GERALD MÜNZEL

DIE BEDEUTUNG DES PEPTIDHORMONS INTERMEDIN IN DER THERAPIE DER HERZINSUFFIZIENZ AM MODELL ISCHÄMISCH/ REPERFUNDIERTER ISOLIERTER RATTENHERZEN



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



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen Printed in Germany





STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890 email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Die Bedeutung des Peptidhormons Intermedin in der Therapie der Herzinsuffizienz am Modell ischämisch/reperfundierter isolierter Rattenherzen

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

vorgelegt von

Gerald Münzel

aus Bad Salzungen

Gießen (2011)

Aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen Leiter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Kreuder

Tag der Disputation: 15.12.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	<u>I</u>
Abkürzungsverzeichnis	. IV
<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
44 Die Heurineuffizienz	4
1.1 Die Herzinsumzienz	1
1.2 Remodeling des myokards bei Herzinsuffizienz	2
1.2.1 Funktionelle und strukturelle veränderungen	3 5
1.2.2 Neuronumorale veranuerungen	נייי א
1 3 Therapeutische Ansätze bei Herzinsuffizienz	12
1 / Das Pentidhormon Intermedin	12
1.4 Das Feptidionin-Pentidhormon-Familie	. 13
1 4 2 Rezeptoren und Signalwege der Kalzitonin-Peptidhormon- Familie	15 e
1.4.3 Intermedin (IMD)	. 17
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	. 19
2. Materialien	.20
2.1 Chemikalien	. 20
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf	. 20 . 21
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz	. 20 . 21 . 21
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	. 20 . 21 . 21 . 21
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR.	. 20 . 21 . 21 . 21 . 21 . 21
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien	. 20 . 21 . 21 . 21 . 21 . 21 . 22
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software	. 20 . 21 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software	. 20 . 21 . 21 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software	. 20 . 21 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software	. 20 . 21 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 23
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz 3.1.1 Versuchstiere	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 23
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz 3.1.1 Versuchstiere 3.1.2 Präparation	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 23 . 23 . 23
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz 3.1.1 Versuchstiere 3.1.2 Präparation 3.1.3 Perfusionslösung	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 23 . 23 . 23 . 23 . 24
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz 3.1.1 Versuchstiere 3.1.2 Präparation 3.1.3 Perfusionslösung 3.1.4 Versuchsapparatur	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 23 . 23 . 23 . 23 . 24 . 24 . 24
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz 3.1.1 Versuchstiere 3.1.2 Präparation 3.1.3 Perfusionslösung 3.1.4 Versuchsapparatur 3.1.5 Erfasste Parameter im Langendorff-Versuchsmodell	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 22 . 23 . 23 . 23 . 23
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz 3.1.1 Versuchstiere 3.1.2 Präparation 3.1.3 Perfusionslösung 3.1.4 Versuchsapparatur 3.1.5 Erfasste Parameter im Langendorff-Versuchsmodell 3.1.6 Versuchsprotokoll	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 23 . 23 . 23 . 23 . 23
2.1 Chemikalien 2.2 Geräte und Laborbedarf 2.2.1 Langendorff-Herz 2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese 2.2.3 Real-Time-PCR. 2.2.4 Verbrauchsmaterialien 2.2.5 Software 3. Methoden 3.1 Langendorff-Herz 3.1.1 Versuchstiere 3.1.2 Präparation 3.1.3 Perfusionslösung 3.1.4 Versuchsapparatur 3.1.5 Erfasste Parameter im Langendorff-Versuchsmodell 3.1.6 Versuchsprotokoll 3.1.7 Probenverarbeitung	. 20 . 21 . 21 . 21 . 22 . 22 . 22 . 22 . 23 . 23 . 23 . 23

3.3 CDNA-Synthese	28
3.4 Real-Time-PCR	29
3.4.1 Das Verfahren der Real-Time-PCR	29
3.4.2 Probenvorbereitung	30
3.4.3 PCR-Programme	30
3.4.4 Auswertung der Real-Time-PCR	35
3.5 Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	38
4.1 Untersuchungen am Langendorff-Herz	38
4.1.1 Versuche unter normoxen Versuchsbedingungen	38
4.1.2 Versuche unter ischämischen Versuchsbedingungen	44
4.1.3 Beeinflussung des postischämischen Herzödems	51
4.2 Expressionsanalyse	52
4 2 1 Die normoxen Versuchreihen	53
4 2 2 Die ischämischen Versuchsreihen	56
4.3 Zusammonfassung der Ergobnisso	60
	00
5. Diskussion	61
5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61
5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61 63
5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen	61 63
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen	61 63 63
5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen	61 63 67 70
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61 63 63 63 67 70 71
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61 63 67 70 71
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61 63 67 70 71 74
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61 63 63 70 71 74 74
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 	61 63 63 70 70 71 74 75
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.3 Apoptose 	61 63 63 70 71 74 74 75 77
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.3 Apoptose 5.4.4 Herzinsuffizienzmarker 	61 63 63 70 70 71 74 74 75 77 79
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.4 Herzinsuffizienzmarker 5.5 Ausblicke und Therapieoptionen 	61 63 63 70 70 71 74 74 75 77 79 80
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61 63 63 70 70 71 74 74 75 77 79 80
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.4 Herzinsuffizienzmarker 5.5 Ausblicke und Therapieoptionen 	
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.3 Apoptose 5.4.4 Herzinsuffizienzmarker 5.5 Ausblicke und Therapieoptionen 	61 63 63 70 70 71 74 75 77 79 80 82
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.4 Herzinsuffizienzmarker 5.5 Ausblicke und Therapieoptionen 6. Zusammenfassung 7. Summary 	
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.4 Herzinsuffizienzmarker 5.5 Ausblicke und Therapieoptionen 6. Zusammenfassung 	61 63 63 70 70 71 74 74 75 77 79 80 82 84
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins 5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen 5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen 5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen 5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem 5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin 5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion 5.4.1 Zellhypertrophie 5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion 5.4.4 Herzinsuffizienzmarker 5.5 Ausblicke und Therapieoptionen 6. Zusammenfassung 7. Summary 	61 63 67 70 71 74 74 74 75 77 79 80 82 84 86
 5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins	61 63 63 70 70 71 74 74 75 77 79 80 82 84 86

<u>10. Anhang</u>	<u>96</u>
10.1 Veröffentlichungen	
10.2 Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
	(Angiotensin-Konvertierungs-Enzym)
AM	Adrenomedullin
AM-2	Adrenomedullin 2
AMR	Adrenomedullin-Rezeptor
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
bFGF	Fibroblast-growth-factor (Fibroblasten- Wachstums-Faktor)
BNP	Brain natriuretisches Peptid
bpm	Beats per minute (Schläge pro Minute)
BW	Body weight (Körpergewicht)
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	complementary DNA (komplementare DNA)
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CGRP	Calcitonin-gene-related Peptide
	(Kalzitoningen-verwandtes Peptid)
CLR	Calcitonin-Rezeptor-like-Rezeptor
	(Kalzitonin-Rezeptor-verwandter-Rezeptor)
CR	Calcitonin-Rezeptor (Kalzitonin-Rezeptor)
DAG	Diazylglyzerin

db-cAMP	Dibutyryl-cyclo-AMP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
ERK	Extrazellulär regulierte Signalkinase
HW	Herzgewicht
HF	Herzfrequenz
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HZV	Herzzeitvolumen
IMD	Intermedin
IP3	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
kPP	koronarer Perfusionsdruck
LVDP	linksventrikuläre Druckamplitude
LVPdias	linksventrikulärer diastolischer Druck
LVPsys	linksventrikulärer systolischer Druck
mKHL	modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natrium-Chlorid/Kochsalz
NEP	neutrale Endopeptidase
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PI3	Phosphoinositol-3-Phosphat
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
РКА	Proteinkinase A
РКС	Proteinkinase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAMP	Rezeptor-Assoziertes-Modulierendes- Proteine
RCP	Rezeptor-Component-Protein (Rezeptor- Komponenten-Protein)
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standarddifferenz
SERCA	Sarkoplasmatische-Ca ²⁺ -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TC-Wert	Threshold Cycle-Wert (Schwellenwert-Zyklus)
TGF-β	Transforming-growth-factor-β (transformierender Wachstums-Faktor-β)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α

1. Einleitung

1.1 Die Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz stellt mit mehr als 10 Millionen Patienten allein in Europa eine der häufigsten internistischen Erkrankungen dar. Durch die demographische Alterung Deutschlands und eine altersabhängig steigende Prävalenz der Herzinsuffizienz wird diese Erkrankung auch in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen [1].

Nach WHO-Definition liegt eine Herzinsuffizienz vor, wenn das Herz unter Belastung bzw. in Ruhe nicht mehr in der Lage ist, den Organismus mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. An klinischen Symptomen beschreibt die WHO Dyspnoe, Müdigkeit, Leistungsminderung und Flüssigkeitsretention [2]. An den klinischen Kriterien orientiert sich auch die Klassifikation der New York Heart Association (NYHA-Klassifikation), welche die Herzinsuffizienz anhand der Leistungsfähigkeit des Patienten in 4 Stadien unterteilt (s. Tabelle 1.1). Neben dieser an der Klinik orientierten Einteilung kann man die Herzinsuffizienz auch nach funktionellen Gesichtspunkten unterteilen. Die häufigste und auch im Zentrum dieser Arbeit stehende Form ist die linksventrikuläre systolische Herzinsuffizienz, die mit einer verringerten Auswurffraktion des linken Herzens einhergeht und ca. 60 % aller Herzinsuffizienz-Fälle ausmacht. Daneben wurde eine linksventrikuläre diastolische Herzinsuffizienz, eine rechtsventrikuläre Herzinsuffizienz sowie eine Globalinsuffizienz, die beide Ventrikel betrifft, beschrieben [3].

Stadium	Kriterien
I	Herzerkrankung ohne Beschwerden und mit normaler
	körperlicher Belastbarkeit
II	Herzerkrankung mit Beschwerden bei stärkerer körperlicher
	Belastung
III	Herzerkrankung mit Beschwerden bei leichter körperlicher
	Belastung
IV	Herzerkrankung mit Beschwerden in Ruhe, Bettlägerigkeit

Tabelle 1.1: NYHA-Klassifikation

Herzinsuffizienz kann auf verschiedenste Ursachen zurückgeführt werden. Bei ca. 90 % aller Erkrankten ist vor allem die koronare Herzerkrankung in Verbindung mit der arteriellen Hypertonie Ursache. Daneben können aber auch Kardiomyopathien, Herzvitien, entzündliche Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Toxine und Rhythmusstörungen Ursachen sein [4]. Diese Faktoren führen zu einer initialen myokardialen Schädigung des Herzens und lösen über lokale und systemisch neuroendokrine Wege einen Umbauprozess (Remodeling) des Herzgewebes aus.

1.2 Remodeling des Myokards bei Herzinsuffizienz

Die durch kardio-vaskuläre Erkrankungen bedingten myokardialen Schäden versucht der Organismus durch Ausschöpfung kardialer Funktionsreserven und durch die Aktivierung verschiedenster funktioneller und struktureller Veränderungen auszugleichen. Die chronische Ausschöpfung von Reserven führt zu einem dauerhaften Umbau des Herzgewebes (Remodeling) und einer progredienten Verschlechterung der Ventrikelfunktion [5].

Kennzeichen der Remodeling-Prozesse sind funktionelle und strukturelle Veränderungen des Myokards, neurohumorale Umstellungsvorgänge und Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene (s. Tabelle 1.2).

System	Pathophysiologischer Anpassungsprozess
Funktionelle/strukturelle	Abgeschwächter Frank-Starling-Mechanismus
Veränderungen	Linksventrikuläre Dilatation
	Myokardhypertrophie
	kardiale Fibrosierung
	Abgeschwächtes Bowditch-Phänomen
	Postischämisches Herzödem
Neurohumorale	Sympathikus-Aktivierung
Veränderungen	Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-
	Systems (RAAS)
	Synthesesteigerung natriuretischer Peptide
	Steigerung der Endothelin-Synthese
	Zytokinproduktion
	Veränderungen des Stickstoffmonoxid (NO)-Levels
Zelluläre/molekulare	Störungen im Kalziumhaushalt
Veränderungen im	Myozytenhypertrophie
Myozyten	Myozytenapoptose
	Desensitivierung von β ₁ -Adrenozeptoren
	Expressionsveränderung von lonenaustauschern

Tabelle 1.2: Pathophysiologische Veränderungen während des RemodelingsSystemPathophysiologischer Anpassungsprozess

1.2.1 Funktionelle und strukturelle Veränderungen

Eine der wichtigsten Anpassungsmechanismen des Myokards an den Verlust von kontraktilem Herzmuskelgewebe ist die Steigerung der Vorlast (Ventrikelfüllung). Die Vorlast muss im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus überproportional ansteigen, um den Muskelverlust auszugleichen und das Schlagvolumen konstant zu halten. Dies führt zu einer ventrikulären Dilatation [6, 7]. Nach dem Laplace'schen Gesetz bedingt eine Steigerung der Vorlast und ein in der Folge erhöhtes Ventrikelvolumen einen Anstieg der Wandspannung. Um dieses Missverhältnis auszugleichen, kommt es durch Hypertrophie von Myozyten zu einer Zunahme der Wanddicke. Durch die Myokardhypertrophie wird einerseits die Wandspannung vermindert, andererseits nimmt die Kontraktionskraft des Herzens durch gesteigerte Synthese kontraktiler Proteine zu. Das, durch den Verlust von Muskelgewebe entstandene, Kraftdefizit kann so zumindest teilweise wieder ausgeglichen werden. Wird jedoch ein kritischer Durchmesser des Ventrikelmyokards überschritten, ist die Perfusion durch eine relative Abnahme der Kapillardichte nicht mehr gewährleistet und es kommt zu einer weiteren Schädigung des Herzgewebes [8].

Neben der Myozytenhypertrophie steigt auch die Aktivität der Fibroblasten, die vermehrt Kollagen synthetisieren. Der gesteigerte Kollagengehalt der extrazellulären Matrix verhindert Beginn zu der Herzinsuffizienz eine übermäßige ventrikuläre Dilatation. Später führt die Fibrosierung jedoch zu einer Relaxationsstörung, wodurch die diastolische Füllung eingeschränkt wird [9, 10].

Eine weitere funktionelle Veränderung, die bei herzinsuffizienten Patienten beobachtet werden konnte, ist ein abgeschwächtes Bowditch-Phänomen. Das Bowditch-Phänomen beschreibt eine Kraft-Frequenz-Beziehung, demnach kann die Herzfrequenz unter physiologischen Bedingungen parallel zur Kontraktilität gesteigert werden. Der zugrunde liegende Mechanismus ist eine, auf der verkürzten Diastolendauer beruhende, Kalziumakkumulation in den Myozyten. Im insuffizienten Myokard folgt durch das abgeschwächte Bowditch-Phänomen ein inadäguater Anstieg des Herz-Zeit-Volumens unter Einfluss eines gesteigerten Sympathikotonus mit systemischer wie auch myokardialer Minderperfusion. Diese Minderperfusion trägt zu einer weiteren Schädigung des Myokards bei [11].

Eine akute myokardiale Schädigung (z. B. durch eine temporäre Ischämie) wird von einem Herzödem in den ischämischen Arealen begleitet [12]. Grundlage des Herzödems ist eine Schädigung des Endothels, welches unter physiologischen Bedingungen die Blut-Gewebe-Schranke bildet. Im ischämischen Gebiet verlieren die Endothelzellen durch den Sauerstoff- und Nährstoffmangel die sie bedeckende Glykokalix (eine luminal gerichtete Schicht aus Kohlenhydraten) oder gehen zu Grunde [13]. Diese Mechanismen führen über eine Permeabilitätssteigerung der Blut-Gewebe-Schranke und dem Austritt von Flüssigkeit zu einem Herzödem. Darüber hinaus kommt es unter ischämischen Bedingungen durch die Anhäufung von Stoffwechselendprodukten zu einer Steigerung der intrazellulären und interstitiellen Osmolarität. In der Folge strömt Flüssigkeit vermehrt durch die gestörte Blut-Gewebe-Schranke entlang des Osmolaritätsgradienten, was wiederum die Entstehung des Herzödems fördert. In der Phase der Reperfusion kommt es durch den raschen Abtransport von Stoffwechselendprodukten zu einer Abnahme der interstitiellen Osmolarität im Vergleich zur intrazellulären Osmolarität mit der Folge einer weiteren Zellschwellung. Das durch Ischämie geschädigte Zytoskelett der Myozyten (ein Netzwerk von Filamenten, das die Zelle in ihrer Struktur stabilisiert und vor mechanischem Stress schützt) kann der Zellschwellung nicht standhalten und die Zellen gehen zu Grunde [14]. Dieser Zelluntergang (auch als Reperfusionsschaden bezeichnet), sowie die Tatsache einer ödembedingten vergrößerten Diffusionstrecke für Sauerstoff und Nährstoffe (Gefäß \rightarrow Myozyt) tragen zu einer weiteren Schädigung des Herzmuskels bei. Das postischämische Herzödem ist somit ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Herzinsuffizienz.

1.2.2 Neurohumorale Veränderungen

Das fallende Herz-Zeit-Volumen bei Herzinsuffizienz wird hauptsächlich durch eine Erhöhung des peripheren Widerstandes und einer Natrium-Chlorid-(NaCl) bzw. Flüssigkeitsretention kompensiert.

Die Erhöhung des peripheren Widerstandes wird initial durch eine gesteigerte Sympathikus-Aktivität verursacht (s. u.). Später, beim Auftreten klinischer Symptome, kommt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) verstärkend hinzu, welches eine vermehrte NaCl-Rückresorption und eine zusätzliche Sympathikusstimulation hervorruft (s. u.). Unterstützt werden diese systemischen Mechanismen von einer gesteigerten Synthese lokal vasokonstringierender Faktoren (wie Endothelin, s. u.). Dagegen sind vasodilatierende und diuretisch wirkende Substanzen wie die natriuretischen Peptide (ANP und BNP) und NO in ihrer Wirkung herabgesetzt (s. u.) [15]. Darüber hinaus wirken die bei Herzinsuffizienz vermehrt freigesetzten Zytokine

(vor allem TNF- α) negativ inotrop und apoptoseinduzierend auf das Myokard [16, 17].

Durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems kann die Herzleistung durch Zunahme von Herzfrequenz und Kontraktilität erheblich gesteigert werden [18]. Dabei kommt es durch Stimulation von β-Adrenozeptoren zur Aktivierung einer G-Protein gekoppelten Adenylatzyklase, die den intrazellulären Botenstoff zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) vermehrt produziert. Dieser Botenstoff kann über Proteinkinasen Ionenkanäle (vor allem Ca²⁺-Kanäle), kontraktile Proteine und andere metabolische Enzyme aktivieren. So kommt es neben einer katecholamin-vermittelten Steigerung der Inotropie und Chronotropie auch zur Stimulation von Wachstumsprozessen [15, 19]. Bei der chronischen Herzinsuffizienz ist der Organismus einer dauerhaften adrenergen Überstimulation ausgesetzt [20]. Die prolongierte Stimulation von β -Adrenozeptoren führt dabei zu Desensibilisierungsprozessen: Das intrazelluläre C-terminale Ende des β-Adrenozeptors wird durch das Protein β-Arrestin an der intrazellulären Signaltransduktion gehindert. In der Folge werden die β-Adrenozeptoren internalisiert und proteolytisch abgebaut (Runterregulierung) [21, 22]. Trotz der herabgesetzten Wirkung der Katecholamine auf das Herz durch Entkopplung und Runterregulation von Rezeptoren, wird das Herz weiterhin negativ beeinflusst. So kommt es durch fortdauernde Tachykardien, Myozytenapoptosen und -nekrosen zur Ausbildung einer Kardiomyopathie [21, 23].

Der gesteigerte Sympathikotonus sowie eine sinkende Nieren-Perfusion führen zur Aktivierung des RAAS durch eine vermehrte Renin-Produktion. Renin fördert die Bildung von Angiotensin I (AT I), das durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in das aktive Substrat Angiotensin II (AT II) umgewandelt wird [24]. AT II wirkt über AT1- und AT2-Rezeptoren, wobei die funktionellen Effekte wie Katecholaminfreisetzung, Aldosteronfreisetzung, Vasokonstriktion und wachstumsfördernde Prozesse vor allem über AT1-Rezeptoren vermittelt werden [25]. AT2-Rezeptoren wirken vor allem antiproliferativ und vasodilatierend [26], im kardio-vaskulären System spielen sie jedoch nur eine untergeordnete Rolle [27]. Im Zuge einer chronischen Herzinsuffizienz wird dieses Verhältnis noch weiter zu Gunsten von AT1Rezeptoren verschoben. Dies geschieht durch eine Überexpression von AT1-Rezeptoren und eine verminderte AT2-Rezeptorsynthese [28, 29]. Daraus folgt eine Myozyten- und Fibroblastenhypertrophie, sowie eine Induktion von Apoptose und pro-inflammatorischen Zytokinen [15]. Auch das vermehrt ausgeschüttete Aldosteron trägt zur Myozyten- und Fibroblastenhypertrophie bei [30]. Zusätzlich führen die RAAS-Aktivierung zu einer Vasokonstriktion (erhöhte Nachlast) und einer vermehrten NaCl- und Wasser-Retention (gesteigerte Vorlast), was durch eine erhöhte Beanspruchung des Herzens den myokardialen Energiebedarf steigert und so weitere myokardiale Schäden verursacht.

Weiterhin wird die Vasomotorik und der Elektrolyt- und Wasserhaushalt durch die natriuretischen Peptide beeinflusst. Die zwei bedeutendsten Vertreter dieser Familie sind das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das brain natriuretische Peptid (BNP). ANP wird vor allem im Atrium und BNP im Ventrikel synthetisiert [31]. Wichtige Stimuli ihrer Synthese sind Tachykardie, Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone, Endothelin und AT II [32]. Die Freisetzung wird dagegen durch eine erhöhte Wandspannung im Vorhof (ANP-Freisetzung) bzw. in der Kammer (BNP-Freisetzung) induziert [33]. Die physiologischen Wirkungen von ANP und BNP sind Diurese (durch eine vermehrte Natrium-(Na⁺)-Ausscheidung), Senkung des Gefäßwiderstandes und Mitosehemmung. Somit sind sie wichtige Gegenspieler des AT II. Im Zuge einer Herzinsuffizienz gerät dieses streng geregelte System aus dem Gleichgewicht. So kommt es zwar durch die Aktivierung des RAAS durch die gesteigerte ventrikuläre Füllung zu einer vermehrten ANP- und BNP-Ausschüttung, ihre physiologischen Wirkungen sind jedoch unter diesen Bedingungen abgeschwächt. Dieser Sachverhalt macht die natriuretischen Peptide vor allem als diagnostischen Marker der Herzinsuffizienz interessant [32].

Bei der Herzinsuffizienz wird auch das Protein Endothelin vermehrt ausgeschüttet. Vor allem Adrenalin und AT II stimulieren dessen Freisetzung [32]. Endothelin wird im Myokard und in Gefäßen gebildet und entfaltet seine Wirkung über Endothelin-A und -B Rezeptoren. Den A-Rezeptoren an glatten Muskelzellen und Herzmuskelzellen wird eine vasokonstringierende und wachstumsstimulierende Wirkung zugeschrieben. B-Rezeptoren, die sich vor allem an Endothelien befinden, wirken dagegen vasodilatierend [5, 34]. Pathophysiologisch kommt es bei der Herzinsuffizienz durch eine gesteigerte Sympathiko- und RAAS-Aktivierung zu einer erhöhten Endothelin-Freisetzung. Durch das vorgeschädigte Endothel ist die B-Rezeptor-vermittelte Signalkaskade gestört und Endothelin interagiert direkt an der darunter liegenden glatten Muskulatur mit den dort ansässigen A-Rezeptoren. Es überwiegt die vasokonstringierende Wirkung von Endothelin [35]. Die Endotheline tragen so über eine Steigerung des Gefäßwiderstandes und somit der Nachlast zum myokardialen Remodeling und zur Progredienz der Herzinsuffizienz bei [36].

1.2.3 Zelluläre und molekulare Veränderungen

Das Remodeling des Myokards hängt eng mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen zusammen, die die Funktion und den Aufbau von Herzmuskelzellen beeinflussen. So kommt es zu Veränderungen im Kalzium-(Ca²⁺)-Haushalt der Herzmuskelzelle, wodurch das Kontraktionsvermögen beeinflusst wird. Die Aktivierung verschiedenster neurohumoraler Systeme bewirkt einen vermehrten Zelluntergang durch Apoptose. Dieser Zelluntergang wird wiederum durch Hypertrophie der verbliebenen Myozyten ausgeglichen, um die Pumpfunktion des Herzens aufrecht zu erhalten.

Die Funktion der Herzmuskelzellen basiert auf dem Prinzip der elektromechanischen Kopplung, das vor allem von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration abhängig ist [37]. Durch Auslösen eines Aktionspotentials kommt es unter physiologischen Bedingungen zu einem spannungsabhängigen Ca²⁺-Einstrom durch L-Typ-Ca²⁺-Kanäle. Dieser Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär aktiviert eine Ryanodin-Rezeptor-vermittelte Ca²⁺-Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Das in der Folge freigesetzte Ca²⁺ führt durch die Interaktion mit Troponin C zur Myozytenkontraktion. Die Myozytenrelaxation beginnt mit der Dissoziation von Ca²⁺ und Troponin C. Danach kommt es zu einer Wiederaufnahme des Ca²⁺ in das SR durch die SR-Ca²⁺-ATPase (SERCA) und einem Ca²⁺-Transport nach extrazellulär durch

Na⁺/Ca²⁺-Austauscher sowie Ca²⁺-ATPasen [38]. Die intakte Regulation dieser Ca²⁺-Transport-Mechanismen ist wesentliche Voraussetzung für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens und kann auf verschiedenen Ebenen geschädigt werden. So ist der initiale Ca²⁺-Einstrom durch L-Typ-Ca²⁺-Kanäle im insuffizienten Herzen vermindert, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist [39]. Dieser verminderte Trigger-Ca²⁺-Einstrom führt über eine verminderte Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR zu einer geringeren Kontraktilität [40]. Aber auch die Aktivität der Ryanodin-Rezeptoren ist im insuffizienten Herzen verändert. Ursächlich dafür sind erhöhte Katecholaminspiegel (durch die erhöhte Sympathikusaktivität, s. Kap. 1.2.2), die eine vermehrte Phosphorylierung der Ryanodin-Rezeptoren durch Aktivierung der Proteinkinase A bewirken [41]. Dies führt zu einer Undichtigkeit der Ryanodin-Rezeptoren in der Diastole [42] (Ca²⁺ strömt aus dem SR in das Zytoplasma) und zusätzlich zu einer asynchronen Aktivierung bzw. Deaktivierung von Ryanodin-Rezeptorgruppen [43]. Daraus resultieren eine verminderte Ca²⁺-Beladung des SR, eine Absenkung des Ca²⁺-Maximums in der Systole und in der Diastole mit Nach-Depolarisierungen einer aesteiaerten Arrhythmieneigung [44]. Auch die Wiederaufnahme des Ca²⁺ in das SR durch die SERCA ist bei der Herzinsuffizienz verändert. So kommt es zu einer geringeren Expression [45] und einer verminderten Transportaktivität der SERCA. Gemeinsam führen diese Veränderungen zu einer geringeren Ca²⁺-Beladung des SR. Auch Veränderungen der intrazellulären Na⁺-Konzentration können durch eine Funktionsmodulation des Na⁺/Ca²⁺-Austauscher zur Dysregulation der Ca²⁺-Homäostase beitragen. Durch eine verminderte Expression der Na⁺-Kalium-(K⁺)-ATPase in den Myozyten des insuffizienten Herzens steigt die intrazelluläre Na⁺-Konzentration an [46]. Die Zelle versucht dem Na⁺-Überschuss über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher entgegen zu wirken und sorgt so für einen weiteren Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Die Summe der genannten Veränderungen im zellulären Ca²⁺-Haushalt führen zu einer Abschwächung des elektrischen Gradienten über der Zellmembran und bedingen so ein erhöhtes Arrhythmie-Risiko [47] (s. o.).

Eine weitere zelluläre Anpassungsreaktion bei Herzinsuffizienz ist die Myozytenhypertrophie. Unterschieden werden eine konzentrische Hypertrophie

bei erhöhter Nachlast und eine Längenzunahme der Myozyten bei erhöhter Vorlast. Die Myozytenhypertrophie basiert auf einer Sarkomer-Neubildung, wobei die neu gebildeten Sarkomere parallel oder in Serie geschaltet werden können [48]. Die Induktion dieser gesteigerten Proteinsynthese kann über verschiedene Signalwege erfolgen. Zum einen existieren Mechanosensoren wie das Ankerprotein Integrin. Integrin dient als Spannungsdetektor, indem es in Verbindung mit weiteren Proteinen (z. B. dem Melusin) die Wandspannung an der Zellmembran registriert und entsprechende Signalwege zur Proteinsynthese anstößt [49]. Auch das neurohumorale System (s. Kap.1.2.2) trägt entscheidend zur Hypertrophie-Induktion der Myozyten bei. Hier sind insbesondere das sympathische Nervensystem über die α_1 -Adrenozeptoren [50] und β_2 -Adrenozeptoren [51] sowie AT II über AT-1-Rezeptoren [52] beteiligt. Bei der Pathogenese des Remodelings spielen neben systemischen Faktoren auch auto- und parakrine Faktoren eine wichtige Rolle: Wachstumsfaktoren wie der Fibroblast-growth-Factor (bFGF), Transforming-growth-Factor (TGF-β) und Neuregulin werden in Fibroblasten und in Kardiomyozyten gebildet und bei mechanischem Stress sowie Stimulation durch das RAAS ausgeschüttet. Zusammen mit Entzündungsmediatoren, wie Interleukin-1, Interleukin-6 und dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), wirken sie auf auto- und parakrinem Weg hypertrophie-induzierend auf die Myozyten [49]. Die zahlreichen Wachstumstimmuli nutzen dabei verschiedenste Signaltransduktionswege. So kommt es bei der Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren zu einer gesteigerten De-Novo-Synthese von hauptsächlich ribosomaler Ribonukleinsäure (RNA), wodurch die Proteinsynthesekapazität der Zelle ansteigt [53, 54]. Die β_2 -Adrenozeptor-vermittelte myokardiale Hypertrophie ist dagegen TGF-βabhängig [55] und verläuft über einen verminderten RNA-Abbau. Dabei interagieren Polyamine mit den RNA-Molekülen und stabilisieren so deren Struktur. Ein wichtiges Glied in der Polyamin-Synthese ist das Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC). Schlüter et al. gelang der Nachweis, dass die ODC über einen β-Adrenozeptoren-vermittelten Signalweg induziert wird. Über die genannte RNA-Stabilisierung spielt sie bei der Genese der kardialen Hypertrophie eine Schlüsselrolle. Heut gilt die ODC wichtiger als Hypertrophiemarker [56, 57].

Die Hypertrophie betrifft nur einen Teil der kardialen Myozyten. Vielmehr kommt es durch eine gesteigerte Wandspannung, eine Aktivierung des RAAS, einen gesteigerten Sympathikotonus und durch Ischämie-Reoxygenierungs-Prozesse zum programmierten Zelltod (Apoptose) vieler Zellen. Die Apoptose bietet im Gegensatz zur Nekrose den Vorteil des kontrollierten Zelluntergangs ohne begleitende Entzündungsreaktion. Als Folge des Zellverlustes setzt sich das hypertrophierte Myokard im Vergleich zum gesunden Myokard aus deutlich weniger, aber massiv verdickten Kardiomyozyten zusammen [58-61]. Auf molekular Ebene ist die Apoptose ein komplizierter Prozess, der über eine Vielzahl von Signalwegen reguliert wird, darunter der intrinsische und der extrinsische Signalweg [62] (s. Abb. 1.1). Im extrinsischen Signalweg wird der Impuls zur Apoptose von extrazellulären Liganden wie Cytokinen und Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und durch die Bindung eines Death-Rezeptors auf die Zelle übertragen. Diese Interaktion dient der direkten Aktivierung von Caspasen (Caspasen sind proteolytische Enzyme, die Zellorganellen und zelluläre Proteine lysieren und die Zelle so in einen phagozytosefähigen Zustand überführen). Die Interaktion von Ligand und Death-Rezeptor kann aber auch die Endstrecke des intrinsischen Signalwegs der Apoptose einleiten, wodurch extrinsischer und intrinsischer Signalweg verbunden sind. Im intrinsischen Signalweg führen zelluläre Stressoren wie Ischämie, freie Radikale, Zelldehnung oder gesteigerte Druckverhältnisse zur Aktivierung der Apoptose. Neben einer Vielzahl regulatorischer Molekühle kommt der Familie der BCL2 Proteine eine wichtige Bedeutung im intrinsischen Signalweg zu: Die Kinasen BCL2 und BCL XL wirken anti-apoptotisch, werden aber durch die zellulären Stressoren in ihrer Wirkung gehemmt. Das pro-apoptotische Protein BAX (auch ein Mitglied der BCL2-Familie) wird nach Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade in die äußere Mitochondrienmembran eingelagert, wo es zu einer Permeabilitätserhöhung führt. Durch die Permeabilitätserhöhung gelangt Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma, wo es sich mit weiteren Molekülen zu Apoptosomen organisiert und Caspasen zur Autolyse der Zelle aktiviert (s. Abb. 1.1) [63, 64].



Abb. 1.1: Signalkaskade der Apoptose (modifiziert nach Jeong und Seol 2008 [63]). Im Intrinsischen Weg der Apoptose-Signalkaskade stimulieren intrinsische Reize die Translokation von BAX in die äußere Mitochondrienmembran. Gleichzeitig werden anti-apoptotische Signalwege, wie die über BCL2 und BCL XL gehemmt. BAX sorgt für eine Permeabilitätssteigerung der Mitochondrienmembran wodurch Cytochrom c in das Zytoplasma gelangt. Durch Zusammenschluss von Cytochrom c mit weiteren Faktoren wird der Apoptosomen-Komplex formiert, der durch Aktivierung der Caspase 3 die Apoptose in Gang setzt. In der extrinsischen Apoptose-Signalkaskade wirken Botenstoffe wie Cytokine und TNF pro-apoptotisch, indem sie an den Death-Rezeptor der Zelle binden. Die Caspase 8 kann über BID eine Cytochrom c-Freisetztung aus den Mitochondrien bewirken (s. a. intrinsischer Signalweg) oder durch direkte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 die zelluläre Autolyse bewirken.

1.3 Therapeutische Ansätze bei Herzinsuffizienz

Herzerkrankungen gehören zu den häufigsten internistischen Erkrankungen der westlichen Welt, weshalb ihnen ein hoher Stellenwert in der medizinischen Forschung der letzten Jahrzehnte zuteil wurde. So existieren in diesem Bereich schon zahlreiche therapeutische Ansätze. Die Therapieformen beschränken sich bisher auf eine Progredienz-Verzögerung der Erkrankung, eine kurative Intervention konnte trotz intensiver Forschung in diesem Bereich noch nicht realisiert werden.

Die aktuelle pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz ist eine stufenadaptierte Kombination von Vasodilatatoren, Diuretika, Betablockern, Antikoagulantien und inotrop-wirkenden Substanzen [65]. Ziel dieser Therapie ist eine Senkung der Nachlast (ACE-Hemmer, AT-II-Antagonisten, Nitrate, Calciumantagonisten), eine Senkung der Vorlast (Diuretika), eine Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs (β -Adrenozeptor-Blocker), Prophylaxe von koronaren Embolien und Thrombosen (Antikoagulantien), Steigerung der kardialen Kontraktilität (Digitalis, Katecholamine) und Prophylaxe des kardialen Remodelings (ACE-Hemmer, β -Adrenozeptor-Blocker, Aldosteron-Antagonisten) [66]. Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von chirurgischen Therapieverfahren, von der Revaskularisierung stenotischer Koronargefäße bis hin zur Herztransplantation.

1.4 Das Peptidhormon Intermedin

1.4.1 Die Kalzitonin-Peptidhormon-Familie

Intermedin (IMD) ist neben den Peptidhormonen Kalzitonin, Amylin, Calcitonin-gene-related Peptide (CGRP) und Adrenomedullin (AM) ein Mitglied der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie [67, 68]. Diese Peptidhormone wurden aufgrund struktureller Homologien zu einer Familie zusammengefasst, obgleich unterschiedlichste biologische Funktionen besitzen. sie Ein wichtiges gemeinsames Strukturmerkmal ist die Ausbildung eines Aminosäuren-Ringes durch Bildung einer N-terminalen Disulfidbrücke [69]. Dieser konstante Bereich scheint entscheidend für die Rezeptor-Aktivierung zu sein. Die variablen Regionen hingegen spielen vermutlich für die Bindungsaffinität zu den verschiedenen Rezeptorsubtypen eine Rolle. Aufgrund ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit sind die Mitglieder der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie zu einer Kreuz-Aktivierung ihrer Rezeptoren befähigt [70]. Die letztendlich erzielte Wirkung der einzelnen Peptidhormone wird durch das besondere Interaktions-Profil mit den einzelnen Rezeptorsubtypen, wie auch durch die Rezeptorverteilung in verschiedenen Gewebearten bestimmt. Der proteolytische Abbau dieser Peptidhormone der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie erfolgt durch Enzyme wie die Neutrale Endopeptidase [71, 72].

Aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen Wirkungen und Gensequenzen wurde eine weitere Unterteilung der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie vorgenommen. So bilden Kalzitonin (ein Regulatormolekül der Ca²⁺-Homäostase) und das, in den Glukose-Stoffwechsel und in die Regulation der Nahrungsaufnahme eingebundene, Amylin eine separate Unterklasse [73]. Die zweite Unterklasse wird durch die Hormone CGRP, AM und IMD gebildet. Sie wirken vor allem als Regulatoren des Herz-Kreislauf-, Lungen- und Nervensystems. Als Mitglied der zweiten Unterklasse wurde CGRP zuerst entdeckt. Die, von verschiedenen Genloki stammenden, Varianten CGRP-α und CGRP-ß zeigen die gleichen physiologischen Wirkungen, weisen aber eine unterschiedliche Verteilung in Geweben auf [74]. Fasst man die beiden Varianten zusammen wird CGRP vorwiegend im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. Im Gehirn ist es an Lernprozessen, an der Regulation der Nahrungsaufnahme und an der Steuerung autonomer Prozesse (z.B. kardio-vaskuläres System, Lungenfunktion, Schlaf-Wach-Rhythmus) beteiligt. Im peripheren Nervensystem wurden Effekte auf die Signalübertragung an der muskulären Endplatte, auf Entzündungsprozesse, auf den Knochenstoffwechsel, auf die Nozizeption, auf das gastro-intestinale System als auch auf das kardio-vaskuläre System beschrieben. In Letzterem wirkt es hauptsächlich vasodilatierend, positiv inotrop und chronotrop [75, 76]. Anders als CGRP ist AM ein primär humoraler Faktor, der vorwiegend auf autokrinem und parakrinem Weg wirkt [77]. Ursprünglich in Zellen des Nebennierenmarks entdeckt, wurde AM in einer Vielzahl von Geweben gefunden. So wird es vor allem im kardio-vaskulären System in Endothelien, glatten Gefäß-Muskelzellen, Fibroblasten und Herzmuskelzellen gebildet. Darüber hinaus wurde es auch in Nieren, Lungen sowie Nerven- und Fettgewebe nachgewiesen, was auf mannigfache biologische Funktionen schließen lässt. AM wirkt hauptsächlich vasodilatativ, positiv inotrop, diuretisch, anti-apoptotisch, anti-fibrotisch, antihypertroph und angiogenetisch [78, 79]. Unabhängig von einander konnten

kürzlich zwei Arbeitsgruppen bei ihren Recherchen in Gendatenbanken ein neues Mitglied der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie identifizieren. Dieses neue Peptidhormon wurde von einer Arbeitsgruppe IMD [80] von der anderen Adrenomedullin-2 (AM-2) [81] genannt. Spätere strukturelle Vergleiche ergaben, dass es sich bei IMD und AM-2 um identische Moleküle handelt. Heute hat sich die Bezeichnung IMD durchgesetzt, um den Unterschieden in Funktion und Struktur von IMD und AM Rechnung zu tragen. In Kapitel 1.4.3 soll genauer auf Struktur, Funktion und Verteilung von IMD eingegangen werden.

1.4.2 Rezeptoren und Signalwege der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie

Die physiologische Wirkung der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie wird durch zwei verwandte Rezeptorsysteme vermittelt: Dem Kalzitonin-Rezeptor (CR) und dem Kalzitonin-Rezeptor-verwandten-Rezeptor (CLR) [82]. Ein wichtiges Merkmal dieser Rezeptor-Systeme ist deren Interaktionsfähigkeit mit sogenannten Rezeptor-assoziierten-Modulierenden-Proteinen (RAMP). Zurzeit sind drei verschiedenen RAMP-Varianten bekannt: RAMP1, RAMP2 und RAMP3. Die RAMPs werden in der Zelle gemeinsam mit dem CLR oder CR exprimiert. Zuvor werden sie im endoplasmatischen Retikulum kovalent an die Rezeptoren gebunden und dann zusammen zur Zelloberfläche transportiert. Abhängig von dem gleichzeitigen Vorhandensein eines RAMP1-3, wird die Affinität des CLR oder CR zu seinen Liganden moduliert [83]. Darüber hinaus benötigen die Rezeptoren der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie zur Signaltransduktion ein weiteres Protein, das Rezeptor Komponenten-Protein (RCP) [82].

Der CR ist hochaffin für Kalzitonin, aber auch andere Vertreter der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie können in einem geringen Maß über ihn wirken. Im Gegensatz zum CLR ist der CR zur Kalzitonin-vermittelten Signaltransduktion nicht auf die Anwesenheit eins RAMP1-3 angewiesen [82]. Wird er jedoch zusammen mit einem RAMP exprimiert, bildet der CR Amylin-spezifische Rezeptoren [84].

CGRP, AM und IMD vermitteln ihre biologische Wirkungen über den CLR. Der CLR ist auf die zeitgleiche Exprimierung eines RAMPs angewiesen, um zur Zelloberfläche transportiert zu werden und mit seinen Liganden zu interagieren [85]. Dabei bilden der CLR und RAMP-1 den CGRP1-Rezeptor, der vor allem CGRP bindet aber auch Affinität zu AM und IMD besitzt (s. Abb. 1.2). Die beiden Adrenomedullin-Rezeptoren (AMR) AMR₁ und AMR₂ werden durch Bindung von CLR und RAMP-2 bzw. RAMP-3 formiert [86]. Der Hauptligand dieser Rezeptoren ist AM, aber auch IMD wird mit einer hohen Affinität gebunden. CGRP hat einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die AMR. So wirkt CGRP hauptsächlich über CGRP1-Rezeptoren und AM größtenteils über AMR₁ und AMR₂. IMD dagegen kann bei gleicher Affinität zur CGRP₁-Rezeptor wie zum AMR₁ und AMR₂ seine physiologischen Wirkungen unselektiv an den drei genannten Rezeptoren entfalten [87]. Die CLR-RAMP-Rezeptorkomplexe gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dabei bildet die konsekutiver Aktivierung einer Adenylatzyklase mit Erhöhnung des intrazellulären Botenstoffs cAMP den Hauptsignalweg [88]. Es wurden aber auch Signaltransduktionen über Phospholipase C, Phosphatidylinositol-3-(PI3-K), Guanylatzyklase (zyklisches Guanosin-Monophosphat-Kinase (cGMP)-Produktion) und Kaliumkanäle beschrieben [86].



Abb. 1.2: Die CLR-RAMP-Komplexe als Rezeptoren für CGRP, AM und IMD (modifiziert nach Bell und McDermott 2008 [86]). CGRP, AM und IMD wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptorkomplexe aus CLR, RCP und RAMP. Je nach Kombination von CLR und RAMP1-3 variiert die Ligandenaffinität und der angestoßene Signalweg. G α bzw. G β und G γ sind die drei funktionellen Untereinheiten des G-Proteins

1.4.3 Intermedin (IMD)

Das im Jahr 2004 entdeckte Peptidhormon IMD ist das jüngste Mitglied der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie. IMD ist auf dem Chromosom 22q3 kodiert und umfasst als Prä-Pro-Peptid 148 Aminosäuren (AS). Posttranslational wird Prä-Pro-IMD in drei biologisch aktive Proteine gespalten: das 47 AS umfassende IMD₁₋₄₇, das kleine IMD₈₋₄₇ und das große IMD₁₋₅₃ [80, 89]. Die aktiven Peptide weisen in vielen Tierspezies große strukturelle Homologien auf. Diese Beobachtung ist als Kennzeichen einer frühen evolutorischen Entwicklung der IMD-Peptide zu werten und deutet bereits auf eine essentielle Rolle bei der Regulation grundlegender Körperfunktionen hin [73, 81]. Strukturell besitzt IMD die charakteristischen Strukturmerkmale der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie. Dabei handelt es sich um eine N-terminale Schleife (in der Fachliteratur auch als "Loop" bezeichnet), die durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird, eine darauffolgende α -Helix und ein C-terminaler Amid-Rest [80]. IMD erfüllt mit dieser Struktur die Voraussetzungen, ähnlich dem CGRP und AM, an einem CLR-RAMP-Komplex der Zielzelle zu binden und eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang zu setzen. Dabei ist noch nicht endgültig geklärt, ob IMD über einen cAMP-, cGMP-, einen PI3-K-vermittelten oder einen bis jetzt unbekannten Signalweg wirkt [90, 91].

Seit seiner Entdeckung konnte IMD in vielen Organsystemen nachgewiesen werden. So wurden hohe Konzentrationen des Peptidhormons im kardio-vaskulären System, in Gehirn, Niere, Gastro-Intestinaltrakt, Lunge, Pankreas und Milz nachgewiesen [86, 92]. Die ausgedehnte Verbreitung im Körper legt vielfältige Wirkungen von IMD nahe. So zeigte sich eine Beteiligung von IMD an der neuronalen Regulation von Elektrolyt- und Wasserhaushalt, Nahrungsaufnahme, Stresshormonsekretion (über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse) und sexueller Funktionen, aber auch bei der Steuerung des sympathischen Nervensystems [93, 94]. Eine Funktion von IMD Neurotransmitter wird nach diesen Erkenntnissen diskutiert [86]. als Extraneuronal bewirkt IMD in der Niere eine Steigerung des renalen Blutflusses, der Natrium-Ausscheidung und Urinproduktion [95]. Im Gastro-Intestinaltrakt ist IMD an der Regulation der Verdauung beteiligt und hemmt dort unter anderem die Entleerung des Magens [90]. Aber auch im kardio-vaskulären System ist IMD vertreten. Dort kommt es vor allem in Endothelzellen, im Blutplasma und in geringer Konzentration auch im adulten Myokard vor. Dabei scheint es je nach Lokalisation über endokrine oder parakrine Wege zu wirken. IMD ist, ähnlich dem CGRP und AM, ein potenter Blutdruck-Senker im systemischen und pulmonalen Kreislauf [96]. Darüber hinaus zeigten mehrere Arbeitsgruppen, dass IMD einen protektiven Effekt auf Endothelien besitzt [97, 98]. Im Herzen wirkt IMD vor allem positiv chronotrop [99]. IMD besitzt des Weiteren eine direkte Wirkung auf die Kontraktilität des Myokards, wobei sowohl positiv inotrope [100] als auch negativ inotrope Effekte [101] beobachtet werden konnten. 2005 zeigte Pan et al., dass IMD vermehrt in hypertrophiertem Myokard exprimiert wird [101]. Diese Entdeckung deutet auf eine Beteiligung des Peptidhormons IMD an der Pathogenese vieler Herzerkrankungen, die mit einer Myokardhypertrophie einhergehen (z. B. die Herzinsuffizienz), hin. Besteht ein solcher Zusammenhang könnte IMD in Zukunft zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze bei Herzinsuffizienz beitragen.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Die Entdeckung der vermehrten Expression des Peptidhormons IMD bei Herzinsuffizienz und dessen bis jetzt noch ungeklärte Effekte auf das hypoxiegeschädigte Myokard gaben Anlass die Funktionen dieses Peptidhormons im postischämischen Myokard näher zu untersuchen. Von besonderem Interesse waren dabei:

- 1. Wie verändert IMD₁₋₄₇ die Herzfunktion in postischämischen Ratten-Herzen?
- 2. Wie verändert IMD₁₋₄₇ die Herzfunktion in normoxen Ratten-Herzen?
- 3. Wirkt IMD₁₋₄₇ über einen cAMP-abhängigen intrazellulären Signalweg?
- 4. Wie beeinflusst IMD₁₋₄₇ die Expression ausgewählter Gene des rechten als auch linken Ventrikels, die an der Regulation der Herzfunktion, der Myozytenhypertrophie und der Apoptose beteiligt sind?

2. Materialien

2.1 Chemikalien

5 x RT Pu	uffer	Invitrogen, Karlsruhe
Chlorofor	m	Merck, Darmstadt
Dibutyryl-	-cyclo-AMP	Boehringer Mannheim, Mannheim
Diethyleth	ner	Roth, Karlsruhe
DTT		Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol		Riedel-de Haën, Seelze
Intermedi	in ₁₋₄₇	Bachem, Bubendorf Schweiz
Isopropar	nol	Riedel-de Haën, Seelze
M-MLV R	everse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Nukleotid	le	
	dATP	Invitrogen, Karlsruhe
	dCTP	Invitrogen, Karlsruhe
	dGTP	Invitrogen, Karlsruhe
	dTTP	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo(dT)	15	Roche, Grenzach-Wyhlen
peqGOL	D TriFast	Peqlab, Erlangen

RNAse InhibitorPromega, MannheimSYBR-Green SupermixBioRad, München

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

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Langendorff-Herz

Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Institutes, Universität Gießen
Digitale Analysewaage	Kern & Sohn, Balingen
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Wasser Demineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn

2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Allegra Kühlzentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton USA
Dispergierer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Microfuge 18	Beckman Coulter, Fullerton USA
Thermalcycler	Techne, Burlington USA
Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Wien AUS

2.2.3 Real-Time-PCR

iCycler	BioRad, München
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Cryo-Röhrchen	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

2.2.5 Software

Excel	Microsoft
iCycler IQ V 3.0a	BioRad, München
Phylab Mess- und Auswertesoftware	National Instruments, München
Beacon Designer	Premier Biosoft Int., Palo Alto USA

3. Methoden

3.1 Langendorff-Herz

3.1.1 Versuchstiere

Die für die Versuche benötigten Herzen wurden aus ca. 3 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten isoliert. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet und unter freiem Zugang zu Wasser und Nahrung (Standard-Futter Altromin) gehalten.

3.1.2 Präparation

Vor der Präparation wurden die Ratten durch Inhalation von Diethylether narkotisiert. Die Präparation erfolgte zeitgleich bei zwei Tieren, da die Langendorff-Experimente als Doppelversuche (in jedem Versuch stand ein behandeltes Herz einem Kontroll-Herz gegenüber) angelegt waren.

Nachdem man die Peritonealhöhle eröffnet hatte, wurde die Thoraxwand mit zwei Schnitten in der Axillarlinie eröffnet und mit einem weiteren Schnitt das Diaphragma durchtrennt. Nun wurde das Herz-Lungen-Paket möglichst weit kranial, unter Schonung des Aortenbogens, aus dem Thorax herausgeschnitten und zur Verlangsamung des Stoffwechsels in gekühlte Kochsalzlösung (4°C) getaucht. Nachdem die Herzaktion in der kalten Lösung schnell zum Stillstand kam, folgte unverzüglich die Entfernung der einzelnen Lungenflügel. Als nächstes wurde der Thymus entfernt, um den Aortenbogen freizulegen und ihn zwischen dem Abgang der Arteria carotis communis sinistra und der Arteria subclavia sinistra zu durchtrennen. Nachdem die Venae pulmonales an ihrer Einmündung abgesetzt wurden (um einen Zugang zum linken Vorhof zu schaffen), konnte man das Herz in die Langendorff-Apparatur einhängen.

3.1.3 Perfusionslösung

Die Herzen wurden währende des Langendorff-Versuches mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (mKHL) perfundiert. Zur Konstanthaltung des pH-Wertes der mKHL wurde sie kontinuierlich mit Carbogen begast. Die zu Untersuchende Substanze, IMD₁₋₄₇ bzw. Dibutyryl-cyclo-AMP (db-cAMP), wurden in mKHL gelöst und in einer zehnminütigen Phase verabreicht (siehe Abb. 3.2).

Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung:

NaCl	140 mM	
KCI	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	

3.1.4 Versuchsapparatur

Zur besseren Verständlichkeit des Versuchsaufbaus siehe auch Abb. 3.1.

Das sehr temperatursensitive Herz wurde über eine Kanüle in der Aorta ascendens fixiert und in eine, bei 37°C temperierte, Wärmekammer eingehängt.

Die Versorgung des Herzens mit Perfusat erfolgte, bei konstantem Fluss, retrograd über die kanülierte Aorta ascendens. Der Fluss wurde, während der Stabilisierungsphase, so eingestellt, dass man für diesen Zeitraum einen konstanten Perfusionsdruck zwischen 47 und 50 mmHg erreichte. Für das restliche Experiment blieb der Fluss unverändert. Die Perfusionslösung wurde mittels eines Wärmetauschers auf 37°C erwärmt. Als Perfusat diente eine saline mKHL, die zur Regulierung des pH-Wertes und Aufsättigung mit Sauerstoff kontinuierlich mit Carbogen begast wurde. Zum Einwaschen, der zu

untersuchenden Substanz IMD₁₋₄₇ bzw. db-cAMP (gelöst in mKHL), wurde ein weiteres Gefäß, über einen Dreiwegehahn mit dem System verbunden.

Um die linksventrikulären Druckveränderungen aufzeichnen zu können, wurde ein Latex-Ballon vom eröffneten linken Vorhof aus in den linken Ventrikel vorgeschoben. Nachdem der Ballon bis zu einem enddiastolischen Druck von 10 mmHg gefüllt wurde, konnte man ihn mit einem Druckaufnehmer verbinden. Durch diesen intraventrikulären Ballon wurden die Herzfrequenz und die linksventrikuläre Druckamplitude (LVDP) gemessen.

Mithilfe eines Pacers konnte man, für bestimmte Messwerte, die Herzfrequenz auf einen Wert von 240 Schlägen pro Minute (bpm) normieren, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dafür wurde eine Elektrode an die in die Aorta eingebundene Metallkanüle befestigt, die andere an der Herzspitze.



Abb. 3.1: Langendorff-Apparatur (modifiziert nach Dahnken 2007 [102])

3.1.5 Erfasste Parameter im Langendorff-Versuchsmodell

Zur Erfassung der Herzfunktion wurden die Herzfrequenz (HF), der linksventrikuläre systolische Druck (LVPsys), der linksventrikuläre diastolische Druck (LVPdias) sowie der koronare Perfusionsdruck (kPP) zu festgelegten Zeitpunkten innerhalb des Versuchprotokolls aufgezeichnet. Aus der Differenz der erfassten Parameter LVPsys und LVPdias wurde rechnerisch die LVDP. Tabelle 3.1 zeigt die erfassten Parameter.

Zur Beurteilung der Entwicklung eines kardialen Ödems wurde vor Versuchsbeginn das Körpergewicht (KG) und nach Versuchsende das Herzgewicht (HW) gemessen und der prozentuale Anteil des HW am Gesamtgewicht ermittelt.

Bezeichnung	Formelzeichen	Einheit	
Herzfrequenz	HF	bpm	
Linksventrikulärer systolischer Druck	LVPsys	mm Hg	
Linksventrikulärer diastolischer Druck	LVPdias	mm Hg	
Linksventrikuläre Druckentwicklung	LVDP	mm Hg	
Koronarer Perfusionsdruck	kPP	mm Hg	

 Tabelle 3.1: Erfasste Parameter im Langendorff-Versuchsmodell

3.1.6 Versuchsprotokoll

Eine Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen befindet sich in Abb. 3.2. Die Experimente wurden in 2 Versuchsreihen durchgeführt.

Die erste Versuchsreihe fand unter normoxen Bedingungen statt. Die Herzen wurden in drei unterschiedlichen Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bekam für 10 Minuten eine 0,1 nM IMD-haltige mKHL (NX IMD low) und die zweite Gruppe eine 100 nM IMD-haltige mKHL (NX IMD high). Eine dritte Gruppe diente als Kontrolle und wurde durchgängig mit der mKHL ohne Zusätze perfundiert.

In der zweiten Versuchsreihe wurden alle Herzen einer globalen Ischämie von 45 Minuten ausgesetzt. Anschließend wurden diese Herzen in vier weitere Gruppen unterteilt, wobei die erste Gruppe postischämisch für 10 Minuten mit einer 0,1 nM IMD-haltigen mKHL (IR IMD low) perfundiert wurde, die zweite Gruppe wurde mit 100 nM IMD-haltigen mKHL (IR IMD high) perfundiert. Die dritte Gruppe bekam anstelle der IMD-haltigen mKHL eine 100 nM db-cAMP-haltige mKHL (IR cAMP). Der vierten Gruppe wurden, als Kontrolle, die mKHL ohne Zusätze verabreicht.
Um eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente zu gewährleisten, wurden sie alle nach einem einheitlichen Schema, mit den oben beschriebenen Modifikationen durchgeführt. Dieses Schema begann mit einer ca. 20minütigen Stabilisierungsphase. Danach folgte eine 45minütigen Ischämie mit 30minütiger Reperfusion bei den Gruppen mit globaler Ischämie. Die normoxen Gruppen wurden in dieser Zeit (75 Minuten) konstant durchperfundiert. Nach einer anschließenden 10minütigen Periode, in der die jeweilige Substanz, IMD, db-cAMP oder zur Kontrolle die mKHL ohne Zusätze, verabreicht wurde, schloss sich noch eine weitere 80minütige Perfusionsphase an.

1. Versuchsreihe (Normoxie)



Abb. 3.2: Versuchsgruppen-Übersicht

Die Herzen wurden in der Stabilisierungsphase und am Ende für eine Minute gepacet (bei 240 bpm), um normierte Werte zur Bestimmung der Recovery (z.B. LVDP_{Versuchs-Ende} / LVDP_{Versuchs-Anfang}) zu erhalten.

3.1.7 Probenverarbeitung

Nachdem die Versuche in der Langendorff-Apparatur abgeschlossen waren, wurden die Herzen für die weitere Untersuchung vorbereitet. Dafür wurde die Aorta ein weiteres Mal durchtrennt, um das Herz aus der Apparatur zu nehmen. Vor der sich anschließenden Präparation, wurden die Herzen gewogen. Danach wurden die Vorhöfe entfernt und der rechte und linke Ventrikel separat in Cryo-Röhrchen durch flüssigen Stickstoff schockgefroren. Später wurden die Proben bei -80°C eingelagert.

3.2 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation aus den tief gefrorenen Ventrikeln wurde die peqGOLD-TriFast-Lösung verwendet. Das Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (peqLab Biotechnologie GmbH). Das entstandene RNA-Pellet wurde in 50 µl sterilem, RNAse freiem Wasser resuspendiert.

Für die sich später anschließende Real-Time-PCR mussten die Proben auf RNA-Konzentrationen von 0,2 µg / µl verdünnt werden. Dafür wurde die RNA-Quantität photometrisch bestimmt (Ultrospec 2000) und mittels sterilem, RNAse freiem Wasser um den gewünschten Faktor verdünnt. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung der Proben bei -20°C.

3.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese der komplementäre DNA (cDNA) wurden 5 µl der verdünnten RNA-Lösung (0,2 µg RNA / µl) verwendet. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die RNA-Denaturierung für 10 Minuten bei 60°C im Thermalcycler.

Anschließend wurde der Mastermix, bestehend aus 2 μ l 5x RT Puffer, 1 μ l Oligo(dT)₁₅, 0,5 μ l dNTP-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,2 μ l RNAse Inhibitor, 0,5 μ l DTT, und 0,3 μ l M-MLV Reverse Transkriptase, der Probe zugegeben. Dieses Gemisch wurde kurz gevortext und zentrifugiert.

Die Reverse Transkription fand bei 37°C für 1h statt und wurde durch eine fünfminütige Phase bei 95°C gestoppt.

Die transkribierte cDNA wurde mit sterilem Wasser auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

3.4 Real-Time-PCR

3.4.1 Das Verfahren der Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR diente zur Quantifizierung der Veränderungen, die auf Ebene der Genexpression durch Applikation von IMD bzw. db-cAMP erwartet wurden. Bei der Real-Time-PCR wird die Produktentstehung in Echtzeit verfolgt.

Der zur Detektion der amplifizierten doppelsträngigen DNA (dsDNA) eingesetzte Farbstoff war SYBR-Green. Durch die Bindung des Farbstoffs in die dsDNA wird seine Fluoreszenz stark erhöht. Dieses Fluoreszenzsignal ist proportional zur gebildeten dsDNA. Dieses Signal wurde einmal pro Zyklus, jeweils am Ende der Elongationsphase, detektiert.

Zur Kontrolle, dass es sich bei den gebildeten Produkten auch um die spezifischen Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Stücke handelt, war es erforderlich eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Hierbei kommt es durch Erhitzen zur Denaturierung der PCR-Produkte. Da sich SYBR-Green nur an dsDNA und nicht an einzelsträngige DNA anlagern kann, kommt es zum Zeitpunkt der Denaturierung zu einem steilen Fluoreszenzabbruch. Unspezifische Produkte haben eine niedrigere Schmelztemperatur als die gesuchten DNA-Fragmente und können so detektiert werden. Dieser spezifische Schmelzpunkt gibt außerdem Aufschluss über die Produktlänge.

Zur Bestimmung der Expression des Ziel-Gens muss dieses auf ein zweites ubiquitär und homogen exprimiertes Gen (Housekeeping-Gen) bezogen werden. Die unterschiedliche Vorbehandlung der Herzen mit IMD₁₋₄₇, db-cAMP oder mit reinem Perfusionspuffer durfte sich nicht auf die Expression dieses

Housekeeping-Gens auswirken. Das für unsere Versuche am besten geeignete Housekeeping-Gen war die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT).

3.4.2 Probenvorbereitung

Für die Real-Time-PCR wurde jeweils ein Ansatzvolumen von 20 µl benötigt. Dieses bestand aus 3 µl cDNA und 17 µl Mastermix (10 µl Sybr-Green Supermix, 0,3 µl Forward Primer, 0,3 µl Reverse Primer, 6,4 µl steriles Wasser). Eine ausführliche Liste der Primer befindet sich in Kapitel 2.4.3 "PCR-Programme".

Für jede Probe wurden zwei Ansätze pipettiert und im iCycler gemessen.

3.4.3 PCR-Programme

Die PCR wird zur spezifischen Amplifizierung einzelner Genabschnitte verwendet.

Die Reaktion startete mit einer fakultativen Vorlaufphase, die zur Enzymaktivierung und Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge dient. Die Amplifizierung erfolgt anschließend in drei sich zyklisch wiederholenden temperaturabhängigen Schritten.

1) Denaturierung

Das Reaktionsgemisch wir auf 95°C erhitzt um die komplementären DNA-Stränge voneinander zu trennen.

2) Annealing

Zur Hybridisierung von Primer und komplementärer DNA wird die Temperatur in diesem Schritt auf 50 bis 65°C gesenkt (abhängig von der Länge und Struktur des Primerpaares).

3) Elongation

Die thermostabile Polymerase hat bei 72° C ihr Temperaturoptimum und synthetisiert den komplementären DNA-Strang.

Durch Wiederholen dieser drei Schritte wird die exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts erreicht.

Es wurden folgende PCR-Programme verwendet:

^{1.} Gebrauchsverdünnung der Primer = 10 μ M

^{2.} Die spezifischen Primer wurden nach der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit dem Beacon Designer konstruiert

ANP-Gen

ANP $^{1, 2}$ – Primer:

Forward 5'-ATG GGC TCC TTC TCC ATC AC-3' Invitrogen, Karlsruhe Reverse 5'-TCT TCG GTA CCG GAA GCT G-3' Invitrogen, Karlsruhe Amplikon-Länge: 456 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)
45x {	30sec 58°C	(Annealing)
Ĺ	30sec 72°C	(Elongation)
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)

BAX-Gen

BAX ^{1, 2} – Primer: Forward 5'-ACT AAA GTG CCC GAG CTG ATC-3' Invitrogen, Karlsruhe Reverse 5'-CAC TGT CTG CCA TGT GGG G-3' Invitrogen, Karlsruhe Amplikon-Länge: 141 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)
45x {	30sec 58°C	(Annealing)
Ĺ	30sec 72°C	(Elongation)
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)

BCL2-Gen

BCL2^{1, 2} – Primer:

Forward 5'-ATC TTC TCG TTC CAG CCT GA-3' GibcoBRL, Eggenstein Reverse 5'-TCA GTC ATC CAC AGA GCG AT-3' GibcoBRL, Eggenstein Amplikon-Länge: 707 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)
45x	30sec 56°C	(Annealing)
Ĺ	30sec 72°C	(Elongation)
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)

BCL XL-Gen

BCL XL $^{1, 2}$ – Primer:

Forward 5'-ATG AAC TCT TTC GGG ATG GG-3' GibcoBRL, Eggenstein Reverse 5'-GAT CCA CAA AAG TGT CCC AG-3' GibcoBRL, Eggenstein Amplikon-Länge: 190 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)
45x {	30sec 65°C	(Annealing)
l	30sec 72°C	(Elongation)
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)

BNP-Gen

BNP ^{1, 2} – Primer:

Forward 5'-ATG ATT CTG CTC CTG CTT TTC C-3' Invitrogen, Karlsruhe Reverse 5'-TCT GCA TCG TGG ATT GTT CTG-3' Invitrogen, Karlsruhe Amplikon-Länge: 100 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)
45x	30sec 58°C	(Annealing)
Ĺ	30sec 72°C	(Elongation)
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)

<u>HPRT-Gen</u>

HPRT ^{1, 2} – Primer: Forward 5'-CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT-3' Invitrogen, Karlsruhe Reverse 5'-CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC-3' Invitrogen, Karlsruhe Amplikon-Länge: 131 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)	
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)	
45x {	30sec 63°C	(Annealing)	
Ĺ	30sec 72°C	(Elongation)	
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)	

ODC-Gen

ODC $^{1, 2}$ – Primer:

Forward 5'-GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA-3' Invitrogen, Karlsruhe Reverse 5'-AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG-3' Invitrogen, Karlsruhe Amplikon-Länge: 304 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)
45x {	30sec 58°C	(Annealing)
Ĺ	30sec 72°C	(Elongation)
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)
		`

SERCA-Gen

SERCA ^{1, 2} – Primer: Forward 5'-CAG GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' Invitrogen, Karlsruhe Reverse 5'-AGG AGA TGA GGT AGC CGA TGA A-3' Invitrogen, Karlsruhe Amplikon-Länge: 368 bp

1x	2min 95°C	(Vorlaufphase)	
ſ	30sec 95°C	(Denaturierung)	
45x	30sec 57°C	(Annealing)	
Ĺ	30sec 72°C	(Elongation)	
100x	10sec 50°C +	(Schmelzkurve)	

3.4.4 Auswertung der Real-Time-PCR

Die Auswertung fand über die 2 $^{-(\Delta\Delta CT)}$ –Methode [103] statt. Dafür wurde als erstes für jede Kurve der Schnittpunkt mit dem Threshold berechnet. Dieser Wert wird auch als Threshold Cycle-Wert (TC-Wert) bezeichnet. Der Threshold ist das Zehnfache des Mittelwerts der Standardabweichungen aller Kurven zwischen dem zweiten und zehnten Zyklus. In diesem Bereich ist noch kein signifikanter Anstieg der einzelnen Kurven nachzuweisen.

Zur Bestimmung der relativen Expression wurde der TC-Wert des Ziel-Gens auf den TC-Wert des Housekeeping-Gens HPRT bezogen:

TC (Ziel-Gen) — TC (HPRT) = Δ CT

Als nächstes erfolgte der Vergleich der ΔCT-Werte von der mit IMD oder db-cAMP behandelten Gruppe mit der entsprechenden Kontrollgruppe:

Δ CT (Intermedin / cAMP) — Δ CT (Kontrolle) = $\Delta\Delta$ CT

Der $\Delta\Delta$ CT-Wert musste nun noch in die relative Expressionsformel eingesetzt werden:

Relative Expression = $2^{-(\Delta\Delta CT)}$

Die relative Expression gibt die n-fache Expressionsänderung des Zielgens, von behandeltem zu nicht behandeltem Herzen, an.

3.5 Statistische Auswertung

Bei den Akutwirkungen im Langendorff-Versuch wurden die Messwerte zu Beginn der 10minütigen IMD₁₋₄₇- bzw. db-cAMP-Substitution gleich 100% gesetzt und die Veränderungen nach 5 und 10 Minuten auf diese 100% Referenz bezogen. Die so gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht.

Zur Bestimmung der Recovery-Daten (funktionelle Parameter der Herzen am Ende des Versuchs bezogen auf die Ausgangswerte) wurde die prozentuale Veränderung der Endwerte im Vergleich zu den Anfangswerten berechnet. Anschließend wurde mittels Mann-Whitney-U-Tests nach signifikanten Unterschieden gesucht. Da einige Herzen das Pacen (Stimulation mittels Schrittmacher) nicht tolerierten und in ein Kammerflimmern übergingen, mussten diese von der Auswertung ausgeschlossen werden. Folgende Herzen wurden ausgeschlossen:

NX Kontroll-Gruppe	3 Herzen
NX IMD low-Gruppe	1 Herz
NX IMD high-Gruppe	0 Herzen
IR Kontrolle-Gruppe	1 Herz
IR IMD low-Gruppe	1 Herz
IR IMD high-Gruppe	2 Herzen
IR cAMP-Gruppe	2 Herzen

Zur Analyse des postischämischen Herzödems wurde zuerst der prozentuale Anteil des Herzgewichtes (HW) am Körpergewicht (BW) bestimmt (HW/BW-Wert). Danach wurde der HW/BW-Wert der normoxen Kontrolle auf 100 % gesetzt und die Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Die Untersuchung der so gewonnenen Daten auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Duncan-Test.

Die Expressionswerte wurden durch Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Duncan-Test auf signifikante Unterschiede geprüft.

Expressions-, Recovery-Daten sowie die ischämisch bedingten Funktionsänderungen wurden als Box- und Whiskers-Plots dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen am Langendorff-Herz

Ziel der Versuche war die Wirkung des Peptidhormons Intermedin (IMD) auf ein durch Ischämie geschädigtes Myokard zu untersuchen. Dafür wurden die in Kapitel 3.1.5 bereits beschriebenen hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (HF), linksventrikulärer diastolischer Druck (LVPdias), die linksventrikulär systolischer Druck (LVPsys), linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP), und der koronare Perfusionsdruck (kPP) verwendet. Zusätzlich dazu wurde auch die Ausbildung eines Herzödems zwischen den einzelnen Gruppen verglichen.

Zur genauen Quantifizierung der Effekte von IMD₁₋₄₇ auf das Myokard wurden neben Versuchen unter normoxen Bedingungen auch Versuche mit 45minütiger Ischämie durchgeführt. Darüber hinaus wurden auch zwei unterschiedliche IMD₁₋₄₇-Konzentrationen verwendet (0,1 nM und 100 nM) um sicherzustellen, dass die minimale Wirkkonzentration überschritten wurde. Für eine bessere Vergleichbarkeit der erhobenen Daten wurde noch eine Gruppe mit 45minütiger Ischämie und db-cAMP hinzugefügt, da bei dieser Substanz der Wirkmechanismus bekannt war.

4.1.1 Versuche unter normoxen Versuchsbedingungen

Für diese Versuchreihe wurde 26 Herzen ausgewertet, die in 3 Gruppen aufgeteilt waren. Dabei bestanden die Gruppen NX Kontrolle und NX IMD low aus je 9 Herzen, die NX IMD high-Gruppe aus 8 Herzen:

Gruppe	Behandlung	Abkürzung
Gruppe 1	unbehandelte Kontrollgruppe	NX Kontrolle
Gruppe 2	mit 0,1nM IMD ₁₋₄₇ behandelt	NX IMD low
Gruppe 3	mit 100nM IMD ₁₋₄₇ behandelt	NX IMD high

Alle Herzen wurden anstelle der 45minütigen "No-Flow"-Ischämie, konstant durchperfundiert (s. Kap. 3.1.6 Versuchprotokolle).

4.1.1.1 Akutwirkungen

Die akuten Effekte beziehen sich auf die hämodynamischen Veränderungen die während des 10minütigen Intervalls der IMD-Substitution aufgetreten sind. Dabei wurden die Werte zu Beginn dieses Intervalls gleich 100% gesetzt und die gemessenen Werte bei 5 und 10 Minuten auf diesen Referenzwert von 100% bezogen.

Die Daten zeigten in der Gruppe NX IMD low eine signifikante Reduktion der HF zum Zeitpunkt t = 5 min (p-Wert_{5 min}: 0,031) und t = 10 min (p-Wert_{10min}: 0,019). In der Gruppe NX IMD high zeigte sich eine Erhöhung der HF zum Zeitpunkt t = 5 min (p-Wert_{5min}: 0,021). Zum Zeitpunkt t = 10 min derselben Gruppe zeigte sich keine signifikante Veränderung der HF (s. Abb. 4.1 und Tabelle 4.1).

Die Daten der NX IMD low-Gruppe lieferten keinen Hinweis auf eine Veränderung des LVPdias. In der NX IMD high-Gruppe war der LVPdias zum Zeitpunkt t = 5 min signifikant ($p_{5 min} = 0,038$) gegenüber der Kontrolle gesenkt. Der Wert zum Zeitpunkt T = 10 min derselben Gruppe war zwar ebenso vermindert, jedoch aufgrund einer größeren Streuung nicht mehr signifikant (p-Wert_{10min}: 0,28) (s. Abb. 4.1 und Tabelle 4.1).

In der IMD low-Gruppe lieferten die Daten keinen Anhalt für einen signifikante Veränderung des LVPsys. Die Daten zeigten in der NX IND high-Gruppe zum Zeitpunkt t = 5 min und t = 10 min eine signifikante bzw. hochsignifikante Reduktion des LVPsys (p-Wert_{5min}: 0,011 und p-Wert_{10min} = 0,006) (s. Abb. 4.1 und Tabelle 4.1).

Die gesammelten Daten lieferten keinen Hinweis auf eine Veränderung des LVDP in der NX IMD low-Gruppe. Die Messwerte der Gruppe NX IMD high Zeigten eine signifikante bzw. hoch signifikante Reduktion des LVDP zum Zeitpunkt t = 5 min und t = 10 min (p-Wert_{5min}: 0,021 und p-Wert_{10min}: 0,008) (s. Abb. 4.1 und Tabelle 4.1).

In der NX IMD low. Gruppe gab es keinen Anhalt für eine Veränderung des kPP. Dagegen wiesen die Daten der NX IMD high-Gruppe eine signifikante Reduktionen des kPP zum Zeitpunkt t = 5 min und t = 10 min auf (p-Wert_{5 min:} 0,011 und p-Wert_{10 min:} 0,021) (s. Abb. 4.1 und Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Verlauf der Herzfunktion im 10min-IMD-Perfusionsintervall dernormoxenVersuchsgruppen.DieTabellezeigtdieMittelwerteunddieStandardabweichungenderHerzfunktionsparameterderprozentualeAngabenbezogenauf die Ausgangswerte (* p-Wert: <0,05).</td>

Versuchsgruppe	0 min	5 min	10 min
Herzfrequenz (HF)			
NX Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	107,6 ± 14,1 %	110,3 ± 14,3 %
NX IMD low	100,0 ± 0,0 %	95,8 ± 10,3 % *	99,3 ± 4,1 % *
NX IMD high	100,0 ± 0,0 %	129,4 ± 33,1 % *	124,0 ± 32,2 %
Linksventrikulärer o	liastolischer Druck	(LVPdias)	
NX Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	96,0 ± 16,1 %	92,2 ± 32,1 %
NX IMD low	100,0 ± 0,0 %	97,8 ± 45,4 %	85,1 ± 37,7 %
NX IMD high	100,0 ± 0,0 %	66,3 ± 28,5 % *	66,2 ± 40,1 %
Linksventrikulärer systolischer Druck (LVPsys)			
NX Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	94,1 ± 14,8 %	94,8 ± 7,6 %
NX IMD low	100,0 ± 0,0 %	99,2 ± 7,6 %	95,4 ± 7,3 %
NX IMD high	100,0 ± 0,0 %	80,5 ± 10,5 % *	78,4 ± 11,7 % *
Linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP)			
NX Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	94,5 ± 14,3 %	94,4 ± 6,7 %
NX IMD low	100,0 ± 0,0 %	98,6 ± 8,3 %	95,5 ± 6,9 %
NX IMD high	100,0 ± 0,0 %	81,6 ± 10,7 % *	79,5 ± 11,3 % *
Koronarer Perfusionsdruck (kPP)			
NX Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	103,3 ± 13,1 %	101,7 ± 14,2 %
NX IMD low	100,0 ± 0,0 %	100,8 ± 10,1 %	104,8 ± 12,9 %
NX IMD high	100,0 ± 0,0 %	71,6 ± 24,7 % *	72,5 ± 25,1 % *





Abb. 4.1: Verlauf der Herzfunktion im 10min-IMD-Perfusionsintervall der normoxen Versuchsgruppen. Dargestellt sind Mittelwerte (MW) ± Standarddifferenz (SD) der Herzfunktionsparameter der Gruppen aus normox perfundierten Herzen in Prozent der Ausgangswerte (* p-Wert: <0,05).

4.1.1.2 Recovery-Daten

Recovery-Daten sind die funktionellen Parameter der Herzen am Ende des Versuchs bezogen auf die der Ausgangswerte. Hier wurden der LVPdias, der LVPsys, LVDP und der kPP betrachtet. Alle Werte, die sich auf die HF beziehen, wurden nicht betrachtet, da die HF bei Versuchbeginn und -ende mittels eines Schrittmachers auf 240 bpm normiert wurde.

Die Recovery-Daten wurden als prozentuale Angaben bezogen auf die Ausgangswerte zu Versuchbeginn dargestellt.

Die Daten lieferten keinen Hinweis auf signifikante Veränderungen des LVPdias, des LVPsys, des LVDP in den Gruppen NX IMD low und NX IMD high.

Die Daten zeigten nur in der Gruppe NX IMD high eine signifikante Verringerung des kPP (p-Wert: 0,029) (s. Abb. 4.2 und Tabelle 4.2).

Tabelle4.2: LangzeiteffekteeinerkurzzeitigenIMD1-47SubstitutionindennormoxenVersuchsgruppen.DieTabellezeigtdieMittelwerteunddieStandardabweichungenderHerzfunktionsparameterderdreiVersuchgruppenalsprozentualeAngabe.

Versuchsgruppe	Recovery	Versuchsgruppe	Recovery
LVPdias		LVDP	
NX Kontrolle	30,9 ± 246,9 %	NX Kontrolle	96,0 ± 32,9 %
NX IMD low	95,0 ± 207,7 %	NX IMD low	64,9 ± 29,8 %
NX IMD high	-62,6 ± 201,3 %	NX IMD high	92,7 ± 25,9 %
LVPsys		kPP	
NX Kontrolle	91,9 ± 26,4 %	NX Kontrolle	224,8 ± 65,7 %
NX IMD low	67,6 ± 22,2 %	NX IMD low	244,9 ± 50,5 %
NX IMD high	84,9 ± 24,4 %	NX IMD high	155,0 ± 30,5 % *





Abb. 4.2: Langzeiteffekte einer kurzzeitigen IMD₁₋₄₇ **Substitution in den normoxen Versuchsgruppen.** Darstellt sind Box- und Whiskers-Plots die den Median und die 25% und 75% Intervalle der Endwertes der verschiedenen Herzfunktionsparameter in Prozent des Ausgangswertes zu Versuchsbeginn zeigen (* p-Wert: <0,05, ° Ausreißer).

4.1.2 Versuche unter ischämischen Versuchsbedingungen

Für diese Versuchreihe wurde 32 Herzen ausgewertet, die in 4 Gruppen zu je 8 Herzen aufgeteilt waren:

Gruppe	Behandlung	Abkürzung
Gruppe 1	unbehandelte Kontrollgruppe	IR Kontrolle
Gruppe 2	mit 0,1 nM IMD ₁₋₄₇ behandelt	IR IMD low
Gruppe 3	mit 100 nM IMD ₁₋₄₇ behandelt	IR IMD high
Gruppe 4	mit 100 nM db-cAMP behandelt	IR cAMP

Die Herzen dieser Gruppen wurden einer "No-Flow"-Ischämie von 45 Minuten (Ischämie, bei der der Koronarfluss gänzlich zum erliegen kommt), gemäß den Versuchprotokollen (s. Kap. 3.1.6 Versuchprotokolle), ausgesetzt.

4.1.2.1 Akutwirkungen

Die akuten Effekte beziehen sich auf die hämodynamischen Veränderungen die während des 10minütugen Intervalls der IMD₁₋₄₇- bzw. dbcAMP-Substitution aufgetreten sind. Dabei wurden die Werte zu Beginn dieses Intervalls gleich 100% gesetzt und die gemessenen Werte bei 5 und 10 Minuten auf diesen Ausgangswert von 100% bezogen.

Die gesammelten Daten lieferten keinen Hinweis auf eine signifikante Veränderung der HF in den Gruppen IR IMD low, IR IMD high und IR cAMP, obwohl in den Gruppen IR IMD high und IR cAMP ein Trend zu einer gesteigerten HF bestand (s. Abb. 4.3 und Tabelle 4.3).

In der IR IMD low- und IR cAMP-Gruppe lieferten die Daten keinen Anhalt für eine Veränderung des LVPdias. Die zu den Zeitpunkten t = 5 min und t = 10 min erhobenen Daten der IR IMD high-Gruppe, zeigten eine hoch bzw. höchst signifikante (p-Wert_{5min}: 0,007 und p-Wert_{10min}:< 0,001) Reduktion des LVPdias gegenüber der Kontrolle. (s. Abb. 4.3 und Tabelle 4.3).

Die Daten der Gruppe IR IMD low zeigten eine signifikante Reduktion das LVPsys zum Zeitpunkt t = 10 min (p-Wert_{10min}: 0,038). In der Gruppe IR IMD high konnte zu beiden Zeitpunkten (t = 5 min und t = 10 min) eine höchst signifikante Reduktionen (p-Wert_{5min}: <0,001 und p-Wert_{10min}: <0,001) des LVPsys gemessen werden. Die Messergebnisse lieferten keinen Hinweis auf eine Veränderung des LVPsys in der Gruppe IR cAMP (s. Abb. 4.3 und Tabelle 4.3).

Es konnte keine Veränderung des LVDP in den Gruppen IR IMD low und IR cAMP gefunden werden. In der Gruppe IR IMD high konnte zu den Zeitpunkten t = 5 min und t = 10 min jeweils eine signifikante bzw. hoch signifikante (p-Wert_{5min}: 0,038 und p-Wert_{10min}: 0,010) Reduktion des LVDP registriert werden (s. Abb. 4.3 und Tabelle 4.3).

In den Gruppen IR IMD low und IR cAMP konnten keine Veränderungen des kPP gefunden werden. Dagegen zeigten die Messwerte der IR IMD high Gruppe eine höchst signifikante Reduktion (p-Wert_{5min}: <0,001 und p-Wert_{10min}: <0,001) des kPP zu den Zeitpunkten t = 5 min und t = 10 min. (s. Abb. 4.3 und Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Verlauf der Herzfunktion im 10min-IMD/db-cAMP-Perfusionsinterva	
der ischämischen Versuchsgruppen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und die	e
Standardabweichungen der Herzfunktionsparameter der vier Versuchgruppen a	s
prozentuale Angaben bezogen auf die Ausgangswerte (* p-Wert: <0,05).	

Versuchsgruppe	0 min	5 min	10 min	
Herzfrequenz (HF)				
IR Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	101,4 ± 8,0 %	102,4 ± 12,3 %	
IR IMD low	100,0 ± 0,0 %	102,6 ± 12,0 %	101,7 ± 18,5 %	
IR IMD high	100,0 ± 0,0 %	115,5 ± 31,1 %	123,9 ± 35,3 %	
IR cAMP	100,0 ± 0,0 %	103,9 ± 16,7 %	123,8 ± 35,2 %	
Linksventrikulärer o	liastolischer Druc	k (LVPdias)		
IR Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	100,5 ± 11,4 %	101,5 ± 15,8 %	
IR IMD low	100,0 ± 0,0 %	98,6 ± 12,5 %	94,7 ± 25,6 %	
IR IMD high	100,0 ± 0,0 %	48,9 ± 37,9 % *	32,9 ± 35,1 % *	
IR cAMP	100,0 ± 0,0 %	100,4 ± 8,4 %	97,6 ± 8,0 %	
Linksventrikulärer s	systolischer Druck	(LVPsys)		
IR Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	99,8 ± 2,2 %	101,5 ± 3,3 %	
IR IMD low	100,0 ± 0,0 %	94,6 ± 8,3 %	93,6 ± 9,1 % *	
IR IMD high	100,0 ± 0,0 %	83,5 ± 10,8 % *	79,6 ± 12,1 % *	
IR cAMP	100,0 ± 0,0 %	94,2 ± 9,4 %	93,3 ± 11,6 %	
Linksventrikuläre D	ruckentwicklung (LVDP)		
IR Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	101,5 ± 5,3 %	104,9 ± 7,7 %	
IR IMD low	100,0 ± 0,0 %	94,6 ± 12,8 %	95,7± 9,3 %	
IR IMD high	100,0 ± 0,0 %	89,8 ± 10,6 % *	88,8 ± 11,5 % *	
IR cAMP	100,0 ± 0,0 %	96,1 ± 9,5 %	97,3 ± 10,9 %	
Koronarer Perfusion	nsdruck (kPP)			
IR Kontrolle	100,0 ± 0,0 %	106,9 ± 3,6 %	112,8 ± 7,2 %	
IR IMD low	100,0 ± 0,0 %	105,7 ± 9,6 %	107,3 ± 11,8 %	
IR IMD high	100,0 ± 0,0 %	74,4 ± 15,0 % *	73,8 ± 15,3 % *	
IR cAMP	100,0 ± 0,0 %	98,1 ± 16,4 %	100,8 ± 18,8 %	





Abb. 4.3 Verlauf der Herzfunktion im 10min-IMD/db-cAMP-Perfusionsintervall der ischämischen Versuchsgruppen. Dargestellt sind MW ± SD der Herzfunktionsparameter der Gruppen aus ischämisch-reperfundierten Herzen in Prozent der Ausgangswerte (* p-Wert: <0,05)

4.1.2.2 Recovery-Daten

Recovery-Werte sind die funktionellen Parameter der Herzen am Ende des Versuchs bezogen auf die Ausgangswerte. Hier wurden der LVPdias, der LVPsys, LVDP und der kPP betrachtet. Alle Werte, die sich auf die HF beziehen, wurden nicht betrachtet, da die HF bei Versuchbeginn und -ende mittels eines Schrittmachers auf 240 bpm normiert wurde.

Die Recovery-Daten wurden als prozentuale Angaben bezogen auf die Ausgangswerte zu Versuchbeginn dargestellt.

Die Daten zeigten keine signifikanten Veränderungen des LVPdias, LVPsys und LVDP in den Gruppen IR IMD low, IR IMD high und IR cAMP im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der kPP war nur in der Gruppe IR IMD high signifikante (p-Wert: 0,021) gegenüber der Kontrolle und der Gruppe IR cAMP verringert.

Die Messwerte zeigten des Weiteren eine signifikante Verringerung des LVPdias (p-Wert: 0,015), LVPsys (p-Wert: 0,003) und des kPP (p-Wert: 0,001) der IR IMD high-Gruppe im Vergleich zur IR cAMP Gruppe. (s. Abb. 4.4 und Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Langzeiteffekte einer kurzzeitigen IMD₁₋₄₇ **Substitution in den ischämischen Versuchsgruppen.** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Herzfunktionsparameter der vier Versuchgruppen als prozentuale Angabe (* p-Wert: <0,05 gegen IR Kontrolle, *¹ p-Wert: <0,05 gegen IR cAMP).

Versuchsgrup	ope Recovery	Versuchsgruppe Recovery		
	LVPdias		LVDP	
IR Kontrolle	300,2 ± 198,8 %	IR Kontrolle	52,9 ± 13,5 %	
IR IMD low	356,7 ± 342,0 %	IR IMD low	47,1 ± 21,6 %	
IR IMD high	167,3 ± 147,2 % * ¹	IR IMD high	45,0 ± 5,3 %	
IR cAMP	445,9 ± 142,7 %	IR cAMP	49,2 ± 9,2 %	
	LVPsys		kPP	
IR Kontrolle	67,7 ± 20,4 %	IR Kontrolle	198,2 ± 43,8 %	
IR IMD low	73,8 ± 20,1 %	IR IMD low	229,7 ± 66,1 %	
IR IMD high	53,4 ± 7,1 % * ¹	IR IMD high	132,8 ± 35,3 % *,* ¹	
IR cAMP	82,7 ± 13,7 %	IR cAMP	229,0 ± 31,5 %	





Abb. 4.4: Langzeiteffekte einer kurzzeitigen $IMD_{1.47}$ Substitution in den ischämischen Versuchsgruppen. Darstellt sind Box- und Whiskers-Plots die den Median und die 25% und 75% Intervalle der Endwertes der verschiedenen Herzfunktionsparameter in Prozent des Ausgangswertes zu Versuchsbeginn zeigen (* p-Wert: <0,05, ° Ausreißer).

4.1.3 Beeinflussung des postischämischen Herzödems

Zur Analyse des postischämischen Herzödems wurde das, nach dem Langendorff-Versuch gemessene, Herzgewicht (HW) zu dem, vor Versuchsbeginn gemessenen Körpergewicht (BW), ins Verhältnis gesetzt (HW/BW). NX Kontrolle wurde als Referenzgruppe gleich 100 % gesetzt.

Die Varianzanalyse erbrachte mit einem p < 0,001 einen höchst signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Dabei stellte sich die Verteilung der Gruppen im anschließendem Duncan-Test mit einem Signifikanzniveau von p = 0,05 wie folgt da: Zwischen den normoxen Versuchgruppen (NX Kontrolle, NX IMD low und NX IMD high) gab es keinen signifikanten Unterschied. Ebenso ergaben sich keine Unterschiede zwischen der ischämischen Versuchgruppen (IR Kontrolle, IR IMD low und IR IMD high, IR cAMP). Das Herzgewicht war jedoch in den ischämischen Gruppen signifikant (p < 0,05) höher als in den normoxen Gruppen. Des Weiteren lieferte der Duncan-Test eine weitere Gruppe die aus den Versuchsrehen NX IMD high, IR IMD low und IR IMD high bestand und zwischen der normoxen und ischämischen Versuchsreihe als Übergangsbereich angeordnet war (s. Abb. 4.5 und Tabelle 4.5).

Tabelle	4.5:	HW/BW	Verhältnis	der	normoxen	und	ischämiscl	hen
Versuchs	gruppe	en. Die Tal	belle zeigt die	Vertei	ilung HW/BW	-Verteilı	ung im Dunc	can-
Test mit I	Mittelwe	ert und Star	ndardabweichu	ıng. Di	e Daten wurd	len aus	gehend von	der
Referenzo	gruppe (NX Kontrol	le = 100 %) als	s proze	ntualer Anteile	e angeg	jeben.	

Gruppen	Ν	Untergruppe für Alpha = .05.			
		1	2	3	
NX IMD low	9	98,1 ± 8,1 %			
NX Kontrolle	9	100,0 ± 9,4 %			
NX IMD high	8	104,1 ± 9,3 %	104,1 ± 9,3 %		
IR IMD low	8		110,6 ± 9,2 %	110,6 ± 9,2 %	
IR IMD high	8		112,6 ± 4,1 %	112,6 ± 4,1 %	
IR cAMP	8			114,7 ± 8,8 %	
IR Kontrolle	8			115,5 ± 7,5 %	
Signifikanz		0,172	0,053	0,275	



Abb. 4.5: HW/BW Verhältnis der normoxen und ischämischen Versuchsgruppen. Dargestellt sind MW ± SD der Herzfunktionsparameter von Gruppen zu je 8-9 Herzen in Prozent der Ausgangswerte. Dabei wurde die NX Kontrolle als 100 % Ausgangswert festgesetzt, und die Veränderungen der anderen Gruppe auf diese Gruppe bezogen (* p-Wert: <0,05).

4.2 Expressionsanalyse

Nun stellte sich die Frage ob und wenn ja in welche Richtung IMD in Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen und der mit db-cAMP behandelten Gruppe die Expression einiger wesentlicher Stoffwechsel- und Apoptosegene sowie Herzinsuffizienzmarker beeinflusst.

Untersucht wurden der atriale natriuretische Faktor (ANF-Gen), das brain natriuretische Peptid (BNP-Gen), die Ornithin-Decarboxylase (ODC-Gen), der Sarcoendoplasmatische-Ca²⁺-Austauscher (SERCA-Gen), das BAX-Gen, das BCL2-Gen und das BCL XL-Gen.

4.2.1 Die normoxen Versuchreihen

Hierfür wurden 3 Gruppen, deren Perfusion durchgängig unter normoxen Bedingungen im Langendorff-Versuch erfolgte, miteinander verglichen:

Gruppe	Behandlung	Abkürzung
Gruppe 1	unbehandelte Kontrollgruppe	NX Kontrolle
Gruppe 2	mit 0,1nM IMD behandelt	NX IMD low
Gruppe 3	mit 100nM IMD behandelt	NX IMD high

Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten (p-Wert: 0,038) Unterschied in der BNP-Expression zwischen den Gruppen in den linken Ventrikeln. Dabei konnte zwar keine signifikante Veränderung der BNP-Expression zwischen der NX Kontrollgruppe und NX IMD low-Gruppe bzw. NX Kontrollgruppe und NX IMD high-Gruppe festgestellt werden, aber bei der NX IMD high-Gruppe bestand die Tendenz (p-Wert: 0,053) zu einer stärkeren BNP-Expression. Die Gene ANF, ODC, SERCA, BAX, BCL2 und BCL XL unterschieden sich in ihrer Expression in den mit IMD₁₋₄₇ behandelten Gruppen (NX IMD low, NX IMD high) nicht von der in der Kontrollgruppe (s. Abb. 4.6, Abb. 4.7 und Tabelle 4.6).

Im rechten Ventrikel bestand die Tendenz einer Expressionssteigerung der Gene BNP (p-Wert: 0,061) und BCL2 (p = 0,062) der Gruppe NX IMD high im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle weiteren Gene wiesen keine Unterschiede in Ihrer Expression in den Gruppen NX IMD low und NX IMD high im Vergleich zur Gruppe NX Kontrolle auf (s. Abb. 4.6, Abb. 4.7 und Tabelle 4.6).

Tabelle	4.6:	Expre	ssion	wic	htiger	kardialer	Ge	ne i	in	den	normo	xen
Versuchg	gruppe	en. Es	wurden	die	Expres	sionswerte	der	einze	Inen	Gene	e relativ	zu
HPRT mit	ihren	Standa	rdabwei	chun	gen für	die rechten	und	linker	ı Ve	ntrikel	dargest	ellt.

Versuchgruppe	Linker Ventrikel	Rechter Ventrikel
ANF		
NX Kontrolle	1,00 ± 0,65	1,00 ± 1,76
NX IMD low	1,29 ± 0,99	1,98 ± 1,50
NX IMD high	1,61 ± 0,81	2,06 ± 2,84

Versuchgruppe	Linker Ventrikel	Rechter Ventrikel
BNP		
NX Kontrolle	1,00 ± 0,55	1,00 ± 0,84
NX IMD low	$0,79 \pm 0,56$	0,89 ± 0,41
NX IMD high	1,66 ± 0,89	1,64 ± 0,66
ODC		
NX Kontrolle	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,38
NX IMD low	$1,08 \pm 0,55$	0,80 ± 0,20
NX IMD high	1,50 ± 1,13	1,24 ± 0,55
SERCA		
NX Kontrolle	1,00 ± 0,39	1,00 ± 0,22
NX IMD low	$0,95 \pm 0,39$	$0,99 \pm 0,37$
NX IMD high	1,21 ± 0,43	1,04 ± 0,63
BAX		
NX Kontrolle	1,00 ± 0,39	1,00 ± 0,39
NX IMD low	$0,98 \pm 0,48$	$0,86 \pm 0,26$
NX IMD high	1,53 ± 0,87	1,94 ± 1,72
BCL2		
NX Kontrolle	1,01 ± 0,52	1,00 ± 0,55
NX IMD low	$0,96 \pm 0,68$	0,63 ± 0,24
NX IMD high	1,46 ± 0,85	1,14 ± 0,54
BCL XL		
NX Kontrolle	1,00 ± 0,38	1,00 ± 0,42
NX IMD low	1,16 ± 0,42	1,17 ± 0,36
NX IMD high	1,06 ± 0,57	$0,89 \pm 0,66$



Abb. 4.6: Expression wichtiger kardialer Gene in den linken Ventrikeln der normoxen Versuchgruppen. Darstellt sind Box- und Whiskers-Plots, die den Median und die 25% und 75% Intervalle zeigen (° Ausreißer).



Abb. 4.7: Expression wichtiger kardialer Gene in den rechten Ventrikeln der normoxen Versuchgruppen. Darstellt sind Box- und Whiskers-Plots, die den Median und die 25% und 75% Intervalle zeigen (° Ausreißer).

4.2.2 Die ischämischen Versuchsreihen

Hierfür wurden 4 Gruppen, die im Langendorff-Versuch einer 45minütigen Ischämie ausgesetzt waren, miteinander verglichen:

Gruppe	Behandlung	Abkürzung
Gruppe 1	unbehandelte Kontrollgruppe	IR Kontrolle
Gruppe 2	mit 0,1 nM IMD behandelt	IR IMD low
Gruppe 3	mit 100 nM IMD behandelt	IR IMD high
Gruppe 4	mit 100 nM db-cAMP behandelt	IR cAMP

Die Varianzanalyse erbrachte für die linken Ventrikel der Gruppe IR IMD low keine signifikanten Veränderungen. In den linken Ventrikeln der Gruppe IR IMD high waren die Gene SERCA (p-Wert: 0,019) und BAX (p-Wert < 0,05) signifikant induziert. Die Gruppe IR cAMP wies in den linken Ventrikeln eine signifikant gesteigerte Expression der Gene ANF (p-Wert: <0,001), BNP (p-Wert: <0,001), ODC (p-Wert: < 0,001), BCL2 (p-Wert: 0,002) und BCL XL (p-Wert: <0,001) im Vergleich zu den restlichen Gruppen auf (s. Abb. 4.8, Abb. 4.9 und Tabelle 4.7).

In den rechten Ventrikeln lieferte die Varianzanalyse keinen Hinweis für signifikante Expressionsveränderungen der Gruppe IR IMD low. Die Daten der rechten Ventrikel der Gruppe IR IMD high zeigten als einigstes eine signifikante Induktion des BCL2-Gens (p-Wert: <0,001) im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Gruppe IR cAMP lieferten die rechtsventrikulären Messwerte Hinweise für eine signifikante Induktion der Gene ANF (p-Wert: 0,005), ODC (p-Wert: <0,001), BAX (p-Wert: <0,001), BCL2 (p-Wert: <0,001) und eine signifikante Runterregulation des SERCA-Gens (p-Wert: 0,013) (s. Abb. 4.8, Abb. 4.9 und Tabelle 4.7).

(* p-Wert: <0,05).		
Versuchgruppe	Linker Ventrikel	Rechter Ventrikel
ANF		
IR Kontrolle	1,01 ± 0,55	1,00 ± 6,5
IR IMD low	0,81 ± 0,30	1,22 ± 1,50
IR IMD high	$0,95 \pm 0,83$	0,73 ± 0,57
IR cAMP	4,64 ± 2,23 *	3,23 ± 2,19 *
BNP		
IR Kontrolle	1,00 ± 0,45	0,99 ± 0,64
IR IMD low	1,11 ± 0,45	0,89 ± 0,61
IR IMD high	1,76 ± 1,06	1,39 ± 0,81
IR cAMP	4,04 ± 0,89 *	1,46 ± 0,51
ODC		
IR Kontrolle	1,00 ± 0,38	1,00 ± 0,26
IR IMD low	1,25 ± 0,55	1,11 ± 0,29
IR IMD high	0,97 ± 0,31	0,89 ± 0,12
IR cAMP	4,13 ± 1,32 *	3,35 ± 1,21 *
SERCA		
IR Kontrolle	1,00 ± 0,16	1,00 ± 0,75
IR IMD low	0,97 ± 0,27	$0,95 \pm 0,40$
IR IMD high	1,24 ± 0,18 *	0,95 ± 0,20
IR cAMP	0,87 ± 0,28	0,33 ± 0,09 *
BAX		
IR Kontrolle	1,00 ± 0,16	1,00 ± 0,54
IR IMD low	1,20 ± 0,46	1,11 ± 0,57
IR IMD high	1,60 ± 0,51 *	0,84 ± 0,26
IR cAMP	1,24 ± 0,43	2,53 ± 0,85 *

Tabelle 4.7: Expression wichtiger kardialer Gene in den ischämischen Versuchgruppen. Es wurden die Expressionswerte der einzelnen Gene relativ zu HPRT mit ihren Standardabweichungen für die rechten und linken Ventrikel dargestellt (* p-Wert: <0.05).

Versuchgruppe	Linker Ventrikel	Rechter Ventrikel
BCL2		
IR Kontrolle	1,00 ± 0,20	1,01 ± 0,61
IR IMD low	$0,94 \pm 0,33$	$1,00 \pm 0,43$
IR IMD high	1,20 ± 0,52	1,96 ± 0,49 *
IR cAMP	1,85 ± 0,67 *	2,20 ± 1,43 *
BCL XL		
IR Kontrolle	1,00 ± 0,18	1,00 ± 0,88
IR IMD low	1,21 ± 0,39	$0,93 \pm 0,47$
IR IMD high	0,91 ± 0,27	1,22 ± 0,31
IR cAMP	2,98 ± 0,71 *	1,34 ± 0,22



Abb. 4.8: Expression wichtiger kardialer Gene in den linken Ventrikeln der ischämischen Versuchgruppen. Darstellt sind Box- und Whiskers-Plots, die den Median und die 25% und 75% Intervalle zeigen (* p-Wert: <0,05, ° Ausreißer).



Abb. 4.9: Expression wichtiger kardialer Gene in den rechten Ventrikeln der ischämischen Versuchgruppen. Darstellt sind Box- und Whiskers-Plots, die den Median und die 25% und 75% Intervalle zeigen (* p-Wert: <0,05, ° Ausreißer).

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Abb. 4.10 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der einzelnen Experimente.

Langendorff-Versuche Ischämische Versuchgruppen Normoxe Versuchgruppen Akuteffekte: Akuteffekte: •LVPdias, LVPsys, LVDP und kPP sanken unter •HF wurde durch IMD low gering gesenkt und durch IMD high Substitution IMD high gesteigert •LVPdias, LVPsys, LVDP und kPP sanken unter IMD high Recovery-Effekte: •LVPdias und LVPsys sind durch IMD high weniger stark gestiegen als unter cAMP Recovery-Effekte: •kPP ist unter IMD high weniger stark gestiegen als •kPP wurde durch IMD high gesenkt in den restlichen Versuchgruppen Beeinflussung des postischämischen Herzödems: ·Herzgewicht ist postischämisch höher als unter normoxen Bedingungen •Die Substitution von IMD bzw. cAMP hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung eines Herzödems

Expressionsdaten

00		
	Ischämische Versuchgruppen	Normoxe Versuchgruppen
10	Linker Ventrikel:	Linker Ventrikel:
	 ANF, BNP, ODC, BCL2 und BCL XL wurden durch cAMP hoch reguliert 	Tendenz zu einer stärkeren BNP-Expression in der Gruppe NX IMD high
	•SERCA und BAX wurden durch IMD high hoch reguliert	
de la constante	Rechter Ventrikel:	Rechter Ventrikel:
20 STAR	Rechter Ventrikel: •ANP, ODC, BAX und BCL2 wurde durch cAMP hoch reguliert	Rechter Ventrikel: * Tendenz zu einer stärkeren Expression der Gene BNP und BCL2 in der Gruppe NX IMD high
2000 Participation of the second s	Rechter Ventrikel: •ANP, ODC, BAX und BCL2 wurde durch cAMP hoch reguliert •SERCA wurde durch cAMP herunterreguliert	Rechter Ventrikel: * Tendenz zu einer stärkeren Expression der Gene BNP und BCL2 in der Gruppe NX IMD high
	Rechter Ventrikel: •ANP, ODC, BAX und BCL2 wurde durch cAMP hoch reguliert •SERCA wurde durch cAMP herunterreguliert •IMD high steigerte die BCL2 Expression	Rechter Ventrikel: * Tendenz zu einer stärkeren Expression der Gene BNP und BCL2 in der Gruppe NX IMD high

Abb. 4.10: Zusammenfassung der gesammelten Ergebnisse

5. Diskussion

5.1 Pathophysiologische Bedeutung des Intermedins

Die Forschung der letzten Jahre konnte zeigen, dass IMD an der Regulation einer Vielzahl von komplexen Körperfunktionen beteiligt ist. So spielt es unter anderem eine Rolle bei der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, der Steuerung der Nahrungsaufnahme [93] und bei der Regulation sexueller Funktionen [104]. Eine besondere Rolle kommt IMD jedoch bei der Steuerung des kardio-vaskulären Systems zu. Hier ist es über verschiedene zentralnervöse wie auch periphere (direkt am Zielorgan ansetzende) Mechanismen an der Regulation von Herzfunktion und Blutkreislaufs beteiligt [86].

Es werden, dass IMD-mRNA vermehrt in konnte gezeigt hypertrophiertem Myokard exprimiert wird [101, 105], wohingegen es gesundes Myokard nur sehr gering exprimiert [86]. Auch in einem NO-defizienten Herzinsuffizienzmodell (durch Blockade der NO-Synthase) konnten eine erhöhte IMD-mRNA-Expression nachgewiesen werden [106]. Darüber hinaus kommt es in geschädigtem Myokard auch zu einer Expressionssteigerung der IMD-Rezeptor-mRNA (dem CLR in Kombination mit einem RAMP1-3) [105, 107], was eine Steigerung der IMD-Bindungskapazität der Kardiomyozyten bewirkt [108]. Als Ursache dieser Expressionsveränderungen des IMD und seiner Rezeptorkomplexe wird oxidativer Stress vermutet. Oxidativer Stress durch Hypoxie, Inflammation, Toxine oder auch endokrine kann Dysregulationen ausgelöst werden und führt auf molekularer Ebene zu einer Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Diese freien Radikale sind sehr reaktionsfreudige Substanzen, die mit einer Vielzahl von zellulären Molekülen interagieren und so deren Funktion beeinflussen und schädigen können. Unter physiologischen Bedingungen sorgen zelleigene und zugeführte Antioxidantien für eine Neutralisierung der Radikale. Es wird vermutet, dass IMD zusammen mit seinen Rezeptorkomplexen (vorwiegend CLR mit RAMP1) als eine Art Gegenregulationsmechanismus vermehrt produziert wird, um die Zelle vor oxidativem Stress und dem dadurch ausgelösten Zelluntergang durch Apoptose zu schützen [109]. Dafür spricht, dass unter Antioxidantien-Gabe die IMDsowie CLR/RAMP1-3-Induktion gehemmt werden konnte [106]. Solche selbstprotektiven Mechanismen gegenüber oxidativem Stress sind schon anderweitig bekannt: Freie Radikale aktivieren Signalkinasen, die in der Folge die Genexpression durch Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Auch das Gen von IMD scheint (neben den Genen von AM und vom CLR) eine Promotorregion für einen solchen Transkriptionsfaktor zu besitzen, was seine Hochregulation unter oxidativem Stress erklären könnte [110]. Neben den genannten Veränderungen in der mRNA-Synthese des IMD scheint auch dessen Abbau unter pathophysiologischen Bedingungen verändert zu sein. Es wird vermutet, dass IMD (ähnlich dem AM und den natriuretischen Peptiden) durch die neutrale Endopeptidase (NEP) abgebaut wird [111]. Im insuffizienten Herzen sinkt die Aktivität der NEP (durch verminderte Expression), was über eine Akkumulation von IMD auch zu dessen Konzentrationssteigerung unter pathologischen Bedingungen beitragen könnte [110]. Trotz der erhöhten IMDund IMD-Rezeptor-Expression auf mRNA-Ebene (s. o.), ist der RAMP-Gehalt Zellmembran geschädigter Herzmuskelzellen auf Protein-Ebene der erstaunlicherweise herabgesetzt [110]. Dies könnte eine reaktive Desensibilisierung durch eine dauerhaft erhöhte IMD-Stimulation sein, wodurch einer Internalisierung und proteolytischen Degradation es zu der Rezeptorkomplexe kommt. Gestützt wird diese These durch die Beobachtung einer abgeschwächten IMD-Wirkung in hypertrophierten Herzen gegenüber physiologischen Bedingungen [110].

Vor diesem Hintergrund ist ein protektiver Effekt des IMD auf geschädigtes Myokard denkbar. Es stellte sich somit die Frage, welchen Einfluss eine IMD-Substitution auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz im Tiermodell besitzt.
5.2 Intermedin-Wirkung auf isolierte Rattenherzen

5.2.1 Effekte von IMD auf normoxe Herzen

Anhand der gewonnen Daten bestehen Hinweise auf einen konzentrationsabhängigen Einfluss von IMD auf Herzfunktionsparameter normox perfundierter Herzen. Es konnten folgende Akuteffekte während der 10minütigen IMD₁₋₄₇-Perfusionsphase auf die verschiedenen Herzfunktionsparameter registriert werden (s. Kap. 4.1.1.1, Tab. 4.1 und Abb. 4.1): Die HF sank unter IMD low (p-Wert_{5min}: 0,031 und p-Wert_{10min}: 0,019) wohingegen IMD high einen eine HF-Steigerung (p-Wert_{5min}: 0,021) verursachte. Des Weiteren reduzierte IMD high den LVPdias (p-Wert_{5min}: 0,038), den LVPsys (p-Wert_{5min}: 0,011 und p-Wert_{10min}: 0,006) und als Konsequenz daraus auch den LVDP (p-Wert_{5min}: 0,021 und p-Wert_{10min}: 0,008) gegenüber der Kontrollgruppe. Auch der kPP wurde durch IMD high reduziert (p-Wert_{5min}: 0,011 und p-Wert_{10min}: 0,021). Neben diesen Akuteffekten von IMD₁. ₄₇ auf die Herzfunktion, konnten folgende Langzeiteffekte einer kurzfristigen IMD₁₋₄₇-Substitution gemessen werden (s. Kap. 4.1.1.2, Tab. 4.2 und Abb. 4.2): Unter IMD high war nur der kPP (nach einer 80minütigen Perfusion) reduziert (p-Wert: 0,029). Signifikante Langzeiteffekte auf HF, LVPdias, LVPsys und dem daraus resultierenden LVDP konnten nach dieser Zeitspanne nicht gefunden werden.

Dass IMD Akuteffekte auf das Herz-Kreislaufsystem hat, konnte von Pan et al. gezeigt werden [101]. Sie konnten in Experimenten an lebenden Ratten einen schnellen Effekt von IMD₁₋₄₇ und IMD₈₋₄₇ nach intravenöser Gabe auf das Herz-Kreislauf-System nachweisen, der nach einem einmaligen Bolus 30 min anhielt. Ähnliche Effekte wurden auch von Fujisawa et al. beschrieben [95, 100, 112]. Im Gegensatz zu Pan et al. hielten die durch IMD hervorgerufenen Effekte jedoch bis zu 60 min an [95]. Charles et al. konnten sogar bis 90 min nach einem einmaligen intravenösen Bolus von IMD eine kardio-vaskuläre Wirkung nachweisen [99]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen in dieser Arbeit. So konnte gezeigt werden, dass IMD einerseits Herzfunktionsparameter unmittelbar (d. h. während der 15minütigen IMD₁₋₄₇- Perfusionszeit) beeinflusst. Bezüglich der Langzeiteffekte konnte IMD₁₋₄₇ nur eine Reduktion des kPP induzieren. Da der kPP stellvertretend die Reaktionen des Gefäßsystems widerspiegelt, kann geschlussfolgert werden, dass IMD₁₋₄₇ einen länger andauernden Effekt auf das Gefäßsystem im Vergleich zum Herzmuskel besitzt. Ansonsten müssten auch Langzeiteffekte auf die Parameter HF, LVPdias, LVPsys und LVDP nachweisbar sein, was jedoch nicht gezeigt werden konnte.

Eine, schon früh für IMD beschriebene. Funktion war dessen hypotensiver Effekt im systemischen Kreislauf [81], der auch durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte [95, 99, 100, 113, 114]. Auf die IMD-Substitution reagierten Koronargefäße, Karotiden und Mesenterialgefäße mit einer besonders ausgeprägten Vasodilatation [115]. Aber auch Aorta [101], Pulmonalaterien [90] und venöse Kapazitätsgefäße [113] zeigten einen deutlichen vasodilatativen Effekt auf intravenös injiziertes IMD. Somit vermag IMD den peripheren Widerstand zu senken und vor allem die Durchblutung von Herz, Nieren und Leber (Organe, die auch schon in Ruhe ein hohen Anteil des Herz-Zeit-Volumen beziehen) im Vergleich zu anderen Organen deutlich zu steigern [100]. Es wurden aber auch gegensätzliche Beobachtungen beschrieben. So konnten Jia et al. keinen Effekt von IMD₁₋₅₃ nach intraperitonealer Injektion auf den arteriellen Mitteldruck nachweisen [116]. Eine Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnte die intraperitoneale Applikationsform des IMD darstellen, die über eine verzögerte und eventuell unvollständige Resorption nicht die Plasmalevel einer direkten intravenösen Injektion erreicht. In der hier vorgelegten Arbeit konnte, in Übereinstimmung mit den meisten Publikationen, der vasodilatative Effekt von IMD₁₋₄₇ auf das Koronargefäßsystem isolierter Rattenherzen bestätigt werden. Registriert wurde dabei der koronare Gefäßwiderstand, der im Verlauf der IMD₁₋₄₇-Substitution rasch sank und auch noch nach einem 80minütigen Intervall signifikant verringert war (s. Kap. 4.1.1). Ähnliche Effekte von IMD auf den koronaren Gefäßwiderstand bei Versuchen an isolierten Rattenherzen konnten auch andere Arbeitgruppen feststellen [101, 108].

Im Zusammenhang mit diesem hypotensiven Effekt wurde auch eine Steigerung der HF unter IMD in vivo [80, 81, 95, 99, 100, 113] beschrieben.

Dieser HF-Anstieg scheint hauptsächlich durch die reflektorische Aktivierung des Barorezeptor-Reflexes bedingt, der durch eine Blutdrucksenkung aktiviert wird. Durch die Abkopplung der Barorezeptoren vom Herzen wäre es nahe liegend, dass die HF trotz Vasodilatation nicht ansteigt. Da jedoch ein Anstieg der HF beobachtet werden konnte [95], muss es einen weiteren Weg geben, über welchen IMD die HF reguliert. Möglich wäre eine direkte Beeinflussung von Herzmuskelzellen als auch der Zellen des Erregungsleitungssystems durch IMD. Dies wird von Ergebnissen von Pan et al. gestützt, die einen positiv chronotropen Effekt unter IMD₈₋₄₇ an isolierten Herzen fanden [101]. Ein positiv chronotroper Effekt wurde auch in dieser Arbeit durch IMD high an Langendorff-Herzen beobachtet. Erstaunlicherweise kam es unter IMD low zu einer geringfügig negativ chronotropen Wirkung. Es ist unklar, ob IMD₁₋₄₇ konzentrationsabhängig einen unterschiedlichen Effekt auf die HF hat, oder ob dies auf andere Faktoren zurückzuführen ist. Sollte sich diese Beobachtung in nachfolgenden Untersuchungen bestätigen, wäre sie möglicherweise durch die konzentrationsabhängige Veränderung des IMD-Rezeptor-Aktivierungsmusters erklärbar. IMD könnte so in hohen Konzentrationen zusätzliche weniger selektive Rezeptoren aktivieren und konzentrationsabhängig verschiedene Wirkungen hervorrufen. Der genaue Einfluss von IMD auf isolierte Herzen und speziell die Herzfrequenzmodulation wird kontrovers diskutiert, da einige Arbeitsgruppen keinen Einfluss von IMD auf die HF nachweisen konnten [101, 108, 116]. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurden teilweise unterschiedliche IMD-Isoformen verwendet (IMD₁₋₄₇, IMD₁₋₅₃, IMD₈₋₄₇) [108, 116]. Darüber hinaus könnte die bereits oben diskutierte intraperitoneale Applikationsform zu Unterschieden in den erzielten systemischen IMD-Plasmaleveln führen [116]. Diese Punkte bedürfen weiterer Abklärung.

Von besonderem Interesse war der Einfluss, den IMD₁₋₄₇ auf die kardiale Kontraktionskraft normox perfundierter Rattenherzen ausübt. Eine suffiziente Herzkontraktion ist Vorraussetzung für eine physiologische Herzfunktion. Zum Verständnis pathologischer Veränderungen am Herzen ist es unerlässlich die physiologische Regulation der Herzkontraktilität zu entschlüsseln. Somit wurde in den letzten Jahren in einigen Studien untersucht, wie IMD die Herzkontraktion beeinflusst. Die Kontraktilität des Herzmuskels kann in vivo (Tiermodell), an isolierten Tierherzen und an kultivierten Kardiomyozyten analysiert werden. In in-vivo-Untersuchungen kann die Kontraktilität des das Herzminutenvolumen Herzmuskels indirekt über (HZV) (unter HF) erfasst werden. In das HZV Berücksichtigung der vivo ist unterschiedlichsten Regelsystemen (ZNS, endokrines System, peripherer Gefäßwiderstand) unterworfen, die eine isolierte Betrachtung der IMD-Wirkung auf die Herzkontraktilität erschweren. Ein Versuchsaufbau mit isolierten Rattenherzen bietet zudem den Vorteil, die Kontraktionskraft der Herzen direkt über Drucksensoren im linken Ventrikel aufzuzeichnen zu können. Durch die Untersuchung isolierter Herzen bzw. einzelner Myozyten können die oben beschrieben Einflussfaktoren limitiert und eine dadurch bedingte Streuung der Werte minimiert werden. Untersuchungen unter in-vivo-Bedingungen zeigten eine Steigerung des HZV unter IMD [99, 100]. In Zellkulturversuchen bestätigte sich dieser Effekt einer erhöhten Kardiomyozyten-Kontraktilität durch IMD₁₋₄₇ [117]. Auch für isolierte Herzen in einem Langendorff-Apparat bestehen Hinweise auf eine Verbesserung der Kontraktilität unter IMD₁₋₅₃ (Erhöhung des LVPsys im Vergleich zur Kontrolle) [108], wobei die intraperitoneale IMD₁₋₅₃-Injektion in vivo keinen positiven Effekt auf die Herzkontraktilität zeigte [116]. Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine signifikante Reduktion von LVPsys, LVPdias und LVDP unter IMD high zeigen. Ursachen für diese konträren Ergebnisse können zum einen durch die Verwendung unterschiedlicher IMD-Isoformen (IMD₁₋₄₇ in dieser Arbeit, IMD₁₋₅₃ bei Yang et al. [108] und Jia et al. [116]) bedingt sein. Möglicherweise liegt die Ursache dafür aber auch in den unterschiedlichen Versuchsaufbauten der einzelnen Studien (Tiermodell, isolierte Herzen bzw. Zellkultur). Je nach Versuchsmodell wäre ein anderer Angriffpunkt des Peptidhormons IMD denkbar. In Zellkulturexperimenten kommt es zu einer direkten Stimulation von Kardiomyozyten durch IMD, wohingegen in isolierten Herzen bzw. im Tiermodell das, im Gefäßsystem zirkulierende, IMD seine Wirkung über das Gefäßendothel entfaltet. Daraus ließe sich ableiten, dass IMD auf parakrinem/autokrinem Weg die Kontraktilität der Kardiomyozyten durch eine gesteigerte cAMP-Synthese erhöht (s. Kap. 5.3) und so eine positiv inotrope Wirkung zu induzieren vermag [117]. Durch die systemische Wirkung an Endothelzellen könnte IMD über eine Steigerung der NO-Synthese eine negativ inotrope Wirken entfalten [86]. Eine weitere Ursache für abweichende Ergebnisse könnte die Verwendung von Versuchtieren unterschiedlicher Spezies darstellen. Für das, mit IMD verwandte Peptidhormon, CGRP konnten solche speziesbedingten Unterschiede in der Wirkung gezeigt werden (s. Kap. 1.4.1 und 1.4.2) [118]. Somit ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von Schafen [99] auf das, in dieser Arbeit verwendete, Rattenmodell fraglich. Unterstütz werden die Ergebnisse dieser Arbeit durch eine Studie von Pan et al., die einen negativ inotropen Effekt für IMD an isolierten Rattenherzen beschreibt [101]. Überraschenderweise war in dieser Studie der inhibitorische Effekt nur für IMD₈₋₄₇ unter erhöhten Ausgangsparametern für LVPsys, kPP, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nachweisbar. Für IMD₁₋₄₇ unter normalen Ausgangsparametern konnten sie diesen Effekt nicht zeigen. Vereinbar wären diese gegensätzlichen Beobachtungen durch eine variable IMD auf Herzmuskel Wirkung von den in Abhängigkeit der Ausgangsbedingungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin das IMD₁₋₄₇ unter physiologischen Bedingungen durch Stimulation endothelständiger Rezeptoren den kPP senkt und die Kontraktionskraft des Herzens senkt. Eventuell als Ausgleichsmechanismus des verringerten Herzauswurfs steigt die HF, um die Systemperfusion durch ein ausreichend hohes HZV zu gewährleisten. Im Herzmuskel selbst synthetisiertes IMD könnte über autokrine bzw. parakrine Mechanismen auch eine positiv inotrope Wirkung induzieren.

5.2.2 Effekte von IMD auf ischämische Herzen

Anhand der gewonnen Daten bestehen Hinweise auf einen konzentrationsabhängigen Einfluss von IMD auf Herzfunktionsparameter ischämisch/reperfundierter Herzen. Es konnten folgende Akuteffekte unter IMD₁₋₄₇ registriert werden (s. Kap. 4.1.2.1 und Abb. 4.3): tendenzielle Steigerung der HF unter IMD high, signifikante Senkung des LVPdias unter IMD high (p-Wert_{5min}: 0,007 und p-Wert_{10min}: <0,001), signifikante Senkung des LVPsys unter IMD high (p-Wert_{5min}: <0,001 und p-Wert_{10min}: <0,001) und unter

IMD low (p-Wert_{10min}: 0,038), der LVDP konnte lediglich durch IMD high signifikant gesenkt werden (p-Wert_{5min}: 0,038 und p-Wert_{10min}: 0,010). Auch der kPP sank unter IMD high signifikant (p-Wert_{5min}: <0,001 und p-Wert_{10min}: <0,001). Neben diesen Akuteffekten hatte die IMD₁₋₄₇-Substitution folgende Langzeiteffekte auf die Herzfunktion (s. Kap. 4.1.2.2 und Abb. 4.4): lediglich der kPP wies eine signifikante Reduktion unter IMD high auf (p-Wert: 0,021).

Im Vergleich zu Untersuchungen der Wirkung von IMD auf normoxe Herzen ist die Datenlage zu dessen Wirkung auf ischämische Herzen sehr begrenzt. Jia et al. induzierten (durch Isoproterenol) eine Herzinsuffizienz in Ratten und untersuchten daraufhin die Effekte von IMD₁₋₅₃ auf die Herzfunktion [116]. Nach intraperitonealer Applikation von IMD₁₋₅₃ konnten keine signifikante Veränderung der HF gefunden werden, was im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht. Die jedoch beobachtete Tendenz zu einer HF-Steigerung durch IMD₁₋₄₇ wird von Yang et al. bekräftigt, die von einer positiv chronotropen Wirkung von IMD₁₋₄₇, IMD₈₋₄₇ und IMD₁₋₅₃ auf isolierte Rattenherzen berichten [108, 119]. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des Kap. 5.2.1 lässt sich schlussfolgern, dass IMD sowohl unter normoxen als auch unter ischämischen Bedingungen eine tachykarde Wirkung besitzt.

IMD scheint den kPP unter normoxen und ischämischen Bedingungen in gleicher Weise zu beeinflussen. So wurde eine Reduktion des kPP unter dem Einfluss von IMD₁₋₄₇, IMD₈₋₄₇ und IMD₁₋₅₃ in der Literatur beschrieben [108, 119]. Eine entsprechende Wirkung von IMD₁₋₄₇ konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Reduktion des kPP ist gleichbedeutend mit einer Vasodilatation in den Koronarien. Ein solcher vasodilatierender Effekt von IMD konnte sowohl akut als auch als Langzeiteffekt nachgewiesen werden (s. o.). Über diese Eigenschaft könnte IMD zu einer Verbesserung der Energie- und Sauerstoffversorgung des ischämischen Myokards beitragen.

Zur Evaluierung der pathophysiologischen Wirkung von IMD spielt vor allem dessen Einfluss auf die Kontraktionskraft des ischämisch geschädigten Myokards eine Rolle. Bisher konnte in herzinsuffizienten Ratten ein positiver Effekt von IMD₁₋₅₃ auf die Herzfunktion nachgewiesen werden. So führte intraperitoneal appliziertes IMD₁₋₅₃ zu einer Senkung des LVPdias und einer Verbesserung der Kontraktilität (durch eine erhöhte Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards) [116]. Einen Effekt auf den LVPsys konnte von Jia et al. nicht nachweisen werden. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die Effekte von IMD₁₋₄₇, IMD₈₋₄₇ und IMD₁₋₅₃ auf postischämische, isolierte Rattenherzen in einer Langendorff-Apparatur. Auch sie beschrieben einen Abfall des LVPdias, sowie eine Steigerung des LVDP und eine erhöhte Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards [108, 119]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterscheiden sich von den Beobachtungen in den genannten Studien. So kam es zwar unter IMD₁₋₄₇-Substitution zu einer Reduktion des LVPdias, jedoch zusätzlich zu einer Senkung des LVPsys und (daraus resultierend) zu einer Senkung des LVDP. Diese Unterschiede könnten wie folgt erklärt werden: In der erstgenannten Untersuchung von Jia et al. [116] wurde IMD vor der Induktion einer Herzinsuffizienz appliziert. Dies führte zu einer grundsätzlich unterschiedlichen Ausgangssituation im Vergleich zu dieser Arbeit, da IMD hier erst 30 min nach Reperfusionsbeginn verabreicht wurde. Es wäre demnach denkbar, dass IMD in der genannten Studie einen protektiven Effekt ausübt, indem es die Zellen weniger empfindlich für oxidativen Stress (s. Kap. 5.1) macht. Durch den geringeren Zelluntergang unter IMD, stünde postischämisch mehr kontraktiles Myokard zur Verfügung, was die Verbesserung der Kontraktilität im Vergleich zur Kontrolle erklären könnte. Da IMD in dieser Arbeit erst nach dem ischämischen Intervall verabreicht wurde, konnte es, den oben vermuteten, protektiven Effekt nicht ausüben. In der zweitgenannten Untersuchung von Yang et al. [108, 119] wurde IMD direkt im Anschluss an das ischämische Intervall und während der gesamten Reperfusionsphase verabreicht. Im Gegensatz dazu ist IMD in dieser Arbeit erst 30 min nach Beginn der Reperfusion verabreicht worden. Die Reperfusionsphase ist, neben der Schädigung des Myokards durch Ischämie, der zweite kritische Zeitraum, in dem es durch eine postischämische Hyperkontraktilität der Myozyten zu einem weiteren Zelluntergang durch Zellruptur kommt. Die Verabreichung von IMD direkt zu Beginn der Reperfusionsphase ermöglicht so vermutlich eine Protektion vor den Schäden postischämischen Hyperkontraktilität. Dies würde die registrierte der Verbesserung der Kontraktilität im Vergleich zur Kontrolle durch einen geringeren Verlust an Myozyten erklären. Durch die verzögerte IMD-Applikation in dieser Arbeit (nach dem, für den Reperfusionsschaden, kritischen Intervall) konnte der Reperfusionsschaden nicht mehr begrenzt werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Veränderungen (Reduktion von LVPdias, LVPsys und LVDP) sind aufgrund des Zeitpunkts der IMD-Applikation vermutlich nicht auf eine Veränderung der Zahl kontrahierender Myozyten, sondern auf eine Veränderung der Kontraktilität des einzelnen Myozyten zurück zu führen.

Alles in allem kann man anhand dieser Ergebnisse schlussfolgern, dass IMD₁₋₄₇ die Sauerstoff- und Energieversorgung des Herzens über eine Senkung des kPP verbessert. Auch die Senkung der Herzleistung (durch Reduktion des LVPsys und LVDP) in Zusammenhang mit einer Reduktion des LVPdias tragen über eine Verminderung des myokardialen Energiebedarfs möglicherweise zu einer Protektion vor weiteren myokardialen Schäden bei. Andere Quellen belegen weiterhin eine Schutzfunktion von IMD vor ischämischen Schäden bzw. postischämischen Reperfusionsschäden des Myokards.

5.2.3 Effekte von IMD auf das postischämische Herzödem

Die Auswertung der gewonnenen Daten erbrachte eine signifikante Steigerung des HW/BW-Verhältnisses in den ischämischen Gruppen im Vergleich zu den normoxen Gruppen. Es konnte jedoch kein Einfluss von IMD₁₋ ₄₇ auf das HW/BW-Verhältnis nachgewiesen werden (s. Kap. 4.1.3).

Zur Erfassung des postischämischen Herzödems wurde in dieser Arbeit das HW/BW-Verhältnisses bestimmt. Unter physiologischen Bedingungen besteht eine positive Korrelation von Herzgewicht und Körpergewicht. In der kurzen Versuchszeit im Langendorff-Apparat ist die Entstehung einer signifikanten Gewebshypertrophie nicht möglich, die zu einem höheren HW/BW-Verhältnis führen könnte. Aus diesem Grund sind die Veränderungen in der ischämischen Gruppe höchstwahrscheinlich auf die Entstehung eines Herzödems zurückführbar (s Kap. 1.2.1). Bisher existieren keine Studien bezüglich der Beeinflussung des postischämischen Herzödems durch das Peptidhormon IMD. Es ist lediglich bekannt, dass ein erhöhtes HW/BW-Verhältnis mit einer gesteigerten Plasma-IMD-Konzentration korreliert [105]. Da die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Einfluss von IMD auf die Entstehung des Herzödems zeigen, wäre diese Beobachtung nur so zu erklären, dass IMD infolge der myokardialen Schädigung bei bereits bestehendem Herzödem vermehrt produziert wird und dieses nicht weiter beeinflusst. Dieser Hypothese steht jedoch gegenüber, dass IMD durch Induktion anti-oxidativer Prozesse einen protektiven Einfluss auf Endothelien besitzen soll [97, 109]. Bei einem solchen protektiven Effekt von IMD wäre es nahe liegend, dass durch eine intakte Endothelbarriere der Entstehung eines Herzödems entgegengewirkt würde. Da die genaue Wirkung des IMD auf die Endothelfunktion, im Speziellen auf die Blut-Gewebe-Schranke, bisher weitestgehend unbekannt ist, bedarf es für eine Beurteilung des IMD-Einflusses auf die Entwicklung eines Herzödem weiterer Untersuchungen.

5.3 Signalwege des Peptidhormons Intermedin

In dieser Arbeit wurden IMD₁₋₄₇ und cAMP bezüglich ihres Einflusses auf Herzfunktion und Genexpression vergleichend untersucht. Die Auswertung der Herzfunktionsparameter erbrachte folgende Ergebnisse: IMD₁₋₄₇ beeinflusst signifikant die Herzfunktion (s. Kap. 5.2.2), wohingegen unter cAMP-Substitution keine Beeinflussung der Herzfunktion registriert werden konnte. In linksventrikulären Myozyten führte cAMP zu signifikanten Veränderungen in der Expression einiger Gene (Induktion von ANF (p-Wert: <0,001), BNP (p-Wert: <0,001), ODC (p-Wert: <0,001), BCL-2 (p-Wert: 0,002) und BCL-XL (p-Wert: <0,001)). Im Vergleich dazu führte IMD₁₋₄₇ nur zu einer signifikanten Induktion von SERCA (p-Wert: <0,05) und BAX (p-Wert: <0,05) in linksventrikulären Myozyten. In rechtsventrikulären Myozyten induzierte cAMP signifikant die Gene ANF (p-Wert: 0,005), ODC (p-Wert: <0,001), BAX (p-Wert: <0,001) sowie BCL2 (p-Wert: <0,001) und bewirkte eine Runterregulation von SERCA (p-Wert: 0,013). Auch unter IMD₁₋₄₇-Substituteion zeigte sich eine signifikante Induktion von BCL2 in rechtsventrikulären Myozyten (p-Wert: <0,001), wobei diese geringer ausfiel als unter cAMP (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2).

Wie in Kap. 1.4.3 erwähnt, ist die durch IMD vermittelte Signaltransduktion noch nicht endgültig geklärt. Bisher steht fest, dass IMD

über die verschiedenen CLR/RAMP1-3 Komplexe an die Zelle binden kann [104, 116, 117, 120, 121]. Daneben wurde auch eine geringe Affinität zu CR-Die und Amylin-Rezeptoren beschrieben. physiologische bzw. pathophysiologische Relevanz dieser Rezeptoren in Bezug auf IMD ist jedoch unbekannt [120]. Ferner ist die Existenz eines weiteren IMD-spezifischen Rezeptors naheliegend. Diese Schlussfolgerung resultierte aus Untersuchungen in kardio-vaskulärem System und ZNS, bei denen IMD-Effekte registriert wurden, die keinem der bisher bekannten IMD-Rezeptoren zugeordnet werden konnten [94, 104, 120].

Durch die Interaktion von IMD mit einem seiner Rezeptorkomplexe (CLR/RAMP1-3-Komplexe) kommt es über ein zwischengeschaltetes G-Protein zu der Aktivierung eines intrazellulären Signalwegs [86]. Zurzeit werden verschiedenen Signalwege diskutiert (s. Kap. 1.4.2 und Abb. 1.2). Große Akzeptanz besteht aktuell für cAMP-vermittelte Signalwege [87, 98-101, 108, 116, 119, 121, 122]. cAMP ist über Proteinkinasen (wie die Proteinkinase A (PKA)) zu Beeinflussung wichtiger zellulärer Struktur- und Funktionsproteine befähigt [98, 121, 122]. Unter der Annahme einer cAMP-vermittelten IMD-Signaltransduktion wurden IMD₁₋₄₇ und cAMP bezüglich ihres Einflusses auf Herzfunktion und Genexpression vergleichend untersucht. Die gewonnen Ergebnisse zeigen keine Übereinstimmungen in der Wirkung von IMD₁₋₄₇ und cAMP auf die untersuchten Herzfunktionsparameter und die Genexpression. Da sowohl IMD₁₋₄₇ als auch cAMP signifikante Effekte hervorriefen, ist davon auszugehen, dass bei beiden Molekülen in ausreichenden Konzentrationen verabreicht wurden. Die gewonnen Daten sprechen somit für eine cAMPunabhängige Signaltransduktion des IMD an isolierten Rattenherzen. Gestützt wird diese Vermutung durch Charles et al. [99]. Ihnen gelang der Nachweis, dass bereits niedrige IMD-Konzentrationen zu einer Blutdruck-Senkung im kardio-vaskulären System führen, ohne eine Veränderung des zellulären cAMP-Spiegels hervorzurufen. Dies legt die Vermutung nahe, dass IMD in vivo auch über cAMP-unabhängige Signalwege Herz-Kreislauf-Parameter modulieren kann. Erst durch hohe Konzentrationen des Peptidhormons könnte es zu einer zusätzlichen Rekrutierung unspezifischer Rezeptoren kommen, die den Botenstoff cAMP zur Signaltransduktion nutzen. Möglich wäre auch, dass die IMD-Wirkung auf Herzmuskelzellen über Endothelzellen vermittelt wird. Eine solche Signaltransduktion könnte über den Second-Messenger NO erfolgen [98, 123]. Dafür spricht, dass unter IMD-Stimulation eine gesteigerte intrazelluläre NO-Akkumulation registriert wurde, die über Aktivierung einer Guanylatzyklase zu einer Steigerung des cGMP-Spiegels führt und so Proteinkinasen (wie die Proteinkinase G) anregt. Eine NO-vermittelte Signaltransduktion würde auch die, in dieser Arbeit registrierte, negativ inotrope Wirkung des IMD₁₋₄₇ erklären (s. Kap. 5.2.1 und 5.2.2), da das in Endothelzellen gebildete NO bekannterweise vasodilatierend und negativ inotrop wirkt [86]. Somit wäre es denkbar, dass systemisch zirkulierendes IMD primär an Endothelzellen bindet und dort die NO-Produktion, mit den oben beschriebenen Effekten anstößt. Entgegen dieser Hypothese konnte eine Blockade der NO-Synthase (das Schlüsselenzym der NO-Produktion) die vasodilatierende Wirkung von IMD nicht aufheben [93, 94, 114]. Ein IMD-vermittelter Signalweg könnte auch über den Second-Messenger Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) laufen [91, 117, 124]. Durch den CLR/RAMP1-3-Komplex käme es G-Protein-vermittelt (s. o.) zu einer Aktivierung der Phospholipase C, die PIP₂ in Inositoltriphosphat (IP3) und Diazylglyzerin (DAG) spaltet. DAG aktiviert wiederum die Proteinkinase C (PKC), die ähnlich der PKA (s. o.), zelluläre Proteine phosphorylieren und so in ihrer Aktivität beeinflussen kann. IP3 erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration durch Freisetzung aus zellulären Speichern. Ein weiterer IMD-vermittelter Signalweg könnte über die PI3-K stattfinden [91, 124]. Die PI3-K kann durch G-Proteine und somit über den CLR/RAMP1-3-Komplex aktiviert werden. Sie phosphoryliert PIP₂ zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃). PIP₃ ist in der Lage über nachgeschaltete Kinasen (wie die Akt-Kinase und die GSK-Kinase) einen kardioprotektiven/anti-apoptotischen Effekt hervorzurufen. Im ZNS konnte kein Einfluss von PLC- und PKC-Inhibitoren auf die IMD-Wirkung nachgewiesen werden [120], was nicht ausschließt, dass IMD im kardio-vaskulären System über diese Signalwege wirkt. Von Smith Jr. et al. wurde auch ein ERK-(extrazellulär regulierte Signalkinase)-Signalweg vorgeschlagen [124]. Sie konnten eine gesteigerte ERK-Phosphorylierung und damit erhöhte ERK-Aktivität unter IMD₁₋₅₃ nachweisen, wobei der Signalweg im Detail noch unklar ist. Zu Beginn des ERK-Signalweges kann die Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors stehen, der über eine Kaskade verschiedenster Kinasen die ERK phosphoryliert. Da einige Studien die Existenz von einem bisher noch unidentifizierten IMD-Rezeptor (s. o.) vorhersagen, könnte es sich dabei um einen Tyrosinkinase-Rezeptor handeln. Dafür spricht, dass Signalmoleküle die vermutlich bei der IMD-vermittelten Signaltransduktion eine Rollen spielen (PKC und PI3-K) durch solche Tyrosinkinase-Rezeptoren aktiviert werden. Gegen die Nutzung eines Tyrosinkinase-Rezeptors durch IMD spricht, dass eine Inhibition der ERK keinen Einfluss auf die IMD-Wirkung zeigte [120]. Andere Arbeitsgruppen untersuchten Zyclooxygenase/Prostanoid- und Kaliumkanalabhängige Signalwege und konnten keinen Zusammenhang mit IMD herstellen [114].

5.4 Einfluss von Intermedin auf Zellwachstum und Zellfunktion

5.4.1 Zellhypertrophie

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Effekt von IMD₁₋₄₇ auf die ODC-Expression im linken und im rechten Ventrikel unter normoxen wie unter ischämischen Bedingungen nachgewiesen werden (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2).

Ein wichtiger Kompensationsmechanismus bei der Herzinsuffizienz zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden HZV ist die Hypertrophie der Kardiomyozyten (s. Kap. 1.2.3). Dabei kommt es zu einer Größenzunahme der verbliebenen Kardiomyozyten um einen entstandenen Verlust an kontraktilem Gewebe auszugleichen. Parallel zur Hypertrophie kommt es jedoch zu keiner Zunahme der Kapillarisierung, was zu einer Minderversorgung der verbliebenen Kardiomyozyten mit Sauerstoff führt. In der Folge geht weiteres kontraktiles Gewebe verloren. Ferner führt die Hypertrophie zu einer verminderten Ventrikel-Compliance und einer daraus resultierenden unökonomischeren Herzarbeit. Die Induktion der Hypertrophie ist sehr komplex und wird einerseits durch Mechanosensoren, andererseits auch durch Veränderungen im neurohumoralen System (s. Kap 1.2.2) bewirkt. Für eine Beteiligung von IMD an der Regulation der kardiomyozytären Hypertrophie spricht die Studie von Pan et al., die eine IMD-induzierte verminderte Proteinsynthese in Kardiomyozyten beschreibt [101]. Da die Kardiomyozyten-Hypertrophie mit einer Proteinsynthese-Steigerung einhergeht, spricht dies für einen antihypertrophen und somit protektiven Effekt von IMD auf das Myokard. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern jedoch keinen Anhalt für einen antihypertrophen Effekt von IMD₁₋₄₇ auf die Ventrikel. Stellvertretend für die kardiomyozytäre Hypertrophie wurde in dieser Arbeit die Expression der ODC untersucht (s. Kap 1.2.3). Es handelt sich um das Gen eines Enzyms, welches die mRNA im Zytoplasma vor ihrem Abbau schützt und so eine häufigere Translation gewährleistet. Über die ODC wird somit die Proteinsynthese nur indirekt detektiert. Die von Pan et al. verwendete Leucin-Inkorporations-Methode misst die Proteinsynthese dagegen direkt. Aus diesem Grund ist diese das sensitivere Verfahren zur Bestimmung Methode auch als der Proteinsynthese einzustufen. Ein möglicher Ansatz, der die Ergebnisse dieser Arbeit in Einklang mit denjenigen von Pan et al. bringen könnte, wäre eine Verminderung der Transkription bzw. der Translation durch IMD. Dies würde eine Senkung der Proteinsynthese (wie von Pan et al. Beschrieben) hervorrufen, ohne dass eine ODC-Expressions-Steigerung mit konsekutiv erhöhter mRNA-Halbwertszeit vorliegen müsste.

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse für einen anti-hypertrophen Effekt durch IMD auf das Myokard und somit für eine protektive Funktion. Für diesen protektiven Einfluss spricht auch, dass IMD die Angiogenese stimuliert [125], worüber es zu einer Verbesserung der Myokardversorgung mit Sauerstoff und Energie beitragen kann.

5.4.2 Kalzium-Homöostase und Zellkontraktion

Diese Arbeit konnte keine signifikante Veränderung der SERCA-Expression in den linken und rechten Ventrikeln unter Normoxie sowie in den rechten Ventrikeln unter Ischämie nachweisen. Lediglich IMD high führte unter Ischämie zu einer signifikanten SERCA-Induktion in den linken Ventrikeln um 24% (p-Wert: 0,019) (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2).

Ca²⁺ ist das zentrale Element in der elektromechanischen Kopplung. Durch Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird die Kontraktilität der Myozyten gesteuert. Da die Ergebnisse der Analyse funktioneller Herzparameter in dieser Arbeit eine Beeinflussung der Myozytenkontraktilität durch IMD nahe legen (s. Kap. 5.2.1 und 5.2.2), stellt sich die Frage auf welchem Weg dies geschieht. Eine Möglichkeit, neben einer direkten Funktionsveränderung der kontraktilen Proteine (z.B. durch Phosphorylierung), stellt die Modulation des myozytären Ca²⁺-Haushaltes dar. Dong et al. gelang es einen solchen Effekt von IMD auf die zelluläre Ca²⁺-Homöostase nachzuweisen [117]. Sie fanden eine Steigerung der intrazellulären Ca2+-Konzentration sowie eine Steigerung der Ca²⁺-Clearence aus dem Zytoplasma. Ein wichtiges Enzym für diesen Abtransport von Ca²⁺ ist die SERCA, welche Ca²⁺ in der Diastole aus dem Zytoplasma in das endoplasmatische Retikulum (den zellulären Ca²⁺-Speicher) pumpt (s. Kap. 1.2.3). Durch Real-Time-PCR gelang in dieser Arbeit der Nachweis einer signifikanten SERCA-Induktion in linksventrikulären Myozyten unter Ischämie, nicht jedoch unter Normoxie. Der von Dong et al. beobachtete Einfluss von IMD auf die Ca²⁺-Homöostase wurde jedoch unter normoxen Bedingungen registriert [117]. Im Vergleich mit dieser Arbeit untersuchte diese Arbeitsgruppe direkt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, wohingegen hier speziell die SERCA-Expression detektiert wurde. Theoretisch schließen sich diese Ergebnisse nicht aus. Möglicherweise besitzt IMD unter physiologischen Bedingungen (wie unter Normoxie) nur eine relativ geringe Wirkung auf Kardiomyozyten und verändert so den myozytären Ca²⁺-Spiegel nur minimal. Vor diesem Hintergrund bestände für die Zellen keine Notwendigkeit mehr SERCA-Proteine zu synthetisieren, da sie die geringen Ca²⁺-Konzentrationsänderungen schon über eine Aktivitätsmodulation (z. B. durch Phosphorylierung) bereits vorhandener SERCA-Proteine vornehmen könnten. Dies würde erklären, warum in dieser Arbeit keine SERCA-Expressionsänderung durch IMD unter Normoxie nachgewiesen werden konnte. Jedoch unter pathologischen Bedingungen (wie unter Ischämie) käme eine Rekrutierung weiterer die Ca²⁺-Homöostase regulierender Mechanismen (wie die SERCA-Induktion) in Betracht. Dies konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Auf diesem Weg könnten ischämisch geschädigte Kardiomyozyten eine bessere Kontraktilität erlangen und so die Funktion des insuffizienten Herzens zu verbessern.

5.4.3 Apoptose

Unter normoxen Bedingungen konnte kein Einfluss des Peptidhormons IMD auf die Expression der Gene BAX, BCL2 und BCL XL nachgewiesen werden (s. Kap. 4.2.1). In den rechten Ventrikeln ischämischer Herzen führte IMD high zu einer signifikanten Steigerung der BCL2-Expression um 96% (p-Wert <0,001). In den linken Ventrikeln ischämischer Herzen führte IMD high zu einer signifikanten Steigerung der BAX-Expression um 60% (p-Wert < 0,05) (s. Kap. 4.2.2).

Wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, kann der programmierte Zelltod (Apoptose) durch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden. Dabei wird ein intrinsischer Signalweg von einem extrinsischen Signalweg unterschieden. Beide Signalwege laufen in einer gemeinsamen Endstrecke zusammen (s. Abb. 1.1). Die untersuchten Gene BAX, BCL2 und BCL XL kodieren für wichtige Proteine im intrinsischen Signalweg. Dieser Signalweg spielt in der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle, da Stimuli (wie die ischämisch bedingte Bildung freier Radikale, zunehmende Zelldehnung sowie Druckerhöhung im Ventrikel) zu seiner Induktion führen.

Verschiedene Artikel der letzten Jahre postulieren eine anti-apoptotische Funktion des IMD. So scheint IMD den ischämisch bedingten Zelluntergang von Myozyten zu verringern [108, 116, 119]. Aufgrund des verringerten Laktat-Dehydrogenase-, Malondialdehydrat-, Gesamtprotein- sowie Myoglobin-Austritts unter IMD₁₋₅₃-Substitution aus dem ischämischen Myokard wird ein verminderter Zelluntergang und somit eine protektive/anti-apoptotische Funktion dieses Peptidhormons geschlussfolgert. Auch auf andere Zelltypen scheint IMD anti-apoptotisch zu wirken: Pearson et al. konnten unter IMD eine reduzierte Caspasenaktivität oxidativ geschädigter Endothelzellen nachweisen [109]. Caspasen stellen die Endstrecke beider Signalwege der Apoptose dar (s. Abb. 1.1). Ihre reduzierte Aktivität spricht demnach für eine verminderte Apoptose. Chen et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen IMD und der Inhibition des intrinsischen Apoptoseweges [98]. Auch sie fanden eine verminderte Apoptoserate von oxidativ geschädigten Endothelzellen unter IMD-Einfluss. Als zugrunde liegenden Mechanismus vermuteten sie eine cAMP/PKA-abhängige BAD-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins BAD bewirkt über dessen Aktivitätsabnahme eine Apoptoseinhibition (s. Abb. 1.1). Song et al. beschrieb einen anti-apoptotischen Effekt von IMD₁₋₅₃ über einen PI3-K/Akt/GSK-Signalweg (s. Kap. 5.3) auf Kardiomyozyten [91]. Durch eine Akt-abhängige Phosphorylierung der pro-apoptotischen Kinase GSK wird diese in ihrer Funktion gehemmt und die Induktion der mitochondrialvermittelten Apoptose verhindert. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe auch eine Verschiebung des BCL2/BAX-Verhältnisses zugunsten des antiapoptotischen BCL2 registrieren. In der Summe sprechen diese Veröffentlichungen für eine anti-apoptotische Wirkung des IMD am Herzen. In dieser Arbeit konnte lediglich in den rechten Ventrikeln eine Induktion des antiapoptotischen Gens BCL2 gefunden werden. Dies ist bisher die erste Arbeit, die einen solchen Effekt explizit für den rechten Ventrikel beschreibt. In den, für die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bedeutsameren, linken Ventrikeln zeigte sich eine gesteigerte BAX-Expression und somit eine pro-apoptotische Wirkung des IMD₁₋₄₇. Diese Beobachtung steht konträr zu der oben beschriebenen wissenschaftlichen Auffassung einer anti-apoptotischen IMD-Wirkung. Die Ursache dieser gegensätzlichen Ergebnisse könnte die unterschiedliche Fokussierung von dieser Arbeit und den bisherigen Veröffentlichungen sein. Die oben erwähnten Studien analysierten primär die gemeinsame Endstrecke der beiden Signalwege und den resultierenden Zelluntergang [108, 109, 116, 119], wohingegen in dieser Arbeit die Expression einzelner Gene des intrinsischen Signalwegs untersucht wurde. Die Apoptose wird durch ein Zusammenspiel des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs induziert, wobei meist einer der beiden überwiegt und die Apoptose in Gang setzt. Somit könnte eine stärkere Hemmung des extrinsischen Signalwegs bei geringer Induktion des intrinsischen Signalwegs zu einer relativen Hemmung der gemeinsamen Endstrecke und so zu einem "Netto-Zellüberleben" führen. Insofern könnte IMD

eine Apoptosehemmung bedingen (wie durch obige Studien beschrieben), während das BAX-Gen trotzdem hoch reguliert ist (wie hier herausgefunden).

Die separate Betrachtung der einzelnen Signalwege (intrinsisch/extrinsisch) ist vor diesem Hintergrund problematisch, da diese unweigerlich zusammenhängen. Für weitere Untersuchungen mit diesem Fokus ist somit eine umfassende Untersuchung beider Signalwege, der gemeinsamen Endstrecke und des resultierenden Zelluntergangs empfehlenswert. Zusammengefasst hat IMD wahrscheinlich eine anti-apoptotische Funktion. Für einen auch möglichen pro-apoptotischen Einfluss von IMD (wie die BAX-Induktion zeigt) spricht die verminderte Herzkontraktilität unter IMD₁₋₄₇ (s. Kap. 5.2.2).

5.4.4 Herzinsuffizienzmarker

Unter IMD₁₋₄₇-Substitution konnte weder unter Normoxie noch unter Ischämie eine Genexpressionsänderung der Herzinsuffizienzmarker ANP und BNP nachgewiesen werden (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2).

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP sind neben anderen Plasmaproteinen wichtige Marker zur Bestimmung des Schweregrades der Herzinsuffizienz. Sie werden vom Myokard und unter erhöhter Wandspannung synthetisiert und freigesetzt. Durch ihre diuretische Funktion tragen sie zu einer Vorlast- und Nachlastsenkung bei (s. Kap. 1.2.3). Zum jetzigen Zeitpunkt sind wenige Veröffentlichungen über den Einfluss von IMD auf die Synthese bzw. Sekretion dieser Herzinsuffizienzmarker verfügbar. Charles et al. untersuchten die Wirkung von IMD auf die ANP- und BNP-Plasmakonzentration in Schafen [99]. Dabei konnten sie nach IMD-Infusion eine Anhebung der ANP- und BNP-Plasmakonzentration nachweisen. Dies führten sie auf eine Erhöhung des rechtsatrialen Drucks und einer daraus resultierenden erhöhten ANP und BNP Sekretion zurück. Eine Erhöhung der Synthese/Sekretion von ANP und BNP wäre auch durch eine Steigerung der Plasma-AT-II-Konzentration durch IMD möglich (s. Kap. 1.2.2) [32]. In dieser Arbeit konnte keine Expressionsänderung von ANP und BNP nach IMD₁₋₄₇-Substitution nachgewiesen werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es während der Versuchszeit im Langendorff-Apparat zu keiner Druckerhöhung in den Atrien und Ventrikeln gekommen ist. Auch das Perfusat der Langendorff-Herzen enthielt kein AT-II oder sonstige ANP- bzw. BNP-stimulierende Faktoren (s. Kap. 1.2.2), die zu einer Synthese/Sekretion dieser Herzinsuffizienzmarker hätten führen können. Vor diesem Hintergrund kann nur geschlussfolgert werden, dass IMD alleine weder unter Normoxie noch unter Ischämie zu einer Expressionsänderung von ANP und BNP führt.

5.5 Ausblicke und Therapieoptionen

In den letzten Jahren konnte das Peptidhormon IMD in zahlreichen Geweben nachwiesen werden, wobei die genauen Funktionen größtenteils noch nicht verstanden sind. Im kardio-vaskulären System legt die gesteigerte Expression unter pathologischen Bedingungen eine Beteiligung an kardiovaskulären Erkrankungen nahe [101]. Dies zu verstehen, stellt die Voraussetzung zukünftiger Therapieverfahren dar. Im kardio-vaskulären System wirkt IMD hauptsächlich hypotensiv und negativ chronotrop (s. Kap. 5.2) [80]. Bezüglich seines Einflusses auf die Herzkontraktilität und die postischämische Myokardschädigung besteht noch Uneinigkeit. In der Literatur sind sowohl protektive als auch negative Einflüsse von IMD auf die Herzfunktion beschrieben, wobei letztere auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten [101, 108]. Zu der kontroversen Datenlage hat u. a. die uneinheitliche Bezeichnung der verschiedenen IMD-Isoformen beigetragen (s. Kap. 1.4.3). So wäre es wünschenswert sich auf eine einheitliche Nomenklatur (IMD oder AM-2) zu einigen und die in den Experimenten verwendeten Isoformen genau zu bezeichnen. Der Einsatz von siRNA (RNA, die in die Genexpression der Zelle eingreift und zu einem selektiven Ausschalten einzelner Gene ("Gen-Knockout") führt) könnte beispielsweise in Zellkultur oder Tiermodellen zum besseren Verständnis der physiologischen IMD-Wirkung beitragen. Des Weiteren müsste geklärt werden, ob und inwiefern sich die Funktionen von systemisch zirkulierendem und im Erfolgsorgan selbst produziertem IMD voneinander unterscheiden und eventuell eine andere SO

physiologische/pathophysiologische Bedeutung haben. Ein weiterer, nicht vollends geklärter, Aspekt sind die Rezeptoren, über die IMD seine Signaltransduktion ausübt. Es mehren sich die Hinweise, dass IMD über CLR/RAMP1-3 an seine Zielzellen bindet. Die bisherigen Untersuchungen konnten jedoch nicht sicher verifizieren, über welchen CLR/RAMP1-3 IMD seine biologischen Funktionen ausübt. Zum genaueren Verständnis dieser Interaktion werden neue spezifische Rezeptorantagonisten benötigt, die selektiv CLR/RAMP1, CLR/RAMP2 oder CLR/RAMP3 blockieren. Auch das Vorhandensein eines weiteren IMD-spezifischen Rezeptors steht zur Diskussion [104, 120]. Auch die, den Rezeptoren nachgeschalteten, intrazellulären Signalwege werden derzeit noch kontrovers diskutiert. Es wurden neben cAMP-vermittelten Signalwegen auch Wege über NO, PI3-K und PKC beschrieben (s. Kap. 5.3). Die Daten dieser Arbeit legen einen cAMPunabhängigen Signalweg des IMD nahe. Zum Verständnis der IMD-vermittelten Signalwege sind weitere Untersuchungen nötig, die durch eine gezielte Ausschaltung einzelner Signalproteine die Signaltransduktion im Detail aufschlüsseln.

Das Ziel dieser Vorschläge ist die Verbesserung von Diagnostik und Therapie der Herzinsuffizienz. Anhand der gesteigerten Expression von IMD in geschädigtem Myokard, wäre der Einsatz dieses Peptidhormons als Herzinsuffizienzmarker neben den heute gebräuchlichen Markern ANP und BNP denkbar. Darüber hinaus könnte IMD auch als Therapeutikum in Frage kommen. Durch seine anti-hypertensive, die koronare Perfusion verbessernde, negativ Inotrope und anti-oxidative Funktion könnte es den Energieverbrauch des Herzens bei gesteigerter Energie- und Sauerstoffbereitstellung senken und eine die Zellschädigung durch freie Radikale vermindern. Aufgrund dieser Erkenntnisse besitzt IMD das Potential zukünftig als Diagnostikum bzw. Therapeutikum bei kardio-vaskulären Erkrankungen eingesetzt zu werden. Durch die derzeit noch bestehenden großen Lücken im Verständnis von Interaktion und Wirkung dieses Peptidhormons liegt der standardisierte Einsatz von IMD jedoch noch in weiter Ferne.

6. Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine chronische Erkrankung, die in der Regel mit einer akuten ischämischen Schädigung des Myokards beginnt und durch sekundäre Remodellingprozesse progredient verläuft. In jüngsten Studien wurde ein neues Peptidhormon der Kalzitonin-Peptidhormon-Familie namens Intermedin entdeckt, welches einerseits an der Regulation des kardiovaskulären Systems beteiligt ist, andererseits auch in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Das Ziel dieser Arbeit war, das Wirkungsprofil von Intermedin unter physiologischen als auch Bedingungen beleuchten pathologischen zu und mögliche Signaltransduktionswege näher zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurden Langendorff-Apparatur Rattenherzen in einer unter normoxen und ischämischen Bedingungen studiert und die Effekte einer temporären Intermedin- bzw. cAMP-Substitution auf die Herzfunktion sowie auf die Expression kardialer Gene untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung liefern Hinweise dafür, dass Intermedin sowohl unter Normoxie als auch unter Ischämie akut den systolischen und diastolischen Blutdruck, die ventrikuläre Druckdifferenz (zwischen systolischem und diastolischem Blutdruck) sowie den koronaren Perfusionsdruck signifikant reduziert und die Herzfrequenz steigert. Es konnte kein Einfluss von Intermedin auf die Entstehung eines Die mRNApostischämischen Herzödems nachgewiesen werden. Expressionsanalyse erbrachte in den linken und rechten Ventrikeln der normoxen Herzen keine signifikanten Veränderungen. Unter Ischämie war dagegen die Expression der Gene SERCA und BAX unter Intermedin-Einfluss und der Gene ANP, BNP, ODC, BCL2 und BCL XL unter cAMP-Einfluss in den linken Ventrikeln signifikant induziert. In den rechten Ventrikeln kam es unter Intermedin zu einer BCL2-Expressionssteigerung, unter cAMP zu einer Expressionssteigerung von ANP, ODC, BAX, und BCL2 und einer Expressionsminderung der SERCA. Die gewonnenen Herzfunktionsdaten legen eine protektive Funktion von Intermedin auf das Myokard nahe. Die Reduktion der myokardialen Kontraktilität in Verbindung mit einer gesteigerten koronaren

Perfusion könnte über einen effizienteren Energiehaushalt das Myokard vor weiteren Schäden bewahren. Nach aktuellem Wissensstand besteht noch Uneinigkeit bezüglich der Wirkung von Intermedin auf die Kontraktilität, wobei dies in den abweichenden Versuchsaufbauten begründet sein könnte. Ein weiterer kontrovers diskutierter Punkt ist die durch Intermedin angestoßene intrazelluläre Signalkaskade. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine cAMPunabhängige Signalübertragung nahe, wohingegen andere Studien cAMP als primären Second-Messenger von Intermedin sehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine NO-vermittelte, intrazelluläre Signaltransduktion schließen. Auf zellulärer Ebene scheint Intermedin die Pathogenese der Herzinsuffizienz über den zellulären Ca²⁺-Haushalt sowie über die Inhibition der Zellhypertrophie positiv zu beeinflussen. Überraschenderweise wirkt Intermedin über den intrinsischen Apoptosesignalweg pro-apoptotisch. Da keine Untersuchungen bezüglich der Endstrecke des jedoch Apoptosesignalwegs bzw. des tatsächlichen Zelluntergangs angestellt wurden, ist eine endgültige Beurteilung anhand der gewonnenen Daten nicht möglich. Sollten sich die positiven Effekte des Intermedins in zukünftigen Studien bestätigen, käme das Peptidhormon möglicherweise als neues Therapeutikum der akuten postischämischen Herzinsuffizienz in Frage. Darüber hinaus könnte es aufgrund seiner Expressionssteigerung in geschädigtem Myokard auch als diagnostischer Marker verwendet werden.

7. Summary

Heart failure is a chronic disease that usually begins with an acute ischemic injury of the myocardium and proceeds through secondary remodelling processes. Recently, a new peptide hormone of the calcitonin peptide hormone family called Intermedin was discovered, which is involved in the regulation of the cardiovascular system and is supposed to play an important role in the pathophysiology of heart failure. The aim of this study was to examine the action profile of Intermedin under physiological and pathological conditions and to describe possible signalling pathways. For this purpose, rat hearts were studied in a Langendorff apparatus under normoxic and ischemic conditions and the effects of a temporary Intermedin and cAMP-substitution on the cardiac function and the expression of cardiac genes were investigated. The results of this study provide evidence that Intermedin under either conditions, normoxia or ischemia, effect acute heart function parameters. It significantly reduced the systolic and diastolic blood pressure, ventricular pressure difference (between systolic and diastolic blood pressure) and coronary perfusion pressure, and it increased the heart rate. There was no influence of Intermedin visible at the development of a post-ischemic heart-oedema. The mRNA expression analysis did not provide any significant alteration within the left and right ventriculars of normoxic hearts. Under ischemic conditions, however the expression of the genes SERCA and BAX under Intermedin-influence and ANP, BNP, ODC, BCL2 and BCL-XL under cAMP-influence were significantly induced in the left ventriculars. In the right ventriculars, Intermedin caused an increase in BCL2expression, in contrast cAMP lead to an increase of ANP-, ODC-, BAX-, and BCL2-expression and an expression-decrease of SERCA. The collected heart function data suggest a protective role of Intermedin in the myocardium. The reduction of myocardial contractility in connection with an increased coronary perfusion could preserve the myocardium from further damage through a more efficient energy metabolism. In the current state of knowledge, disagreement exists regarding the effect of Intermedin on contractility, which might be caused by differences in the test set-ups of the distinct workgroups. Another controversial point is the intracellular signalling cascade initiated by Intermedin. Taken together, the results of this examination suggest a cAMP-independent signalling-pathway, whereas other studies regard cAMP as the primary second messenger of Intermedin. The results of this study suggest a NO-mediated intracellular signal-transduction. At the cellular level, Intermedin seems to affect the pathogenesis of heart failure in a positive manner through affecting the Ca2+-homeostasis and inhibiting cellular hypertrophy. Surprisingly Intermedin acts pro-apoptotic by activating the intrinsic apoptosis-signalling-pathway. However, since this study did not regard the final stage of the apoptosissignalling-pathway or the acute cell wastage, a final assessment is not possible. Should further studies confirm the positive effects of Intermedin, these peptide hormone may become a new therapeutic agent in acute ischemic heart failure. Furthermore it could also be used as a diagnostic marker, because of its increased expression in damaged myocardium.

8. Literatur

- 1. McMurray, J.J. and S. Stewart, *Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure.* Heart, 2000. **83**(5): p. 596-602.
- 2. WHO, *Physicians Guidlines for GPs.* 1995.
- 3. Senni, M. and M.M. Redfield, *Heart failure with preserved systolic function. A different natural history*? J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(5): p. 1277-82.
- 4. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology.* Bmj, 2000. **320**(7227): p. 104-7.
- 5. Weil, J. and H. Schunkert, *[Pathophysiology of chronic heart failure]*. Clin Res Cardiol, 2006. **95 Suppl 4**: p. 1-15; quiz 16-7.
- 6. Baig, M.K., et al., *The pathophysiology of advanced heart failure.* Heart Lung, 1999. **28**(2): p. 87-101.
- 7. Levy, D., et al., *The progression from hypertension to congestive heart failure.* Jama, 1996. **275**(20): p. 1557-62.
- 8. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.* J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
- 9. Katz, A.M., Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. N Engl J Med, 1990. **322**(2): p. 100-10.
- 10. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling.* Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
- 11. Pieske, B., et al., *Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy.* Circulation, 1995. **92**(5): p. 1169-78.
- 12. Bijnens, B. and G.R. Sutherland, *Myocardial oedema: a forgotten entity* essential to the understanding of regional function after ischaemia or reperfusion injury. Heart, 2008. **94**(9): p. 1117-9.
- 13. van den Berg, B.M., H. Vink, and J.A. Spaan, *The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema.* Circ Res, 2003. **92**(6): p. 592-4.
- 14. Garcia-Dorado, D. and J. Oliveras, *Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury?* Cardiovasc Res, 1993. **27**(9): p. 1555-63.
- 15. Fuchs, M. and H. Drexler, [Pathophysiology of chronic heart failure]. Internist (Berl), 2000. **41**(2 Pt 1): p. 93-104.

- Krown, K.A., et al., Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. J Clin Invest, 1996. 98(12): p. 2854-65.
- 17. Levine, B., et al., *Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure.* N Engl J Med, 1990. **323**(4): p. 236-41.
- 18. Schnabel, P. and M. Bohm, [Sympathetic activation in heart failure: A target of therapeutic approaches]. Z Kardiol, 1999. **88 Suppl 3**: p. S5-S11.
- 19. Gavras, I., A.J. Manolis, and H. Gavras, *The alpha2 -adrenergic receptors in hypertension and heart failure: experimental and clinical studies.* J Hypertens, 2001. **19**(12): p. 2115-24.
- Kaye, D.M., et al., Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. J Am Coll Cardiol, 1995. 26(5): p. 1257-63.
- 21. Bohm, M., [Pathophysiology of heart failure today]. Herz, 2002. 27(2): p. 75-91.
- Hausdorff, W.P., M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *Turning off the signal:* desensitization of beta-adrenergic receptor function. Faseb J, 1990. 4(11): p. 2881-9.
- 23. Communal, C., et al., Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. Circulation, 1999. **100**(22): p. 2210-2.
- Anavekar, N.S. and S.D. Solomon, Angiotensin II receptor blockade and ventricular remodelling. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2005. 6(1): p. 43-8.
- 25. Clauser, E., [Molecular structure and function of angiotensin ii receptors]. Nephrologie, 1998. **19**(7): p. 403-10.
- Wharton, J., et al., Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. J Pharmacol Exp Ther, 1998. 284(1): p. 323-36.
- Nakamura, Y., H. Makino, and R. Morishita, [Distribution and function of angiotensin receptor subtypes in cardiovascular system]. Nippon Rinsho, 1999. 57(5): p. 1032-5.
- 28. Lax, C.J., et al., *Transitory reduction in angiotensin AT2 receptor* expression levels in postinfarct remodelling in rat myocardium. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31**(8): p. 512-7.
- Iijima, K., et al., Alterations in sarcoplasmic reticulum and angiotensin II type 1 receptor gene expression after myocardial infarction in rats. Jpn Circ J, 1998. 62(6): p. 449-54.

- Diez, J., Effects of aldosterone on the heart: beyond systemic hemodynamics? Hypertension, 2008. 52(3): p. 462-4.
- 31. Baxter, G.F., *The natriuretic peptides.* Basic Res Cardiol, 2004. **99**(2): p. 71-5.
- Piechota, M., et al., Natriuretic peptides in cardiovascular diseases. Cell Mol Biol Lett, 2008. 13(2): p. 155-81.
- 33. Angermann, C.E. and G. Ertl, [Natriuretic peptides--new diagnostic markers in heart disease]. Herz, 2004. **29**(6): p. 609-17.
- Haynes, W.G., et al., Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. Circulation, 1996. 93(10): p. 1860-70.
- 35. Iglarz, M. and E.L. Schiffrin, *Role of endothelin-1 in hypertension.* Curr Hypertens Rep, 2003. **5**(2): p. 144-8.
- 36. Nambi, P., M. Clozel, and G. Feuerstein, *Endothelin and heart failure*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(4): p. 335-40.
- Brixius, K., et al., [Reverse remodeling of the intracellular Ca(2+)homeostasis: new concepts of pathophysiology and therapy of heart failure]. Wien Med Wochenschr, 2006. 156(7-8): p. 209-15.
- Chakraborti, S., et al., Calcium signaling phenomena in heart diseases: a perspective. Mol Cell Biochem, 2007. 298(1-2): p. 1-40.
- 39. Treinys, R. and J. Jurevicius, *L-type Ca2+ channels in the heart: structure and regulation.* Medicina (Kaunas), 2008. **44**(7): p. 491-9.
- Bito, V., et al., Crosstalk between L-type Ca2+ channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling. Cardiovasc Res, 2008. 77(2): p. 315-24.
- 41. Ochi, R. and S.A. Gupte, *Ryanodine receptor: a novel therapeutic target in heart disease.* Recent Patents Cardiovasc Drug Discov, 2007. **2**(2): p. 110-8.
- 42. Marx, S.O., et al., *PKA* phosphorylation dissociates *FKBP12.6* from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 2000. **101**(4): p. 365-76.
- 43. Marx, S.O., et al., Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). Circ Res, 2001. **88**(11): p. 1151-8.
- 44. Marks, A.R., S. Reiken, and S.O. Marx, *Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor?* Circulation, 2002. **105**(3): p. 272-5.

- 45. Hasenfuss, G., *Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure.* Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 279-89.
- 46. Pieske, B., et al., *Rate dependence of [Na+]i and contractility in nonfailing and failing human myocardium.* Circulation, 2002. **106**(4): p. 447-53.
- Baartscheer, A. and M.M. van Borren, Sodium ion transporters as new therapeutic targets in heart failure. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2008. 6(4): p. 229-36.
- 48. Barry, S.P., S.M. Davidson, and P.A. Townsend, *Molecular regulation of cardiac hypertrophy.* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2023-39.
- Tarone, G. and G. Lembo, Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy. Trends Mol Med, 2003. 9(9): p. 376-82.
- 50. Knowlton, K.U., et al., *The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy.* J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15374-80.
- 51. Bartolome, J., J. Huguenard, and T.A. Slotkin, *Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy.* Science, 1980. **210**(4471): p. 793-4.
- 52. Ainscough, J.F., et al., Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 592-600.
- 53. Pinson, A., et al., Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(4): p. 477-90.
- 54. McDermott, P.J., et al., Accelerated rates of ribosomal RNA synthesis during growth of contracting heart cells in culture. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 18220-7.
- 55. Schluter, K.D., X.J. Zhou, and H.M. Piper, *Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes.* Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 1): p. C1311-6.
- 56. Schluter, K.D., et al., *Central role for ornithine decarboxylase in betaadrenoceptor mediated hypertrophy.* Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 410-7.
- Igarashi, K., T. Kakegawa, and S. Hirose, Stabilization of 30 S ribosomal subunits of Bacillus subtilis W168 by spermidine and magnesium ions. Biochim Biophys Acta, 1982. 697(2): p. 185-92.

- Garg, S., J. Narula, and Y. Chandrashekhar, *Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target.* J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 73-9.
- 59. Narula, J., et al., *Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.* N Engl J Med, 1996. **335**(16): p. 1182-9.
- 60. Narula, J., F.D. Kolodgie, and R. Virmani, *Apoptosis and cardiomyopathy.* Curr Opin Cardiol, 2000. **15**(3): p. 183-8.
- 61. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart.* N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
- 62. Ferri, K.F. and G. Kroemer, Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. E255-63.
- 63. Jeong, S.Y. and D.W. Seol, *The role of mitochondria in apoptosis.* BMB Rep, 2008. **41**(1): p. 11-22.
- 64. Takemura, G. and H. Fujiwara, *Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction.* Pharmacol Ther, 2004. **104**(1): p. 1-16.
- 65. Hoppe, U.C., [Guideline satisfying therapy for chronic heart failure]. Internist (Berl), 2007. **48**(9): p. 929-37.
- 66. Ertl, G. and C.E. Angermann, [Therapy of chronic left heart failure]. Internist (Berl), 2007. **48**(1): p. 59-65; quiz 66-7.
- 67. Oliver, K.R., et al., *Distribution of novel CGRP1 receptor and adrenomedullin receptor mRNAs in the rat central nervous system.* Brain Res Mol Brain Res, 1998. **57**(1): p. 149-54.
- MacIntyre, I., *The calcitonin family of peptides.* Ann N Y Acad Sci, 1992.
 657: p. 117-8.
- Muff, R., W. Born, and J.A. Fischer, Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. Eur J Endocrinol, 1995. 133(1): p. 17-20.
- 70. Conner, A.C., et al., *Interaction of calcitonin-gene-related peptide with its receptors.* Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 451-5.
- 71. McDowell, G., et al., *The effect of the neutral endopeptidase inhibitor drug, candoxatril, on circulating levels of two of the most potent vasoactive peptides.* Br J Clin Pharmacol, 1997. **43**(3): p. 329-32.
- 72. Lisy, O., et al., *Neutral endopeptidase inhibition potentiates the natriuretic actions of adrenomedullin.* Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 2): p. F410-4.

- Chang, C.L., J. Roh, and S.Y. Hsu, Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: a comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates. Peptides, 2004. 25(10): p. 1633-42.
- Naot, D. and J. Cornish, The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. Bone, 2008. 43(5): p. 813-8.
- Lafont, A.G., S. Dufour, and M. Fouchereau-Peron, Evolution of the CT/CGRP family: comparative study with new data from models of teleosts, the eel, and cephalopod molluscs, the cuttlefish and the nautilus. Gen Comp Endocrinol, 2007. 153(1-3): p. 155-69.
- 76. Preibisz, J.J., *Calcitonin gene-related peptide and regulation of human cardiovascular homeostasis.* Am J Hypertens, 1993. **6**(5 Pt 1): p. 434-50.
- 77. Fontes-Sousa, A.P., et al., *Effects of adrenomedullin on systolic and diastolic myocardial function.* Peptides, 2008. **30**(4):p. 796-802
- 78. Yanagawa, B. and N. Nagaya, *Adrenomedullin: molecular mechanisms* and its role in cardiac disease. Amino Acids, 2007. **32**(1): p. 157-64.
- 79. Li, Y., et al., Adrenomedullin is a novel adipokine: adrenomedullin in adipocytes and adipose tissues. Peptides, 2007. **28**(5): p. 1129-43.
- Roh, J., et al., Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. J Biol Chem, 2004. 279(8): p. 7264-74.
- Takei, Y., et al., Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. FEBS Lett, 2004. 556(1-3): p. 53-8.
- 82. Poyner, D.R., et al., International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 233-46.
- Sexton, P.M., et al., Complexing receptor pharmacology: modulation of family B G protein-coupled receptor function by RAMPs. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1070: p. 90-104.
- 84. Chen, W.J., et al., *Expression cloning and receptor pharmacology of human calcitonin receptors from MCF-7 cells and their relationship to amylin receptors.* Mol Pharmacol, 1997. **52**(6): p. 1164-75.
- 85. McLatchie, L.M., et al., *RAMPs regulate the transport and ligand specificity* of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature, 1998. **393**(6683): p. 333-9.

- Bell, D. and B.J. McDermott, Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. Br J Pharmacol, 2008. 153 Suppl 1: p. S247-62.
- Hay, D.L., et al., *Pharmacological discrimination of calcitonin receptor:* receptor activity-modifying protein complexes. Mol Pharmacol, 2005.
 67(5): p. 1655-65.
- Kuwasako, K., et al., Characterization of the human calcitonin generelated peptide receptor subtypes associated with receptor activitymodifying proteins. Mol Pharmacol, 2004. 65(1): p. 207-13.
- 89. Ren, Y.S., et al., Intermedin 1-53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats. Peptides, 2006. **27**(1): p. 74-9.
- Kandilci, H.B., B. Gumusel, and H. Lippton, Intermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) relaxes rat main pulmonary arterial rings via cGMP-dependent pathway: role of nitric oxide and large conductance calcium-activated potassium channels (BK(Ca)). Peptides, 2008. 29(8): p. 1321-8.
- 91. Song, J.Q., et al., Activation of Akt/GSK-3beta signaling pathway is involved in intermedin(1-53) protection against myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion. Apoptosis, 2009. **14**(9): p. 1061-9.
- 92. Morimoto, R., et al., *Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney.* Peptides, 2007. **28**(5): p. 1095-103.
- Taylor, M.M., S.L. Bagley, and W.K. Samson, Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. 288(4): p. R919-27.
- Taylor, M.M. and W.K. Samson, Stress hormone secretion is altered by central administration of intermedin/adrenomedullin-2. Brain Res, 2005. 1045(1-2): p. 199-205.
- 95. Fujisawa, Y., et al., *Roles of adrenomedullin 2 in regulating the cardiovascular and sympathetic nervous systems in conscious rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(3): p. H1120-7.
- Burak Kandilci, H., et al., Intermedin/adrenomedullin-2 dilates the rat pulmonary vascular bed: dependence on CGRP receptors and nitric oxide release. Peptides, 2006. 27(6): p. 1390-6.
- Hagiwara, M., et al., Intermedin ameliorates vascular and renal injury by inhibition of oxidative stress. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. 295(6): p. F1735-43.
- 98. Chen, L., et al., Adrenomedullin 2 protects rat cerebral endothelial cells from oxidative damage in vitro. Brain Res, 2006. **1086**(1): p. 42-9.

- Charles, C.J., M.T. Rademaker, and A.M. Richards, Hemodynamic, hormonal, and renal actions of adrenomedullin-2 in normal conscious sheep. Endocrinology, 2006. 147(4): p. 1871-7.
- 100. Fujisawa, Y., et al., *Effects of adrenomedullin 2 on regional hemodynamics in conscious rats.* Eur J Pharmacol, 2007. **558**(1-3): p. 128-32.
- 101. Pan, C.S., et al., Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin 2. Peptides, 2005. 26(9): p. 1640-6.
- 102. Sabine, D., Endothelabhängige Dilatation von Kaninchencoronarien nach hypothermen Konservierungsverfahren mit und ohne Sauerstoffpersufflation, in DISSERTATION. 2007. Tierärztliche Hochschule Hannover
- 103. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
- 104. Hashimoto, H., et al., Adrenomedullin 2 (AM2)/intermedin is a more potent activator of hypothalamic oxytocin-secreting neurons than AM possibly through an unidentified receptor in rats. Peptides, 2007. **28**(5): p. 1104-12.
- 105. Zeng, Q., et al., Upregulated expression of intermedin and its receptor in the myocardium and aorta in spontaneously hypertensive rats. Peptides, 2009. 30(2): p. 391-9.
- 106. Bell, D., et al., Differential effects of an anti-oxidant intervention on cardiomyocyte expression of adrenomedullin and intermedin and their receptor components in chronic nitric oxide deficiency. Cell Physiol Biochem, 2007. 20(5): p. 269-82.
- 107. Hirose, T., et al., *Increased expression of adrenomedullin 2/intermedin in rat hearts with congestive heart failure.* Eur J Heart Fail, 2008. **10**(9): p. 840-9.
- 108. Yang, J.H., et al., *Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(3): p. 713-9.
- Pearson, L.J., et al., Intermedin (adrenomedullin-2): a potential protective role in human aortic endothelial cells. Cell Physiol Biochem, 2009. 23(1-3): p. 97-108.
- 110. Bell, D., et al., *Expression of the counter-regulatory peptide intermedin is augmented in the presence of oxidative stress in hypertrophied cardiomyocytes.* Cell Physiol Biochem, 2008. **21**(5-6): p. 409-20.
- 111. Bell, D., et al., Influence of atenolol and nifedipine on nitric-oxide deficient cardiomyocyte hypertrophy and expression of the cardio-endocrine peptide intermedin and its receptor components. Cell Physiol Biochem, 2008. 21(1-3): p. 203-14.

- 112. Fujisawa, Y., et al., *Renal effects of a new member of adrenomedullin family, adrenomedullin2, in rats.* Eur J Pharmacol, 2004. **497**(1): p. 75-80.
- 113. Abdelrahman, A.M. and C.C. Pang, *Effect of intermedin/adrenomedullin-2* on venous tone in conscious rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006. **373**(5): p. 376-80.
- 114. Abdelrahman, A.M. and C.C. Pang, Vasodilator mechanism of intermedin/adrenomedullin-2 in anesthetized rats. Proc West Pharmacol Soc, 2007. **50**: p. 43-6.
- 115. Kobayashi, Y., et al., *Coronary vasodilatory response to a novel peptide, adrenomedullin 2.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31 Suppl 2**: p. S49-50.
- Jia, Y.X., et al., Intermedin1-53 protects the heart against isoproterenolinduced ischemic injury in rats. Eur J Pharmacol, 2006. 549(1-3): p. 117-23.
- 117. Dong, F., et al., Intermedin (adrenomedullin-2) enhances cardiac contractile function via a protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathway in murine ventricular myocytes. J Appl Physiol, 2006. **101**(3): p. 778-84.
- 118. Bell, D. and B.J. McDermott, *Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance.* Pharmacol Rev, 1996. **48**(2): p. 253-88.
- 119. Yang, J.H., et al., *Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts.* Peptides, 2005. **26**(3): p. 501-7.
- 120. Taylor, M.M., S.L. Bagley, and W.K. Samson, *Intermedin/Adrenomedullin-2 inhibits growth hormone release from cultured, primary anterior pituitary cells.* Endocrinology, 2006. **147**(2): p. 859-64.
- 121. Lin Chang, C., et al., *Intermedin functions as a pituitary paracrine factor regulating prolactin release.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(11): p. 2824-38.
- 122. Yang, J.H., et al., Intermedin(1-53) inhibits rat cardiac fibroblast activation induced by angiotensin II. Regul Pept, 2009. **158**(1-3): p. 19-25
- 123. Yang, J.H., et al., Intermedin1-53 activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(2): p. 567-72.
- 124. Smith Jr, R.S., et al., *Intermedin is a New Angiogenic Growth Factor.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. 1040-47
- 125. Kindt, F., et al., *Intermedin: a skin peptide that is downregulated in atopic dermatitis.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 605-13.

9. Erklärung

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

Giessen, 20. Februar 2011

Gerald Münzel

10. Anhang

10.1 Veröffentlichungen

Münzel, G.; Schreckenberg R.; Schlüter K.-D.

Intermedin, a hypoxia-regulated cardiac gene, worsens post-ischemic recovery and increases the susceptibility to apoptosis Acta Physiologica 2009; Volume 195, Supplement 669 :P171

10.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit.

Weiterer Dank gebührt Herrn Dr. Rolf Schreckenberg, der mir jeder Zeit bei Problemen und Fragen zur Seite gestanden hat.

Außerdem möchte ich mich bei den technischen Assistenten bedanken, ohne die eine solche Arbeit nicht durchzuführen wäre, besonders bei Frau Nadine Woitasky, für ihre Hilfe bezüglich molekularbiologischen Fragestellungen und bei Herrn Peter Volk für seine tatkräftige und geduldige Unterstützung bei der Arbeit am Langendorff-Apparat.

Anna danke ich für die zuverlässige, tatkräftige Unterstützung während der gesamten Zeit sowie für die unzähligen Stunden der Korrektur.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Rückhalt und Unterstützung ich nie soweit gekommen wäre.







VVB LAUFERSWEILER VERLAG STAUFENBERGRING 15 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de www.doktorverlag.de

