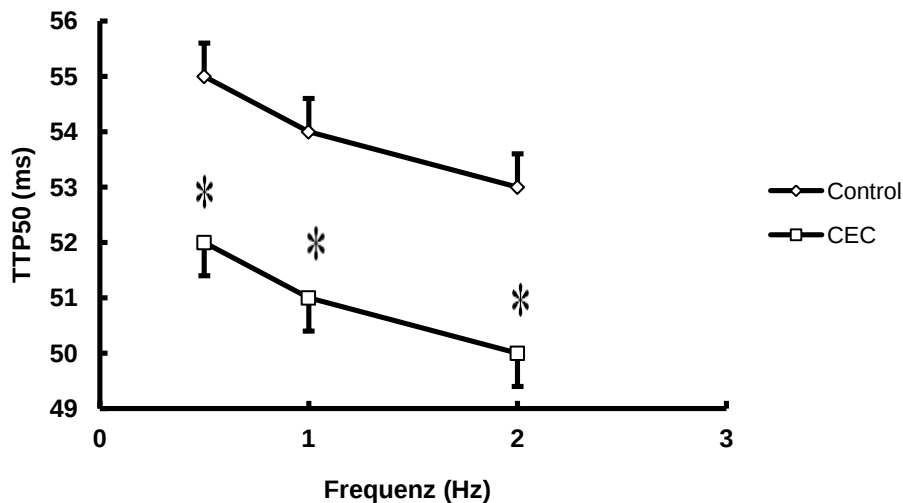


Abb. 4.3.1-6 Einfluss von CEC auf die TPP50 bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

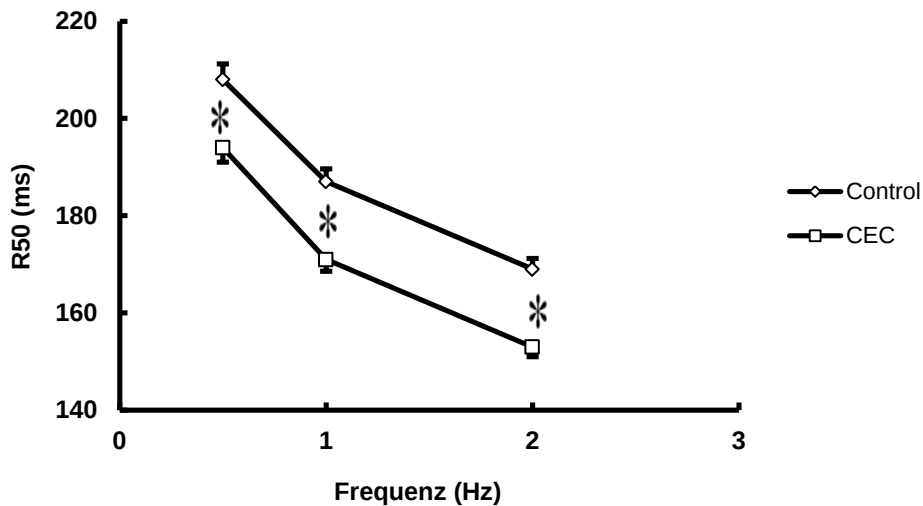


Abb. 4.3.1-7 Einfluss von CEC auf die R50 bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der maximalen Zellkontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

4.3.2 Kontraktionsverhalten von BIM-5 bei unterschiedlichen Frequenzen

In dieser Messreihe wird die zu behandelnde Kulturschale mit BIM-5 versetzt, aus der Literatur ist zu entnehmen, dass es sich bei BIM-5 um einen hERG-Channel-Inhibitor handelt (D. Thomas et al., 2004). In der Konzentration von 5 μM wird dieser Inhibitor nun erneut 2 Minuten vor Messbeginn auf die Kulturschale gegeben, mit den bekannten Frequenzen stimuliert und der unbehandelten Gruppe verglichen.

Der Vergleich zeigt ein ähnliches Verhalten, wie in der Versuchsreihe mit dem PKC-Inhibitor CEC zu beobachten ist. Es kommt zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktilität, die mit zunehmender Frequenz noch weiter abnimmt. Auch in diesem Fall fällt die Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 4.3.2-4) bei 0,5 Hz im Gegensatz zu den anderen Messungen nicht ab und die TTP50 (Abb. 4.3.2-6), sowie die R50 (Abb. 4.3.2-7) präsentieren sich erneut im Rahmen ihrer Messung mit einer Zeitreduktion.

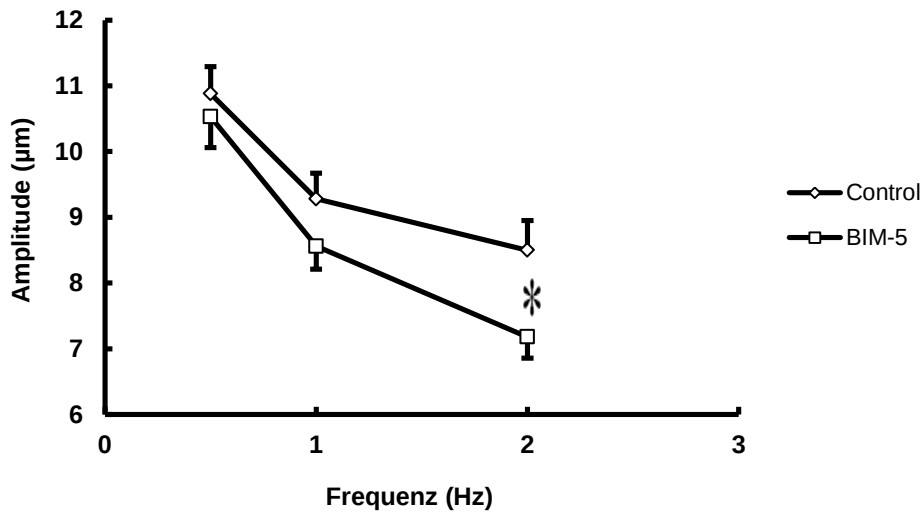


Abb. 4.3.2-1 Einfluss von BIM-5 auf die systolische Zelllänge bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als minimale systolische Zelllänge in μm . ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

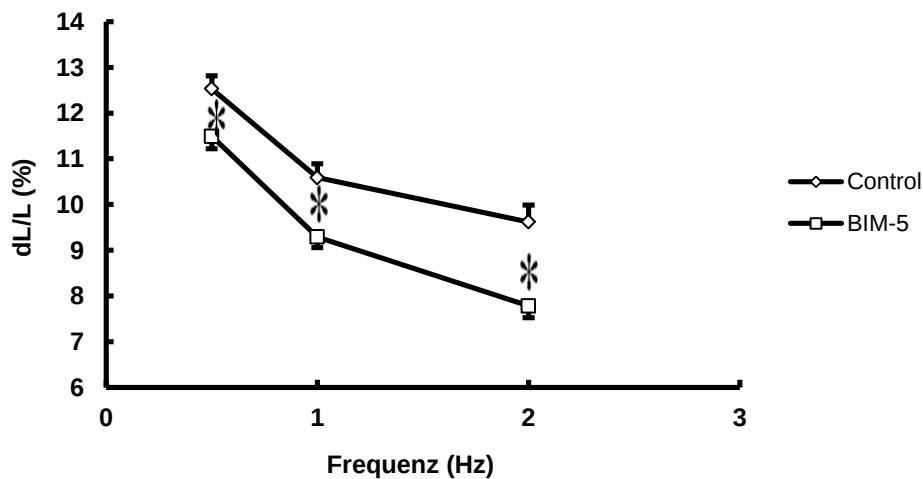


Abb. 4.3.2-2 Einfluss von BIM-5 auf die relative Zellverkürzung bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

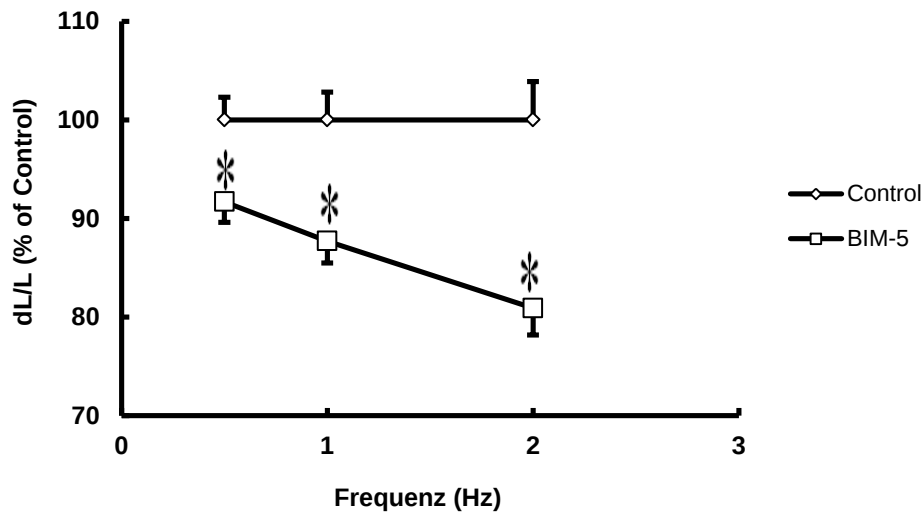


Abb. 4.3.2-3 Einfluss von BIM-5 auf die relative Zellverkürzung in prozentualer Angabe zur Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

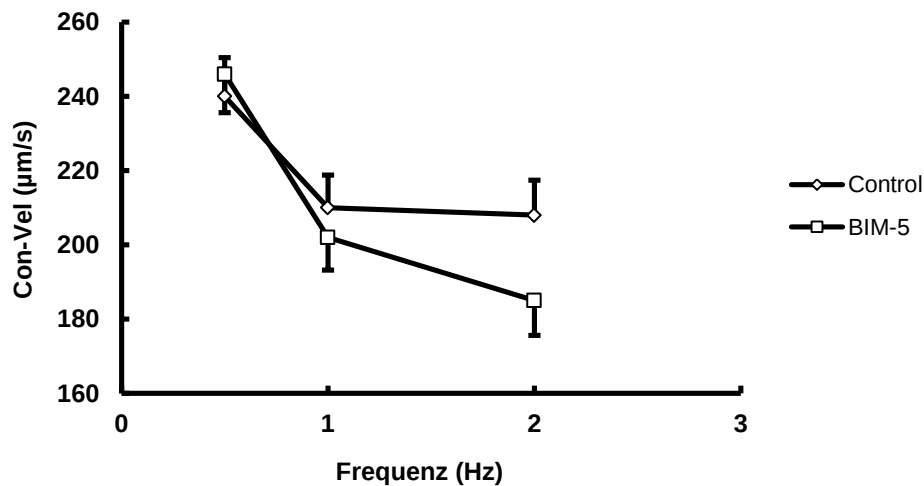


Abb. 4.3.2-4 Einfluss von BIM-5 auf die maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve, $n=36$.

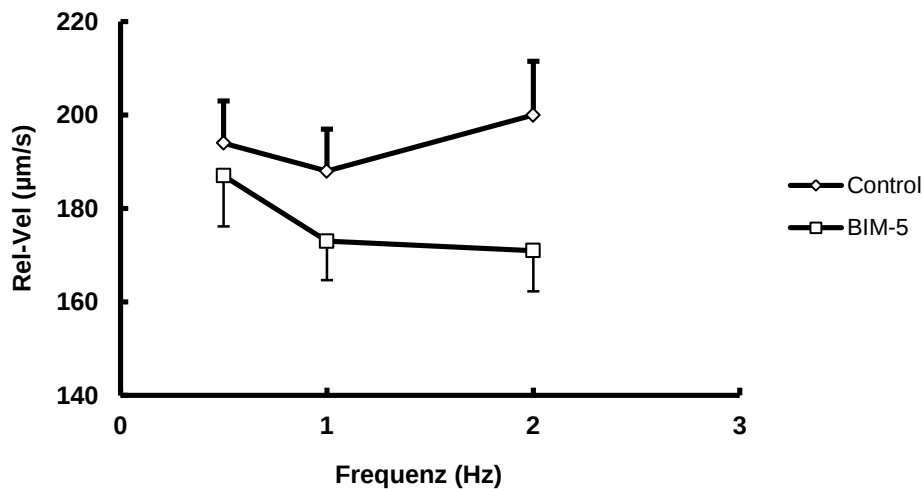


Abb. 4.3.2-5 Einfluss von BIM-5 auf die maximalen Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Relaxationskurve, n=36.

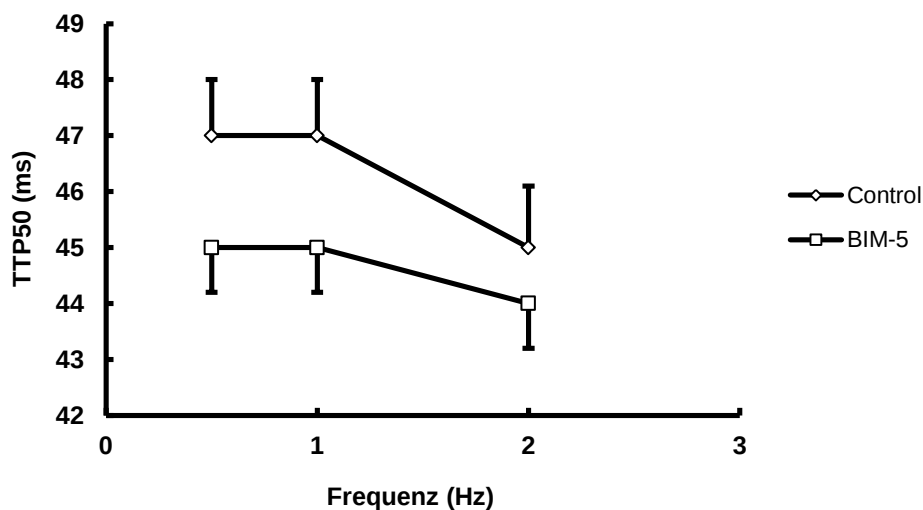


Abb. 4.3.2-6 Einfluss von BIM-5 auf die TPP50 bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion, n=36.

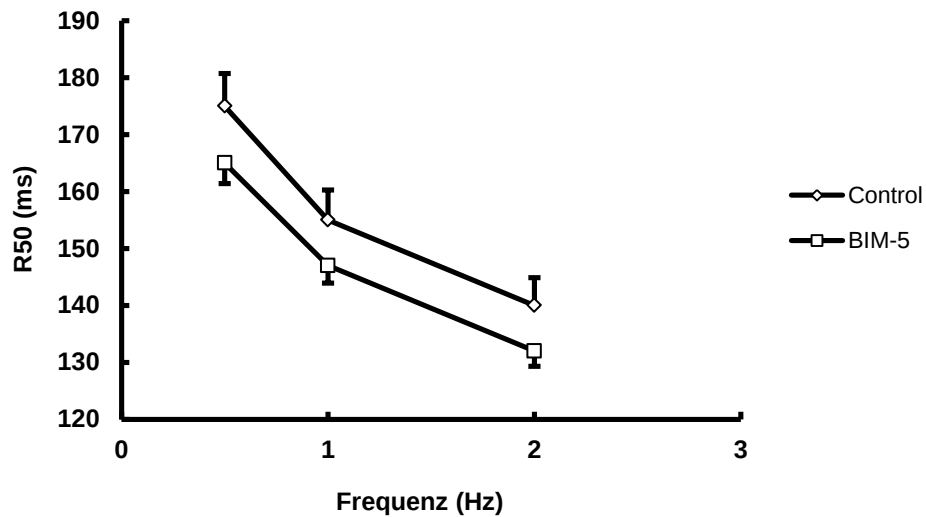


Abb. 4.3.2-7 Einfluss von BIM-5 auf die R50 bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der maximalen Zellkontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke, n=36.

4.3.3 Frequenzabhängiges Kontraktionsverhalten bei Kombination von CEC und BIM-5

Da nun schon CEC und BIM-5 in ihren Effekten einzeln mit den unbehandelten Kulturen verglichen wurden, stand als nächstes die Kombination des PKC-Inhibitors CEC und dem hERG-Channel-Inhibitor BIM-5 mit der Kontrollgruppe an. Auch hier kommt es zu einer frequenzabhängigen signifikanten Abnahme der Kontraktilität, die sich allerdings im Fall der TTP50 (Abb. 4.3.3-6) als unabhängig von der Frequenz darstellt.

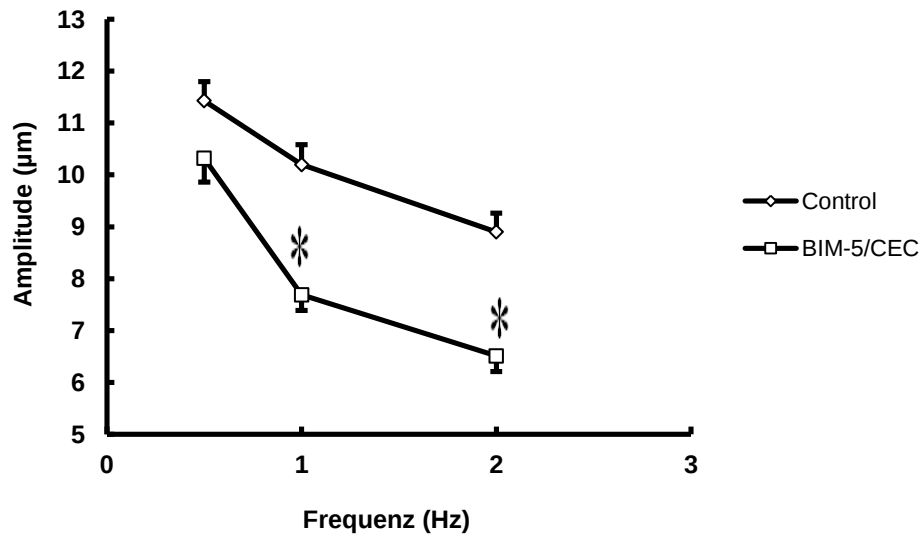


Abb. 4.3.3-1 Einfluss von CEC und BIM-5 auf die systolische Zelllänge bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als minimale systolische Zelllänge in µm. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

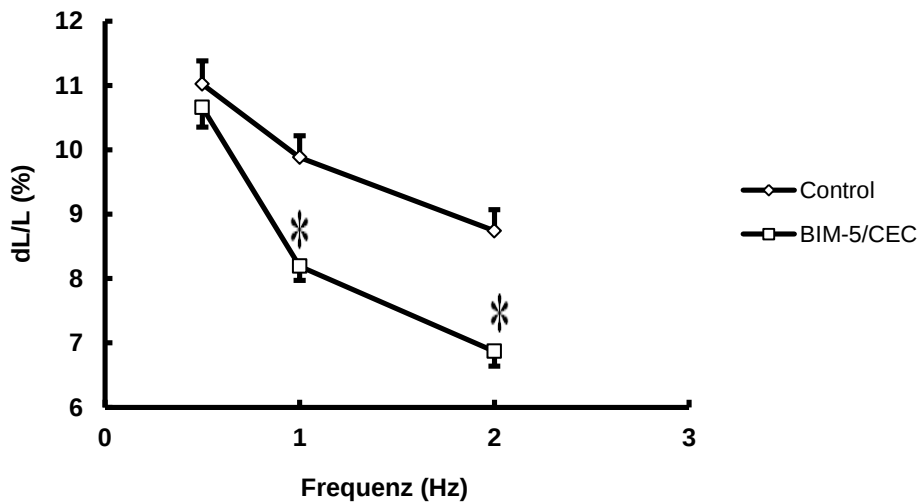


Abb. 4.3.3-2 Einfluss von CEC und BIM-5 auf die relative Zellverkürzung bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

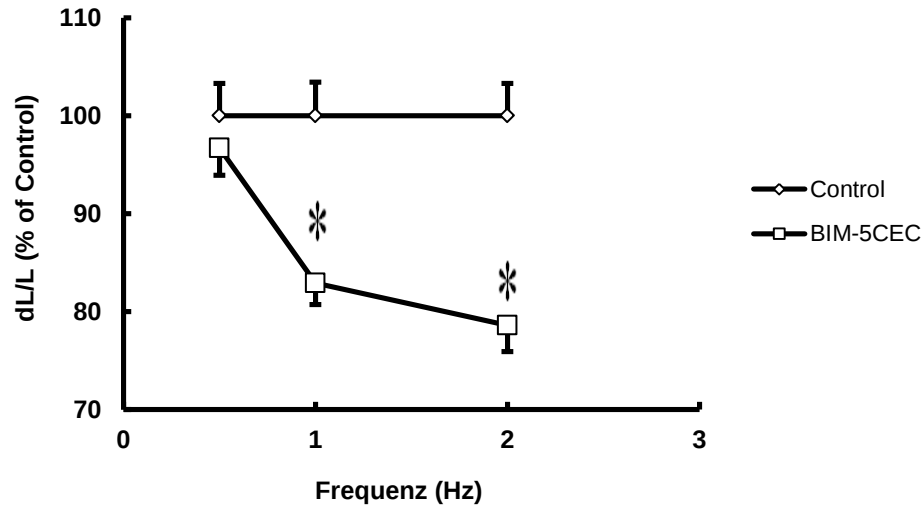


Abb. 4.3.3-3 Einfluss von CEC und BIM-5 auf die relative Zellverkürzung in prozentualer Angabe zur Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

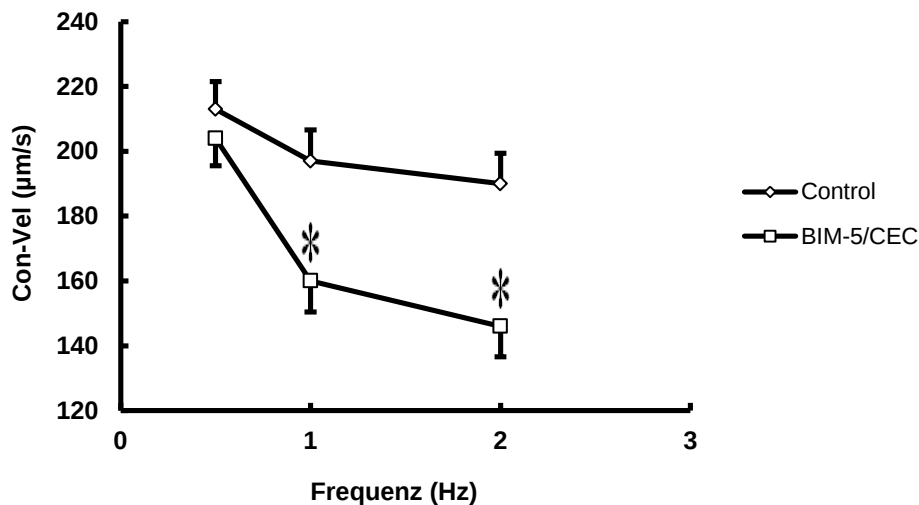


Abb. 4.3.3-4 Einfluss von CEC und BIM-5 auf die maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

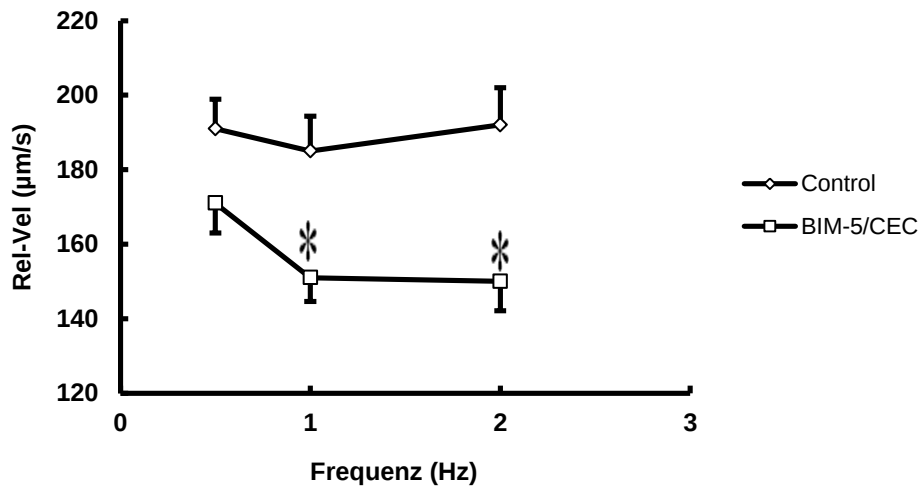


Abb. 4.3.3-5 Einfluss von CEC und BIM-5 auf die maximalen Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, bestimmt aus der ersten Ableitung der Relaxationskurve. ANOVA:

*= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

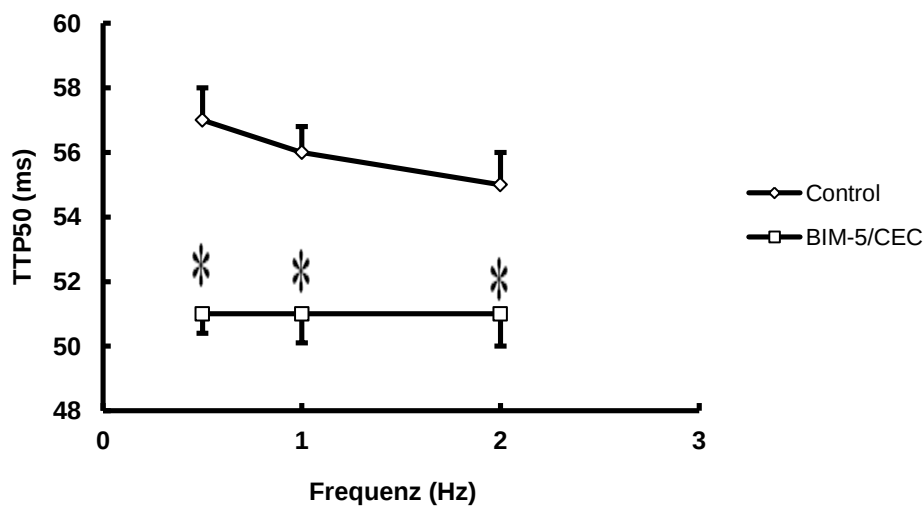


Abb. 4.3.3-6 Einfluss von CEC und BIM-5 auf die TPP50 bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

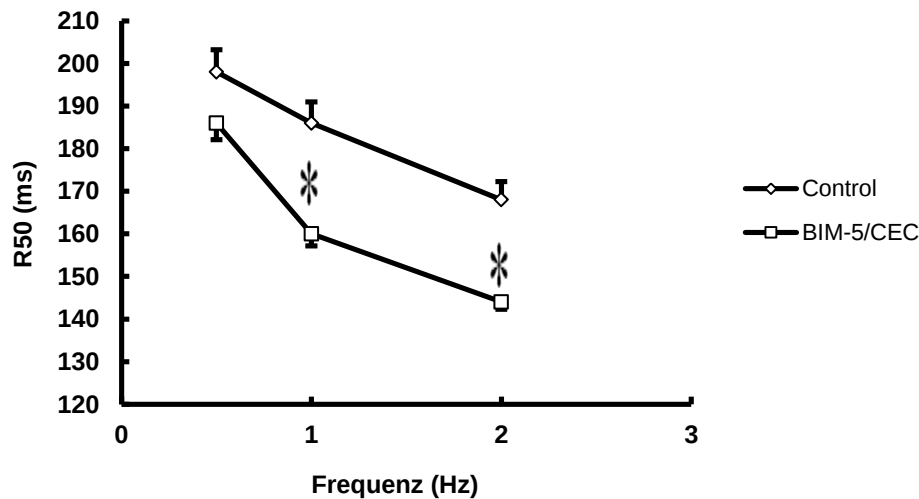


Abb. 4.3.3-7 Einfluss von CEC und BIM-5 auf die R50 bei unterschiedlichen Frequenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Zeit von der maximalen Zellkontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als 0 nM), $n=36$.

4.4 Einfluss verschiedener Substanzen auf die linksventrikuläre Funktion der Rattenherzen im Langendorff-Modell

Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, werden in einem Langendorff-Modell die isolierten Rattenherzen nach dem Ischämie-Reperfusionsprotokoll behandelt. Der unbehandelten Vergleichsgruppe werden die mit BIM-1, BIM-5 und CEC behandelten Herzen gegenübergestellt und der linksventrikuläre Druck (LVDP), linksventrikulär enddiastolische Druck (LVEDP), sowie der Aortendruck (PP) gemessen und in Prozent zur Kontrollgruppe angegeben. Die Testsubstanzen wurden nach 45 Minuten mit Beginn der Post-Ischämiephase über zehn Minuten verabreicht.

4.4.1 LVDP im Ischämie-Reperfusionsversuch

In dieser Versuchsreihe wurden die Substanzen BIM-1, CEC, BIM-5 und die Kombination von BIM-5 und CEC mit der Kontrollgruppe im Ischämie-Reperfusionsmodell verglichen.

Die Abb. 4.4.1-1 zeigt im Fall von BIM-1 in den ersten 15 Minuten der Reperfusion einen signifikanten Anstieg des linksventrikulären Drucks, der jedoch im weiteren Verlauf wieder abnimmt und nach 120 Minuten nur geringfügig über dem Druck der Kontrollgruppe liegt.

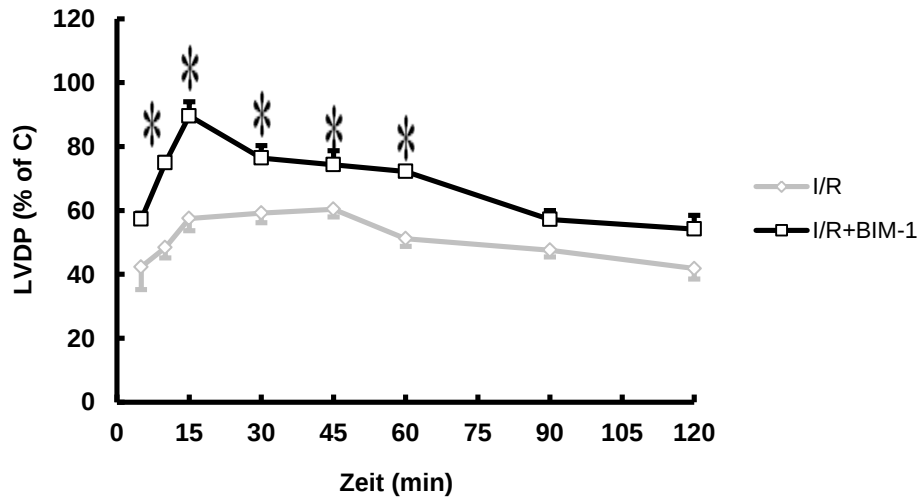


Abb. 4.4.1-1 Einfluss von BIM-1 auf den LVDP (% of C)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks während der Reperfusion in % des präischämischen Ausgangswertes. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

Betrachtet man nun die Wirkung von CEC (Abb. 4.4.1-2) auf die Reperfusion, steigt der LVDP signifikant über den der Kontrollgruppe und hält sich weitgehend konstant bei Werten über 80%.

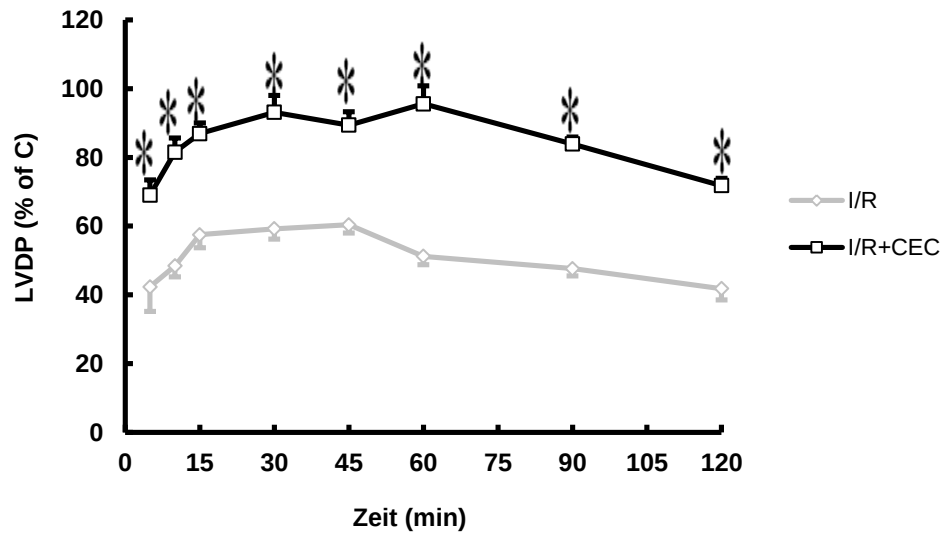


Abb. 4.4.1-2 Einfluss von CEC auf den LVDP (% of C)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks während der Reperfusion in % des präischämischen Ausgangswertes. ANOVA: $\ast = p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

Nach anfänglich kaum veränderten Druckwerten bei BIM-5 (Abb. 4.4.1-3) behandelten Herzen, steigt der Druck im Verlauf der Reperfusion langsam an und erreicht dann Werte um die 80%.

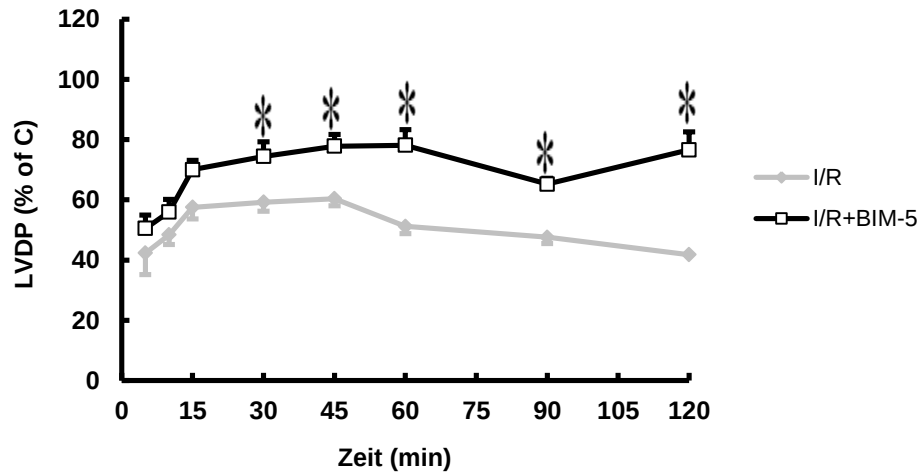


Abb. 4.4.1-3 Einfluss von BIM-5 auf den LVDP (% of C)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks während der Reperfusion in % des präischämischen Ausgangswertes. ANOVA: $\ast = p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

In Abb. 4.4.1-4 ist zu erkennen, dass sich die Kombination der beiden Inhibitoren BIM-5 und CEC mit signifikant konstanten Werten um die 80% während der Reperfusion hält.

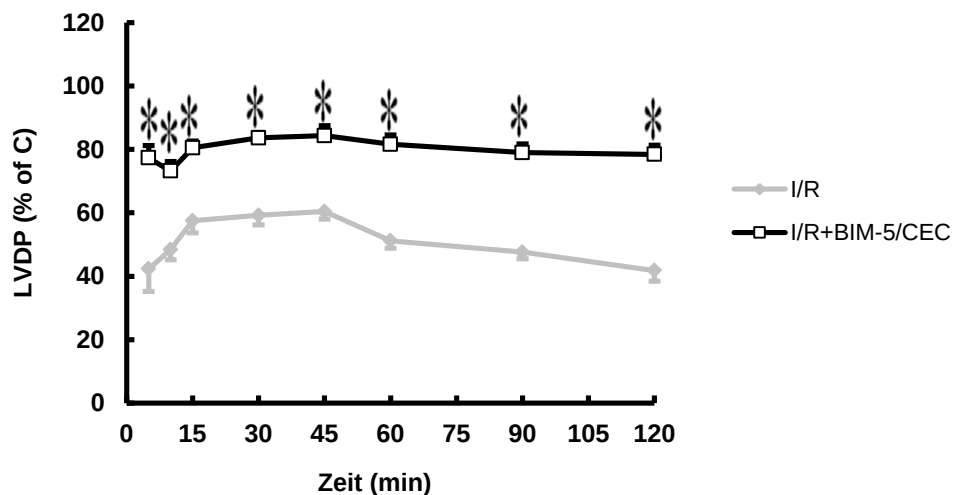


Abb. 4.4.1-4 Einfluss von BIM-5 und CEC auf den LVDP (% of C)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks während der Reperfusion in % des präischämischen Ausgangswertes. ANOVA: $\ast = p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

4.4.2 LVeDP im Ischämie-Reperfusionsversuch

Betrachtet man nun den linksventrikulär enddiastolischen Druck während der Reperfusion, zeigt sich in der Abb. 4.4.2-1 unter Verwendung des Inhibitors BIM-1, welche von einem höheren Druckniveau als den unbehandelten Zellen ausgeht, eine steile Abnahme des enddiastolischen Drucks in den ersten 30 Minuten, um anschließend wieder langsam über die Druckwerte der Kontrollgruppe anzusteigen.

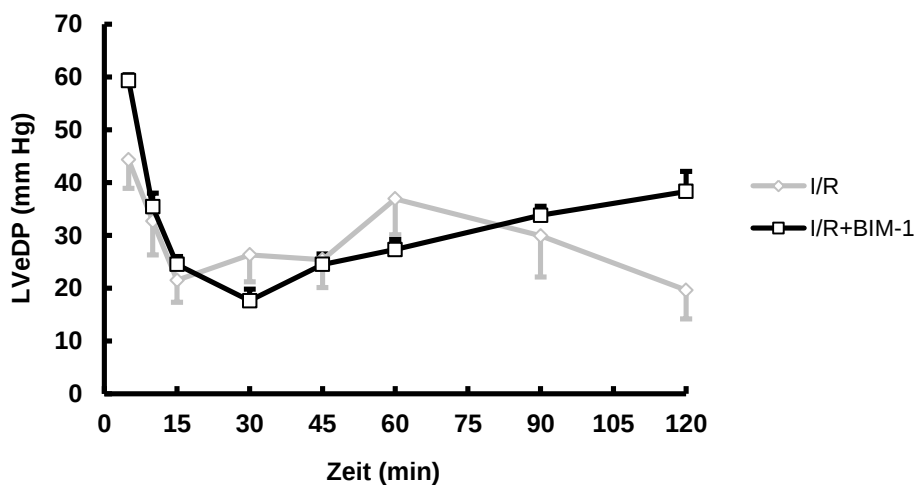


Abb. 4.4.2-1 Einfluss von BIM-1 auf den LVeDP (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks am Ende der Reperfusion. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

Die Wirkung des PKC-Inhibitors CEC in Abb. 4.4.2-2 führt ebenfalls zu einer Abnahme des LVeDP, der im Verlauf erst gegen Ende der Reperfusion nur geringfügig über das Druckniveau der Kontrollgruppe ansteigt, ansonsten aber während der gesamten Zeit unterhalb der Druckwerte lag.

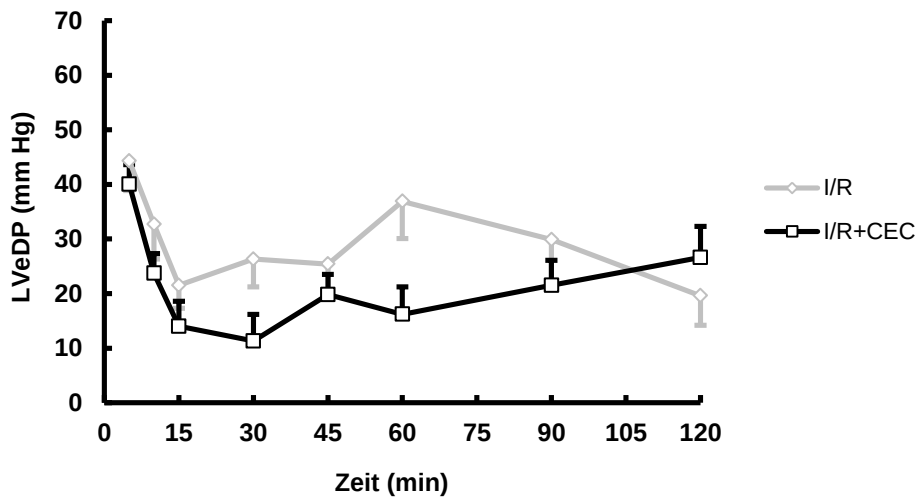


Abb. 4.4.2-2 Einfluss von CEC auf den LVEDP (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks am Ende der Reperfusion. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

Ausgehend von einem höheren Druckniveau als die unbehandelten Rattenherzen entspricht die Druckkurve der mit BIM-5 (Abb. 4.4.2-3) behandelten Zellen weitgehend der Druckkurve der Kontrollgruppe.

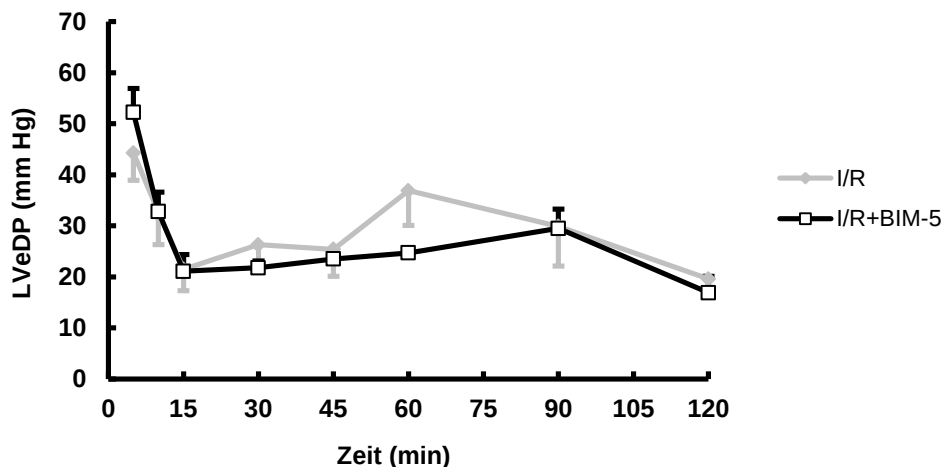


Abb. 4.4.2-3 Einfluss von BIM-5 auf den LVEDP (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks am Ende der Reperfusion. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

Unter dem Einfluss der beiden Substanzen BIM-5 und CEC (Abb. 4.4.2-4) liegt der Verlauf der Druckkurve während der gesamten Reperfusion signifikant unterhalb der Druckwerte der unbehandelten Herzen.

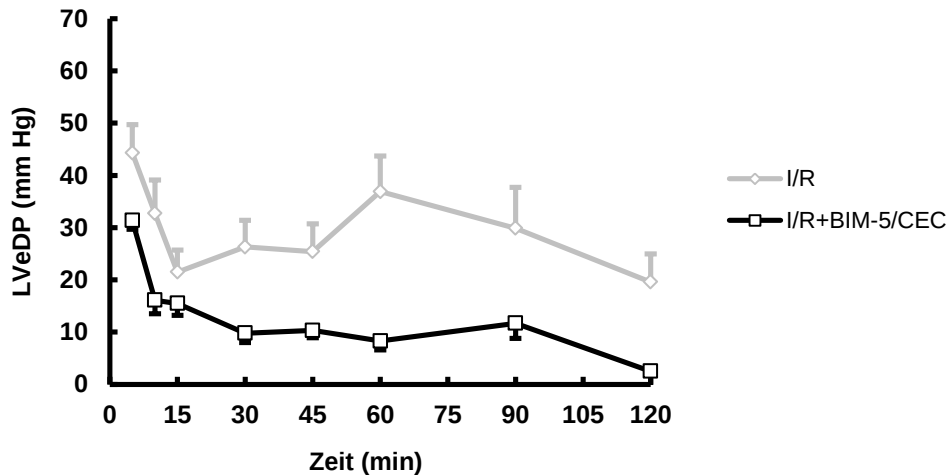


Abb. 4.4.2-4 Einfluss von BIM-5 und CEC auf den LVEDP (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks am Ende der Reperfusion. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

4.4.3 Aortendruck im Ischämie-Reperusionsversuch

Betrachtet man nun im weiteren die Werte des Aortendrucks (PP) während der Reperfusion, lassen sich keine signifikanten Unterschiede der Inhibitoren untereinander feststellen. Während bei der Kontrollgruppe ein sprunghafter Anstieg der Druckwerte um die 45. Minute zu verzeichnen ist, verlaufen die Druckwerte der mit Inhibitoren behandelten Rattenherzen auf einem nahezu konstant langsam ansteigenden Druckniveau unterhalb der Kontrollgruppe, in Abb. 4.4.2-1 ist am Ende sogar ein leichter Aortendruckabfall zu verzeichnen.

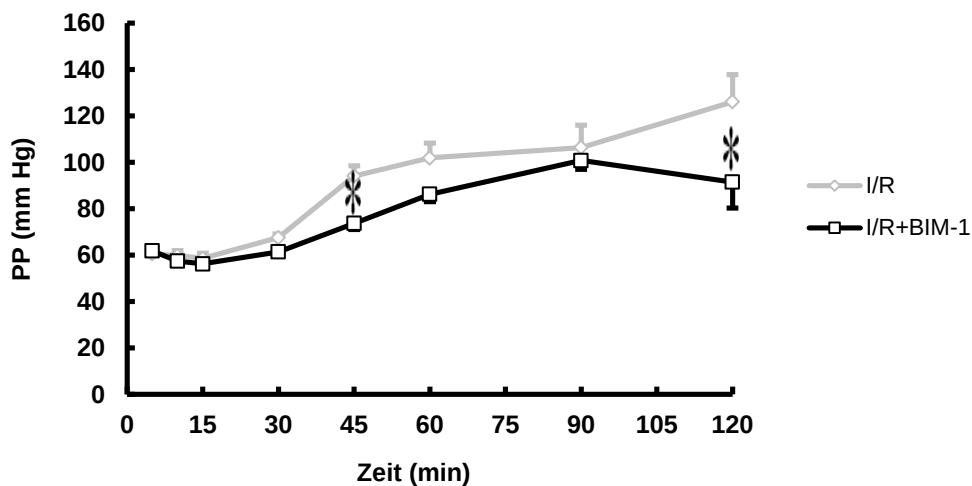


Abb. 4.4.2-1 Einfluss von BIM-1 auf den Aortendruck (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Aortendrucks am Ende der Reperfusion. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

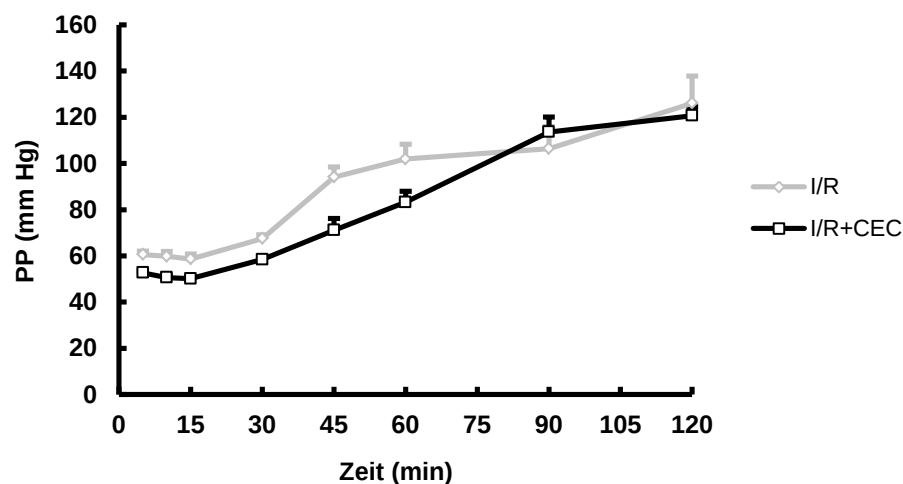


Abb. 4.4.2-1 Einfluss von CEC auf den Aortendruck (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Aortendrucks am Ende der Reperfusion. $n=8$.

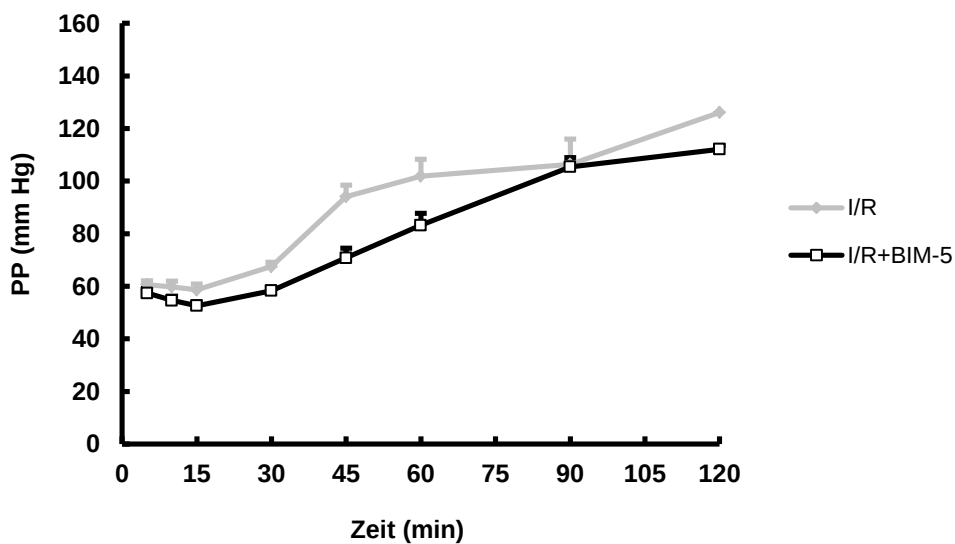


Abb. 4.4.2-1 Einfluss von BIM-5 auf den Aortendruck (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Aortendrucks am Ende der Reperfusion. n=8.

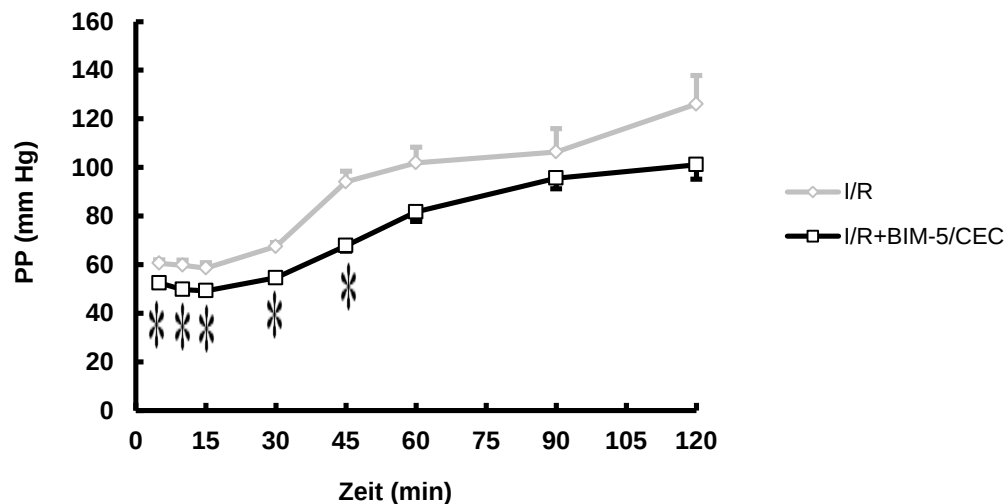


Abb. 4.4.2-1 Einfluss von BIM-5 und CEC auf den Aortendruck (mmHg)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Aortendrucks am Ende der Reperfusion. ANOVA: * $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), n=8.

4.5 Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Herzfunktion

Wie zuvor unter Punkt 3.4 beschrieben, werden die isolierten Rattenherzen im Langendorff-Modell mit den PKC- und hERG-Channel-Inhibitoren BIM-1, BIM-5 und CEC perfundiert und nach dem Versuchsprotokoll des Ischämie- und Reperfusionsversuchs in einem Säulendiagramm aufgetragen. Registriert werden der linksventrikuläre Druck (LVDP), Aortendruck (PP) und die Herzfrequenz-Variabilität der Rattenherzen in den ersten zehn Minuten der Reperfusionsphase im Vergleich zu den am Anfang noch unbehandelten Herzen. Im Anschluss wurde der Proteinverlust aus dem Muskelgewebe im Perfusat mit dem UV-Spektralphotometer als Maß für die Infarktgröße gemessen.

4.5.1 Einfluss auf den linksventrikulär Druck im Ischämie-Reperfusionsversuch

Die Abb. 4.5.1-1 zeigt für BIM-1 eine fast 20%-ige Zunahme des LVDP nach den ersten zehn Minuten der Reperfusion, wohingegen die Druckwerte für BIM-5 und CEC weitgehend gleich bleiben.

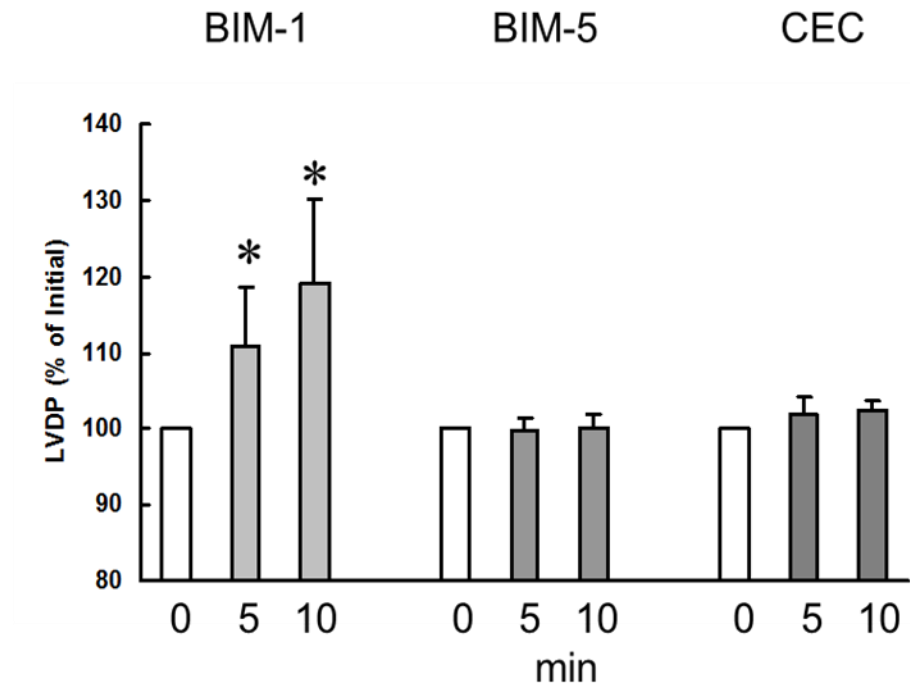


Abb. 4.5.1-1 Vergleich des Einflusses von BIM-1, BIM-5 und CEC auf den LVDP (% of initial)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des linksventrikulären Drucks während des diastolischen Füllungszustandes. ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

4.5.2 Einfluss auf den Aortendruck im Ischämie-Reperfusionsversuch

Entsprechend der Zunahme des LVDP bei BIM-1 findet sich in Abb. 4.5.2-1 eine Abnahme des Aortendrucks im Vergleich zu Beginn des Versuchs um 20 %. Der Aortendruck bei den BIM-5 behandelten Herzen fällt nach 10 Minuten um knapp 10%, wohingegen die CEC behandelten Herzen nach einem intialen Anstieg zurück auf den Ausgangsdruck fallen.

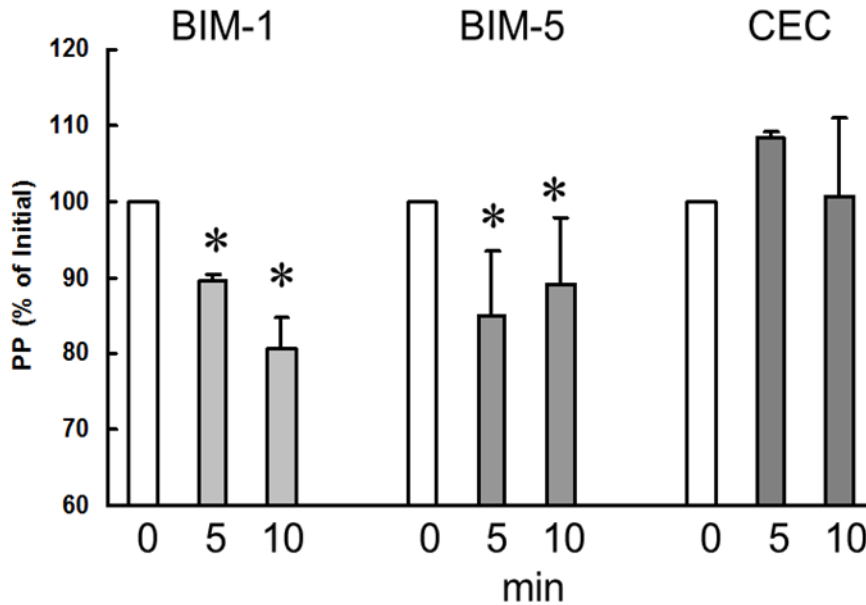


Abb. 4.5.2-1 Vergleich des Einflusses von BIM-1, BIM-5 und CEC auf den Aortendruck (% of initial)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Aortendrucks während der Systole. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

4.5.3 Einfluss auf die Herzfrequenz-Variabilität

Betrachtet man in Abb. 4.5.3-1 die Veränderung der Herzfrequenz von Ischämie und Reperfusion, sind diese im Fall von BIM-1, den unbehandelten Rattenherzen (I/R) gegenüber reduziert, wohningegen CEC und BIM-5 mit einer signifikant erhöhten Variabilität aufwarten. Nx steht für unbehandelte Rattenherzen, die nicht in den Ischämie- und Reperfusionsversuch integriert waren und somit als Kontrollgruppe den Ausgangszustand darstellen.

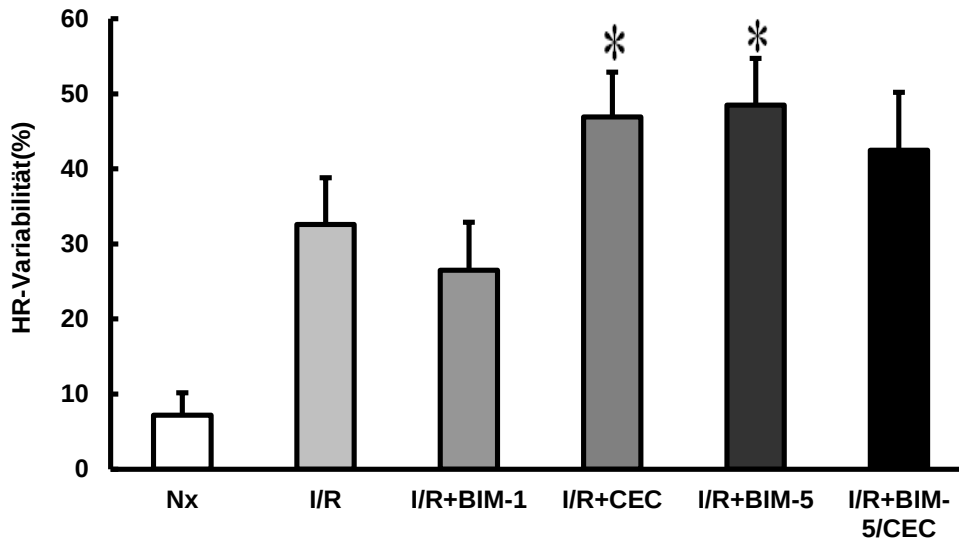


Abb. 4.5.3-1 Vergleich des Einflusses von BIM-1, BIM-5 und CEC auf die Herzfrequenz (%)

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Herzfrequenz-Variabilität während der Ischämie- und Reperfusionphase. ANOVA: $*=p<0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

4.5.4 Proteingehalt im Perfusat

In der nachstehenden Abb. 4.5.4-1 ist der gemessene Anteil an ausgeschiedenem Gesamtprotein im Perfusat dargestellt. Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte während der ersten 15 Minuten der Reperfusion und stellte die Gesamtfreisetzung dar.

Dieser Verlust an Protein präsentiert sich im Fall von BIM-1, neben BIM-5, mit der niedrigsten Rate. CEC und BIM-5/CEC zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Herzen keinen signifikanten Unterschied.

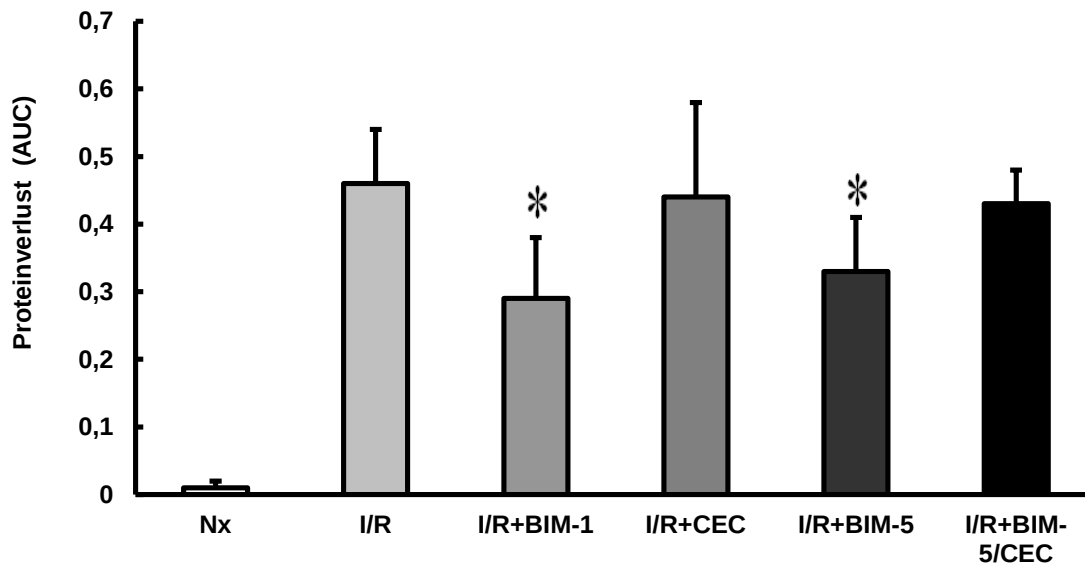


Abb. 4.5.4-1 Vergleich des Einflusses von BIM-1, BIM-5 und CEC auf den Proteinverlust

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung für den Proteingehalt im Perfusat während der Ischämie- und Reperfusionphase. ANOVA: $\ast = p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

4.5.5 Einfluss auf das Herzgewicht

In der Abb. 4.5.5-1 werden Herzgewicht und Körpergewicht in Bezug gesetzt und ergeben für die verschiedenen Rattenherzen in Abhängigkeit von ihrem perfundierten Inhibitor einen Quotienten. Bezogen auf das Körpergewicht stellen somit die Herzen mit BIM-1 und CEC perfundiert, die kleinsten Herzen dar. Diese Bestimmung erlaubt die Abschätzung des Grades der Ödematisierung.

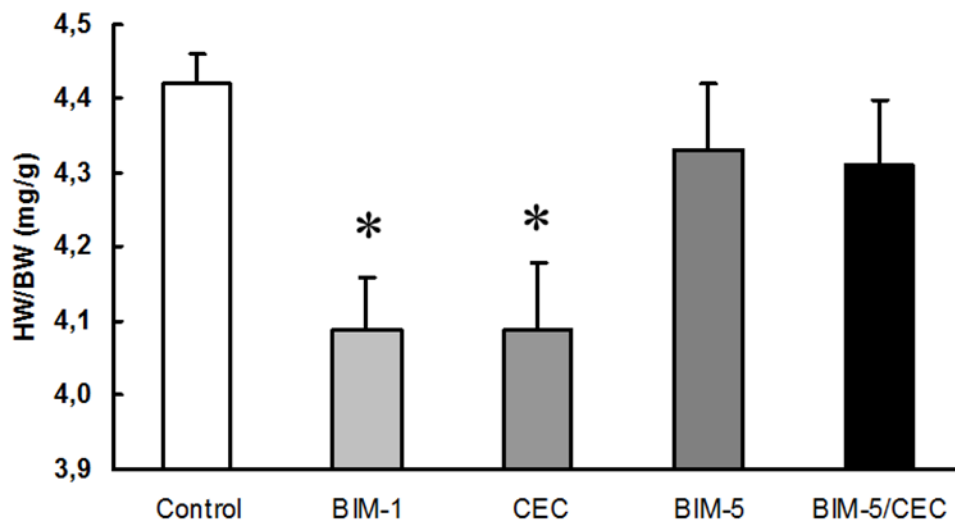


Abb. 4.5.5-1 Vergleich des Einflusses von BIM-1, BIM-5 und CEC auf das Herzgewicht

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht nach dem Ischämie- und Reperfusionversuch. ANOVA: *=p<0,05 vs Kontrolle (Angabe als I/R), n=8.

4.6 Auswirkung der Substanzen auf die Expression verschiedener humoraler Faktoren

In dieser Versuchsreihe wurden mittels real-time PCR, die mit den Inhibitoren BIM-1, BIM-5 und CEC perfundierten Herzen im Ischämie und Reperusionsversuch auf die Expression der Gene ANP (Atriales natriuretisches Peptid), BNP (B-type natriuretic Peptide), SERCA (Sarcoplasmatic/endoplasmatic reticulum calcium ATPase) und NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Austauscher) untersucht. Diese Bestimmung erlaubt ein Abschätzen der Auswirkung auf das frühe Remodelling der Herzen.

Die Expression von ANP in Abb. 4.6-1 ist im Fall von BIM-5 3,7-fach im Vergleich zu den unbehandelten Rattenherzen erhöht, BIM-5/CEC kommen auf den 2,9-fachen Wert. Betrachtet man nun BNP (Abb. 4.6-2) kommt es in allen Fällen zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression.

In der Abb. 4.6-3 verhält sich die Expression von SERCA anders, hierbei kommt es nur im Fall des Inhibitors CEC zu einer Erhöhung um den 1,5-fachen Wert, wohingegen sich die anderen Inhibitoren sogar mit einer reduzierten Expression präsentieren.

Eine signifikant erhöhte Expression bei CEC findet sich auch in Abb. 4.6-4 für NCX, hier kommt es sogar zu einem 10,3-fachen Anstieg, die Erhöhung für die Substanzen BIM-1, Bim-5 und BIM-5/CEC bewegt sich dabei im 2,1- bis 2,6-fachen Bereich.

Zum Schluss wurde noch der Quotient aus den Genen SERCA und NCX gebildet, der in Abb. 4.6-5 zu betrachten ist. Dieser ist im Fall von CEC sehr klein und auch für die anderen Substanzen zeigt sich die erhöhte Expression von NCX.

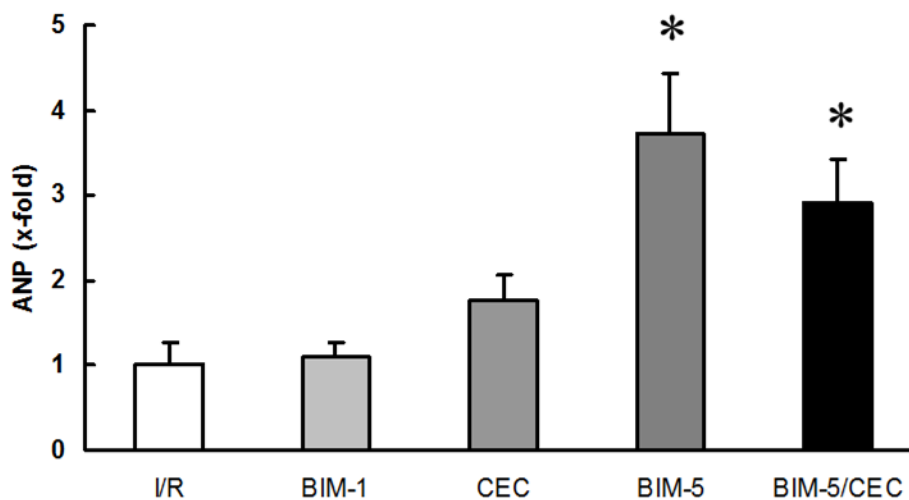


Abb. 4.6-1 ANP-Expression perfundierter Herzen unter Verwendung verschiedener Inhibitoren

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der ANP-Expression als Mehrfachangabe zur Kontrollgruppe (Wert=1). ANOVA: *= $p < 0,05$ vs Kontrolle (Angabe als I/R), $n=8$.

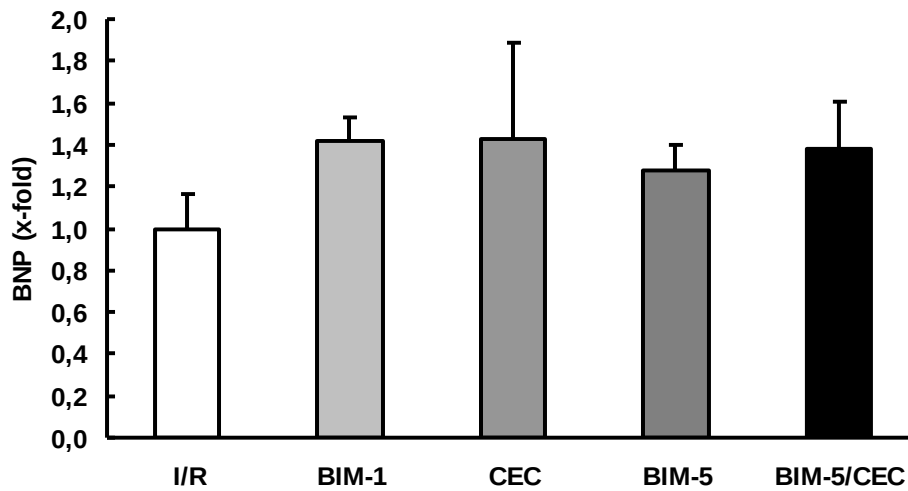


Abb. 4.6-2 BNP-Expression perfundierter Herzen unter Verwendung verschiedener Inhibitoren

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der BNP-Expression als Mehrfachangabe zur Kontrollgruppe (Wert=1), n=8.

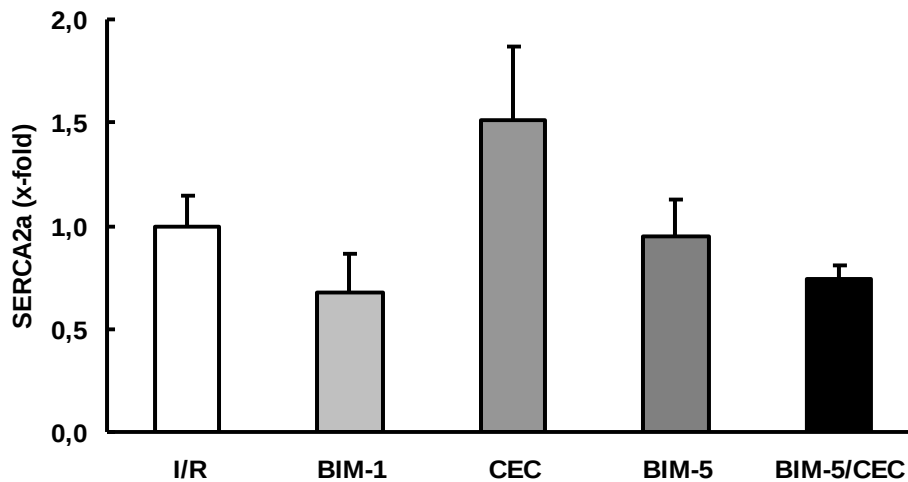


Abb. 4.6-3 SERCA2a-Expression perfundierter Herzen unter Verwendung verschiedener Inhibitoren

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der SERCA2a-Expression als Mehrfachangabe zur Kontrollgruppe (Wert=1), n=8.

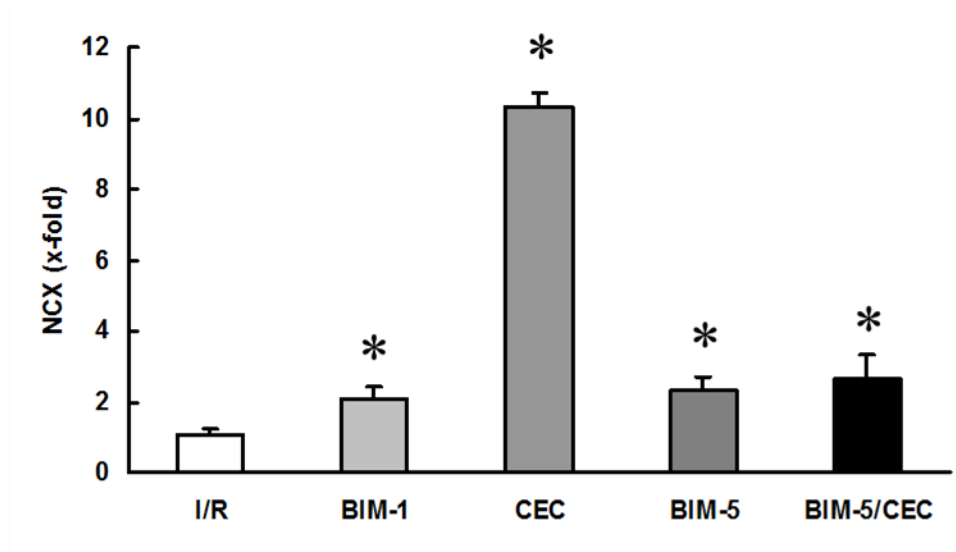


Abb. 4.6-4 NCX-Expression perfundierter Herzen unter Verwendung verschiedener Inhibitoren

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der NCX-Expression als Mehrfachangabe zur Kontrollgruppe (Wert=1). ANOVA: *=p<0,05 vs Kontrolle (Angabe als I/R), n=8.

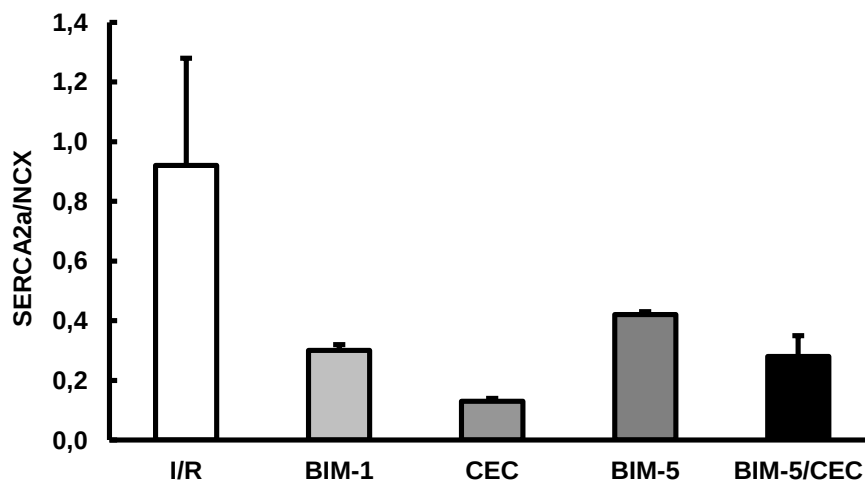


Abb. 4.6-5 Bildung des Quotienten aus SERCA2a- und NCX-Expression perfundierter Herzen unter Verwendung verschiedener Inhibitoren

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Quotienten aus der SERCA2a- und NCX-Expression, n=8.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Auswirkung des Inhibitors Bisindolylmaleimid-1 (BIM-1) als PKC- und hERG-Kanal-Inhibitor im Vergleich zum selektiven PKC-Inhibitor Chelerythrin (CEC) und selektiven hERG-Kanal-Inhibitor Bisindolylmaleimid-5 (BIM-5) auf die Kontraktionsfähigkeit des Herzens zu ermitteln. Hierzu wurden zum Einen isolierte Kardiomyozyten und deren Akuteffekte beobachtet, zum Anderen erfolgten dynamische Messungen am schlagenden Herzen im Langendorff-Modell.

Um Rückschlüsse auf die Signaltransduktionswege zu erhalten, wurden mittels isolierter ventrikulärer Herzmuskelzellen im Zellkulturmodell die hämodynamischen und systemischen Interaktionen ausgeschaltet und definierte Wirkstoffkonzentrationen hinzugegeben.

Im Langendorff-Modell wurden diese Effekte am schlagenden Herzen untersucht um anschließend die Kardiomyozyten soweit aufzubereiten, um wiederum mit Hilfe der real-time PCR das Expressionverhalten verschiedener humoral wirksamer Faktoren zu erhalten.

5.1 Bisindolylmaleimid-1 und seine Wirkung auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten

Bei Bisindolylmaleimiden handelt es sich um Substanzen, die sich derweil noch in der Phase III der klinischen Erprobung bei der Behandlung von Tumoren befinden, da sie hemmende oder apoptotische Wirkung auf verschiedene Krebszelllinien haben (Wang H et al., 2002). Ihre Wirkung erzielen die Bisindolylmaleimide zum Teil über die Hemmung der Proteinkinase C, sowie im Fall von BIM-1 über die Blockade der hERG-Kanäle (D. Thomas et al., 2004). Dieser Mechanismus besitzt auch eine entscheidende Bedeutung bei der Beeinflussung der Ionenkanäle am Herzen. So erzeugt BIM-1 eine konzentrationsabhängige Blockade der genannten hERG-Kanäle, welche wiederum eine herausragende Rolle bei der Regeneration des Herzens spielen (D. Thomas et al.,

2004). Diese Effekte sollten im weiteren an isolierten Kardiomyozyten und am schlagenden Herzen untersucht werden.

Die Ergebnisse der Studie zeigen eine zunehmende Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten bei zunehmenden Konzentrationen von BIM-1. Dafür wurden die isolierten Herzzellen der Wistar Ratten mit BIM-1 Konzentrationen von 5nM – 5µM inkubiert und anschließend mit Frequenzen von 0,5 – 2 Hz stimuliert. Dabei konnten mit steigenden Konzentrationen signifikante Zellverkürzungen beobachtet werden. Desweiteren wurde eine frequenzabhängig Zellverkürzung gefunden. Bei niedrigen Frequenzen von 0,5 Hz wurden signifikant stärkere Zellverkürzungen beobachtet als dies der Fall bei den nahezu physiologischen Frequenzen von 2 Hz war.

Um das Kontraktionsverhalten des PKC- und hERG-Kanal-Inhibitors beurteilen zu können, wurde BIM-1 in einer weiteren Versuchsreihe mit dem synthetisch racemischen Noradrenalin-Derivat Isoprenalin verglichen, das als Betasympathomimetikum eine starke Affinität zu Beta-Rezeptoren aufweist. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant stärker ausgeprägte Zellverkürzung für BIM-1 im Vergleich zu Isoprenalin bei Frequenzen von 0,5 Hz.

Da bisher nur die Wirkungen an isolierten Herzzellen beobachtet wurde, wurden die Effekte auch am schlagenden Herz im Langendorff-Modell untersucht. Dort zeigte sich bei der Messung des linksventrikulären Drucks ein transienter Anstieg in den ersten 15 Minuten der mit BIM-1 perfundierten Herzen. Dieser initiale Anstieg konnte nicht aufrecht erhalten werden. Eine Erklärung könnte die Überlegung liefern, dass überlebende Myozyten nach der Ischämie durch BIM-1 zu stärkeren Kontraktionen stimuliert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit dem aus anderen Studien beobachteten Mechanismus der hERG-Blockade überein, bei dem es bei Hemmung des Auswärtsstroms aus den Kaliumkanälen nicht zu einer dauerhaften Verbesserung der Pumpfunktion kommt (D. Thomas et al., 2004). Die transiente Funktionsverbesserung lässt sich durch die Verlängerung der Aktionspotentialdauer und den dadurch verstärkten Calcium-Einstrom gut erklären.

5.2 Auswirkungen von Bisindolylmaleimid-5 auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten

Das Bisindolylmaleimid-5 blockiert im Gegensatz zu BIM-1 nicht die Proteinkinase C, sondern selektiv den hERG-Kanal (D. Thomas et al., 2004). Da dieser Kanal für den Kaliumaustrom während der Repolarisation für die Regeneration des Herzen von großer Bedeutung ist und durch die Blockade des hERG-Kanals der Ionenaustrom verlangsamt wird, resultiert aus der Ladungsverschiebung eine verlängerte Unerregbarkeit der Myokardzellen. Die längere Plateaphase erlaubt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (D. Thomas et al., 2004).

Ursprünglich bestand das Konzept der hERG-Kanalhemmung darin, durch Verlängerung der Aktionspotentialdauer die Inzidenz von Rhythmusstörungen zu reduzieren. Hier wurde nun an isolierten Herzmuskelzellen die Auswirkung auf die mechanischen Eigenschaften der Zellen untersucht. BIM-5 wurde in der Konzentration von 5 μ M inkubiert und anschließend mit Frequenzen von 0,5 – 2 Hz stimuliert. Beobachtet wurden frequenzabhängige Zellverkürzungen, die bei niedrigen Frequenzen von 0,5 Hz am Stärksten ausgeprägt waren. Jedoch zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Zellverkürzung, sondern eine Abnahme der kontraktile Eigenschaften.

Betrachtete man nun die Effekte am schlagenden Herz in der Langendorff-Apparatur, zeigte sich bei der Messung des linksventrikulären Drucks nach initial geringfügigen Druckverhältnissen, bei den mit BIM-5 perfundierten Herzen, anschließend eine Zunahme der Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten mit Anstieg der LVDP auf ein nahezu konstantes Druckniveau. Auf der Suche nach einer Erklärung für dieses Verhalten, fällt eine in der real-time PCR gemessene verstärkte Expression des ANP der betreffenden Myokardzellen auf. Die in der Literatur beschriebene antihypertrophische Wirkung des ANP (M. Albrecht, 2007) legt die Vermutung nahe, dass ANP durch seine protektive Wirkung auf die Kardiomyozyten im Verlauf dieses Versuchs zu einer Zunahme der Kontraktionsfähigkeit der Zellen führte. Weitergehende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe konnten durch Verwendung neutralisierender Antikörper diese Hypothese inzwischen verifizieren.

5.3 Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten durch die Wirkung von Chelerythrin

Bei dem selektiven Proteinkinase C Inhibitor Chelerythrin handelt es sich um ein benzophenanthridines Alkaloid, das bereits in der Tumorthherapie Anwendung findet. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tumorzellen ihr Wachstum unter anderem über die PKC-Signaltransduktionswege regulieren, um Kontrolle über die Apoptose zu erlangen. Durch CEC in Verbindung mit ionisierender Strahlung stellt sich nun eine weitere Möglichkeit zur Induktion der Apoptose bestimmter strahlenresistenter Tumorarten dar (J. Chmura, 2005). In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde die selektive Inhibierung der PKC zur Betrachtung der einzelnen Signalwege am Herzen genutzt und verglichen mit den Ergebnissen des PKC- und hERG-Kanal-Inhibitors BIM-1, sowie des hERG-Kanal-Inhibitors BIM-5.

Bei der Proteinkinase C handelt es sich um ein Enzym aus der Familie der Proteinkinasen, welches sich mit Calcium zu einem Komplex verbindet, sich der Zellmembran anlegt und darüber das zelluläre Wachstum steuert. Die Aktivität der PKC wird über Hormone und Neurotransmitter geregelt. Es existieren zwölf Isoformen der Proteinkinase C.

Die Betrachtung der Ergebnisse an isolierten Kardiomyozyten zeigt auch hier eine frequenzabhängige Zellverkürzung, die bei niedrigen Frequenzen von 0,5 Hz stärker ausgeprägt war, als bei den physiologischen Frequenzen von 2 Hz. Jedoch kam es auch hier zu einer Abnahme der Kontraktilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Inkubiert wurden die isolierten Myokardzellen von Wistar Ratten mit CEC Konzentrationen von 1 μ M.

Die CEC-Wirkung auf das schlagende Herz im Langedorff-Modell zeigte initial einen Anstieg auf ein hohes linksventrikuläres Druckniveau, um anschließend langsam etwas abzufallen, dieses Niveau lag allerdings immernoch signifikant über dem Niveau der Kontrollgruppe und BIM-1. Die vermehrte Expression von SERCA2a und NCX könnte darauf hindeuten, dass die Blockade der Proteinkinase C, die nur über eine Komplexbildung mit Calcium ihre Funktion ausüben kann, zu einer verstärkten Calciumfreisetzung der Funktionsproteine bestimmter Zellbestandteile führt, um so die

Bindungswahrscheinlichkeit zu erhöhen. In der Folge für die erhöhte Calciumkonzentration kommt es zu einer Kontraktilitätszunahme.

5.4 Auswirkungen von Bisindolylmaleimid-5 und Chelerythrin auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten

Da nun bereits die einzelnen Substanzen und ihre Wirkungen auf isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen, sowie die dynamischen Messungen am schlagenden Herz erfolgten, wurde nun die gemeinsame Wirkung des hERG-Inhibitors BIM-5 und des PKC-Inhibitors CEC untersucht und dem hERG- und PKC-Inhibitor BIM-1 gegenübergestellt.

Wie bereits aus den vorherigen Versuchen bekannt, wurden die isolierten Herzzellen der Wistar Ratten mit BIM-5 und CEC Konzentrationen von 5µM und 1µM inkubiert und anschließend mit den Frequenzen von 0,5 – 2 Hz stimuliert. Hierbei konnte man erneut eine frequenzabhängige Zellverkürzung beobachten, die bei niedrigen Frequenzen von 0,5 Hz stärker ausgeprägt war. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich wieder eine Abnahme der Kontraktilität.

Die Messungen am schlagenden Herz im Langendorff-Modell wiesen, entgegen des zu erwartenden Verhaltens, ein konstant hohes linksventrikuläres Druckniveau auf, dass zu Beginn einen kurzzeitigen Einbruch der LVDP erfuhr, sich jedoch leicht, nicht signifikant über das Ausgangsniveau erhob. Das Ergebnis des linksventrikulär enddiastolischen Drucks weist darauf hin, dass es hier zu keiner akuten Volumenbelastung des Herzen durch eine gute inotrope Funktion des linken Ventrikels kommt. Zwar steigt die Expression von ANP signifikant an, bleibt jedoch unter dem Niveau des zuvor gemessenen ANPs bei BIM-5. Desweiteren kam es zu keinen signifikanten Änderungen der Expression von SERCA2a und NCX. Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte sein, dass es sich bei CEC um eine andere Isoform des PKC-Inhibitors handelt als es bei BIM-1 der Fall ist und es so nur zu geringen additiven Effekten der zuvor beschriebenen Ergebnissen kommt, bei dem ANP eine scheinbar größere Rolle zuteil wird.

5.5 Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich sagen, dass BIM-5, aus der Gruppe der Bisindolylmaleimide durch seine selektive Blockade des spannungsaktivierten Kaliumkanals, dem sogenannten hERG-Kanal signifikant positiv kontraktive Effekte am post-ischämisch schlagenden Herzen der Wistar-Ratte erzielt. Jedoch kam es bei isolierten Kardiomyozyten akut zu einem negativen Kontraktionsverhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die positive Inotropie des Herzens mit einer signifikant gesteigerten Expression des ANPs einherging.

Allerdings konnte für BIM-1, als Inhibitor der PKC und des hERG-Kanals nur ein initialer Anstieg der Kontraktilität gezeigt werden, der jedoch nur einen vorübergehenden Effekt darstellte, da es im weiteren Verlauf wieder zu einer Abnahme des LVDP kam. Dieser initiale Effekt stimmt mit den Ergebnissen isolierter Kardiomyozyten überein, da es hier zu einem positiven konzentrations- und frequenzabhängigen Kontraktionsverhalten kam. Der Abfall der Kontraktilität wirft die Frage auf, ob es sich um die gleiche Isoform des hERG-Kanals handelt und welche Auswirkungen dies auf die Funktionsfähigkeit der Kardiomyozyten hat.

Feststellen lässt sich, dass eine selektive Blockade des hERG-Kanals am post-ischämisch schlagenden Herzen positiv inotrop wirkt. Ursächlich für die günstigen Effekte von BIM-5 scheint die protektive Wirkung des ANPs zu sein. Ob dieser Effekt ausschließlich über die Wirkung von ANP erzielt wird, muss abschließend noch geklärt werden und ist derzeit Gegenstand weiterer Arbeiten. ANP gilt allgemein als druckinduziertes Gen. Man kann postulieren, dass die selektive Hemmung der hERG-Kanäle zu einer stärkeren Calciumbeladung des postischämischen Myokards führt, was wiederum zu einer dehnungsinduzierten Aktivierung der ANP Expression und Freisetzung führt. ANP kann dann durch moderate Steigerung der cGMP Konzentration die Kontraktion verstärken. Ein solcher Mechanismus wurde schon für moderate NO-Bildung postuliert (Kojda, 1996).

6. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurden Versuche an isolierten adulten ventrikulären Herzmuskelzellen von Wistar Ratten durchgeführt, an denen Akuteffekte beobachtet werden konnten. Zu diesem Zweck wurden 2 Minuten vor Messbeginn die Zellen mit den jeweiligen Substanzen inkubiert und lieferten somit anschließend detaillierte Informationen zur Zellverkürzung. Desweiteren wurden auch dynamische Messungen am schlagenden Herzen im Langendorff-Modell durchgeführt, die ebenfalls hierfür verwendeten Herzen von Wistar Tieren wurden über eine Dauer von 45 Minuten nicht perfundiert und anschließend mit der Langendorff-Lösung reperfundiert. Die linksventrikulären Myokardzellen wurden anschließend isoliert und aufbereitet um mit Hilfe der real-time PCR das Expressionsverhalten verschiedener humoraler Faktoren zu betrachten.

In dieser Arbeit konnten interessante Erkenntnisse zu hERG-Kanal-Inhibitoren während der Reperfusionphase gewonnen werden. Trotz seiner bekannten arrhythmogenen Wirkung auf das Myokard zeigte sich beim post-ischämischen Herzen eine Zunahme der Kontraktionsfähigkeit mit einer vermehrten Expression von ANP, dem hier scheinbar eine protektive Wirkung zuzuschreiben ist. Genauere Untersuchung müssen noch folgen. Bei Messungen an isolierten Kardiomyozyten konnten keine positiven kontraktile Effekte beobachtet werden. Positive kontraktile Effekte waren jedoch bei Versuchen mit BIM-1, einem PKC- und hERG-Kanal-Inhibitor zu beobachten. Auch im Langendorff-Modell zeigte sich ein transienter Anstieg der Kontraktionsfähigkeit, dieser positive Effekt war aber nur von kurzer Dauer, der nach dem Auswaschen von BIM-1 reversibel war. Der PKC-Inhibitors CEC zeigte ähnlich wie BIM-5 eine Abnahme der Kontraktilität isolierter Zellen, dafür stellte sich bei der dynamische Messung am schlagenden Herzen ein positiver Effekt mit einem leichten Abfall zum Ende hin ein. Eine interessante Wirkung lieferte auch die Kombinationsgabe des hERG-Kanal-Inhibitors BIM-5 und dem PKC-Inhibitors CEC, die trotz negativ kontraktiler Effekte der isolierten Kardiomyozyten eine konstant positive Kontraktionsfähigkeit des schlagenden Herzens im Langendorff-Modell aufwiesen. Es bleibt noch abschließend zu klären, wie die Wirkung des hERG-

Kanal-Inhibitors mit der vermehrten Expression von ANP zusammenhängt und ob die gewonnenen Erkenntnisse durch ANP vermittelt werden.

7. Summary

In this work experiments on isolated adult ventricular cardiac muscle cells from Wistar rats were performed in which acute effects were observed. For these purposes, two minutes before the measurement, the cells were incubated with the respective substances, and thus subsequently provided detailed information on cell shortening. Furthermore, dynamic measurements were also performed on the beating heart in the Langendorff model, which were also using hearts from Wistar animals over a period of 45 minutes not perfused and subsequently reperfused with the Langendorff solution. After that the left ventricular myocardial cells were isolated and prepared to consider using the real-time PCR, the expression characteristics of various humoral factors. In this work, interesting insights to hERG channel inhibitors during reperfusion are obtained. Despite its known arrhythmogenic effect on the myocardium, an increase in contractility with increased expression of ANP was found in post-ischemic heart, which here is apparently due to a protective effect. More detailed investigation must follow. No positive contractile effects were observed on isolated cardiomyocytes. Positive contractile effects were shown in experiments with BIM-1, which is a PKC- and hERG channel inhibitor. These were limited only to the isolated cells. Although, in the Langendorff model was found a transient increase in contractility, but this positive effect was short-lived and lost during the subsequent washout of the drug. The PKC inhibitor CEC was similar to BIM-5, a decrease in the contractility of isolated cells, but placed in the dynamic measurement on the beating heart, a positive effect with a slight decrease towards the end was seen. An interesting effect also supplied the combination of the hERG channel inhibitor BIM-5 and the PKC inhibitor CEC, which showed, despite a negative contractile effects of the isolated cardiomyocytes a positive constant contractility of the beating heart in the Langendorff model. Finally it still remains to clarify, how the effect of the hERG channel inhibitor is mediated with the increased expression of ANP and whether the findings obtained by ANP.

8. Literaturverzeichnis

Abbott, G. W.; Sesti, F.; Splawski, I.; Buck, M. E.; Lehmann, M. H.; Timothy, K. W. et al. (1999): MiRP1 Forms IKr Potassium Channels with HERG and Is Associated with Cardiac Arrhythmia. In: Cell, H. 97, S. 175–187.

Albrecht, M. (2007): Untersuchung von Expression und Regulation der kardialen neutralen Endopeptidase an drei Modellen der experimentellen Herzinsuffizienz.

Barry, D. J. M.; Nerbonne, M. (1996): Myocardial potassium channels: Electrophysiological and molecular diversity. In: Annual Review of Physiology, H. 58, S. 363–394.

Bauer, C. B.; Engeland, I.; Wulfsen, J.; Ludwig, O.; Pongs, J. R.; Schwarz, K. (1998): RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells. In: Receptors Channels, H. 6, S. 19–29.

Bauer, C. J. R.; Schwarz, K. (2001): Physiology of EAG K⁺ channels. In: J.Membr.Biol., H. 182, S. 1–15.

Bertrand, J. (2007): Pathomechanismen von HERG-Ionenkanal-Mutationen als Ursache von menschlichen Repolarisationsstörungen. Dissertation. Osnabrück. Universität Osnabrück, Leibnitz Institut für Arterioskleroseforschung, Department Molekulare Kardiologie.

Bundesärztekammer; Kassenärztliche Bundesvereinigung; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (Hg.) (2008): Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK. Online verfügbar unter <http://www.khk.versorgungsleitlinien.de>, zuletzt geprüft am 16.09.2010.

Chen, J.; Zou, A. Splawski I.; Keating, M. T.; Sanguinetti, M. C. (1999): Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. In: J.Biol.Chem., H. 274, S. 10113–10118.

Chmura, J.; Kufe, W.; Weichselbaum, R.; Quintans, J. (2005): Verwendung von Chelerythrin und Strahlung in der Tumorthherapie. Dana-Farber Cancer Institute, Inc., Boston, Mass., US. Online verfügbar unter <http://www.patent->

de.com/20050609/DE69824165T2.html, zuletzt geprüft am 16.09.2010.

Choe, C. U.; Schulze-Bahr, E.; Neu, A.; Xu, J.; Zhu, Z. I.; Sauter, K. et al. (2006): C-terminal HERG (LQT2) mutations disrupt IKr channel regulation through 14-3-3epsilon. In: Hum.Mol.Genet., H. 15, S. 2888–2902.

Cordeiro, J. M.; Brugada, R.; Wu, Y. S.; Hong, K.; Dumaine, R. (2005): Modulation of I-Kr inactivation by mutation N588K in KCNH2: A link to arrhythmogenesis in short QT syndrome. In: Cardiovascular Research, H. 67, S. 498–509.

Cui, J.; Kagan, A.; Qin, D. M.; Mathew, J.; Melman, Y. F.; McDonald, T. V. (2001a): Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. In: Journal of Biological Chemistry, H. 276, S. 17244–17251.

Curran, M. E.; Splawski, I.; Timothy, K. W.; Vincent, G. M.; Green, E. D.; Keating, M. T. (1995): A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. In: Cell, H. 80, S. 795–803.

Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A. L.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L. et al. (1998b): The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. In: Science, H. 280, S. 69–77.

Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. Online verfügbar unter <http://www.ubicampus.mh-hannover.de/~fahlke/skriptmembrantransport.pdf>, zuletzt geprüft am 16.09.2010.

Hamm, C. W. (2004): Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom. ACS ohne persistierende ST-Hebung. In: Zeitschrift für Kardiologie, H. 1 Band 93, S. 72–90. Online verfügbar unter http://leitlinien.dgk.org/images/pdf/leitlinien_volltext/2004-02_acs_teil_1.pdf.

Herold, G. (2007): Innere Medizin 2008. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis: Herold.

Hoppe, U. C. (2001): Physiologische und pathophysiologische Bedeutung kardialer Ionenkanäle. Herausgegeben von ALPHA Informationsgesellschaft mbH/Lampertheim. Lebendige Wissenschaft. Online verfügbar unter <http://www.institut-wv.de/5171.html>.

Horton, H. Robert; Biele, Carsten (2008): Biochemie. 4., aktual. Aufl. München: Pearson Studium.

- Hunt, M. (2010): Real Time PCR. University of South Carolina School of Medicine. Online verfügbar unter <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>, zuletzt aktualisiert am 01.07.2010.
- Jones, E. M. C.; Roti Roti, E. C.; Wang, J.; Delfosse, S. A.; Robertson, G. A. (2004): Cardiac IKr Channels Minimally Comprise hERG 1a and 1b Subunits. In: J.Biol.Chem., H. 279, S. 44690–44694.
- Kaplan, W. D.; Trout, W. E. [III] (1969): The Behavior Of Four Neurological Mutants Of Drosophila. In: Genetics, H. 61, S. 399–409.
- Kellinghaus, J. (2007): Hämodynamische Charakterisierung eines murinen Sepsis Modells. Dissertation. Aachen. Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule.
- Kiehn, J.; Lacerda, A. E.; Wible, B.; Brown, A. M. (1996): Molecular Physiology and Pharmacology of HERG. Single-Channel Currents and Block by Dofetilide. In: Circulation, H. 94, S. 2572–2579.
- Kirsch, G. E.; Trepakova, E. S.; Brimecombe, J. C.; Sidach, S. S.; Erickson, H. D.; Kochan, M. C. et al. (2004): Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: Effects of temperature and stimulus pattern. In: J Pharmacol Toxicol Methods, H. 50, S. 93–101.
- Kojda, G.; Kottenberg, K.; Nix, P.; Schlüter, D.; Piper, H. M.; Noack E. (1996): Low increase in cGMP induced by organic nitrates und nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. In: Circulation Research, H. 78, No 1, S. 91–101.
- Krauss, Gerhard (2008): Biochemistry of signal transduction and regulation. 4th, enlarged and improved ed. Weinheim: Wiley-VCH.
- Larsen, A. P.; Olesen, S. P.; Grunnet, M.; Jespersen, T. (2008): Characterization of hERG1a and hERG1b potassium channels – a possible role for hERG1b in the IKr current. In: Pflugers Arch, H. 456, S. 1137–1148.
- Lu, Y. M. P.; Mahaut-Smith, A.; Varghese, C. L.; Huang, P. R.; Kemp, J. I.; Vandenberg (2001): Effects of premature stimulation on HERG K(+) channels. In: J.Physiol, H. 537, S. 843–851.

McBride, B. F.; Yang, T.; Liu, K.; Urban, T. J.; Giacomini, K. M.; Kim, R. B.; Roden, D. M. (2009): The Organic Cation Transporter, OCTN1, Expressed in the Human Heart, Potentiates Antagonism of the HERG Potassium Channel. In: J Cardiovasc Pharmacol, S. 1–9.

Mitcheson, J. J.; Chen, M.; Lin, C.; Culberson, M. C.; Sanguinetti, S. (2000): A structural basis for drug-induced long QT syndrome. In: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, H. 97, S. 12329–12333.

Röthig, A. (2009): Einfluss der Stimulation nikotinerger Rezeptoren auf die endotheliale PTHRP-Expression und die endotheliale Suszeptibilität gegenüber Apoptose. Betreut von Prof. Dr. K.-D. Schlüter und Prof. Dr. J. Roth. Gießen. Justus-Liebig-Universität, Physiologisches Institut.

Sanguinetti, M. C.; Jiang, C.; Curran, M. E.; Keating, M. T. (1995): A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. In: Cell, H. 81, S. 299–307.

Sanguinetti, M. C.; Jurkiewicz, N. K. (1990): Two Components of Cardiac Delayed Rectifier K⁺ Current. In: J Gen Physiol, H. 96, S. 195–215.

Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M. (2006): hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. In: Nature, H. 440, S. 463–469.

Schlier, A. (2009): Einfluss von CGRP auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmuskelzellen. Dissertation. Betreut von Prof. Dr. K.-D. Schlüter. Gießen. Justus-Liebig-Universität, Physiologisches Institut.

Schreckenberg, R.; Taimor, G.; Piper, H. M.; Schlüter, K.-D. (2004): Inhibition of Ca²⁺-dependent PKC isoforms unmasks ERK-dependent hypertrophic growth evoked by phenylephrine in adult ventricular cardiomyocytes. In: Cardiovascular Research, H. 63, S. 553–560.

Schunkert, H.; Weil, J. (2006): Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. In: Clin Res Cardiol, H. 95, S. 1–17.

Senges, J. (2001): Myocardial infarction redefined: implication of the new definition of non-ST-segment elevation myocardial infarction on clinical practice: results of the

ACOS-registry. In: European Heart Journal, H. 22, S. 600.

Shi, W. H. S.; Wang, Z. M.; Pan, R. S.; Wymore, I. S.; Cohen, D.; McKinnon, J. E.; Dixon, M. (1998): Cloning of a mammalian elk potassium channel gene and EAG: mRNA distribution in rat sympathetic ganglia. In: Journal of Physiology-London, H. 511, S. 675–682.

Shi, W. R. S.; Wymore, H. S.; Wang, Z.; Pan, I. S.; Cohen, D.; McKinnon, J. E.; Dixon (1997a): Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. In: J.Neurosci., H. 17, S. 9423–9432.

Smith, P. L.; Baukrowitz, T.; Yellen, G. (1996): The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. In: Nature, H. 379, S. 833–836.

Spector, P. S.; Curran, M. E.; Zou, A.; Keating, M. T.; Sanguinetti, M. C. (1996): Fast Inactivation Causes Rectification of the IKr Channel. In: J Gen Physiol, H. 107, S. 611–619.

Spektralphotometer. Online verfügbar unter http://www.physikdidaktik.uni-osnabrueck.de/angebote/probestudium/V22_Spektralphotometer.pdf, zuletzt geprüft am 29.09.2010.

Suckow, Arnt (2004): Charakterisierung von Ionenkanälen der ether-á-go-go-Familie. Univ., Diss.--Göttingen, 2003. 1. Aufl. Göttingen: Cuvillier.

Thomas, D.; Hammerling, B. C.; Wimmer, A.; Wu, K.; Ficker, E.; Kuryshhev, Y. A.; Scherer, D. (2004): Direct block of hERG potassium channels by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I. In: Cardiovascular Research, H. 64, S. 467–476.

Towbin, J. A. (2000): Cardiac arrhythmias: the genetic connection. In: J.Cardiovasc.Electrophysiol., H. 11, S. 601–602.

UV/VIS/Fotometrie (2009). Online verfügbar unter <http://www.analytik.de/content/view/3856/821/>, zuletzt aktualisiert am 26.06.2009.

Wang, Q.; Chen, Q.; Li, H.; Towbin, J. A. (1997a): Molecular genetics of long QT syndrome from genes to patients. In: Curr.Opin.Cardiol., H. 12, S. 310–320.

Wang, Q.; Chen, Q.; Towbin, J. A. (1998a): Genetics, molecular mechanisms and

management of long QT syndrome. In: Ann.Med., H. 30, S. 58–65.

Wang, S.; Liu, S.; Morales, M. J.; Strauss, H. C.; Rasmusson, R. L. (1997b): A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. In: J.Physiol, H. 502, S. 45–60.

Wang, Y. G. (1998b): Genistein elicits biphasic effects on L-type Ca^{2+} current in feline atrial myocytes. In: American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, H. 44, S. H204-H212.

Wang H, Zhang Y, Cao L, Han H, Wang J, Yang B et al. (2002): HERG+ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. In: Cancer Res, 62:4843-4848

World Health Organization (Hg.) (1993): MONICA-Projekt, Region Augsburg. Herz-Kreislauf-Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Neuherberg: GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

Zhao, Y.; Cui, C.; Li, Y.; Zhang, J.; Xu, Y.; Zeng, Y. (2007): Transfection by eukaryotic expression vector pcDNA3-HERG inhibits the cultured neonatal rabbit ventricular myocyte hypertrophy induced by phenylephrine. In: CHINESE JOURNAL OF CARDIAC ARRHYTHMIAS, H. 11.

Zhou, Z.; Gong, Q.; Epstein, M. L.; January, C. T. (1998a): HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. In: J.Biol.Chem., H. 273, S. 21061–21066.

Zhou, Z.; Gong, Q.; Ye, B.; Fan, Z.; Makielski, J. C.; Robertson, G. A.; January, C. T. (1998d): Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. In: Biophys.J., H. 74, S. 230–241.

9. Eidesstattliche 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.

Sabrina Bühler

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung des Themas, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine Geduld und wohlwollende Unterstützung trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ich danke den medizinisch-technischen Assistenten Frau Daniela Schreiber und Herrn Sergej Kechter für die Präparation und Bereitstellung der Herzmuskelzellen, den technischen Assistenten Herrn Peter Volk für die Unterstützung an der Langendorff-Apparatur und Frau Nadine Woitasky für ihre Unterstützung im Labor.

Desweiteren Danke ich Dr. R. Schreckenbergr für seine Unterstützung und natürlich meinen Mitdoktoranden für das gute Arbeitsklima und die Zusammenarbeit.

Insbesondere Danke ich meine Eltern und meiner Freundin Marta Vázquez-Rodríguez, die mich während des ganzen Studiums und bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt, getragen und mir dies somit ermöglicht haben. Ich bedanke mich für ihr Verständnis und ihre Geduld.