

Einfluss von CGRP auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmuskelzellen

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

vorgelegt von

Alexander Schlier

**aus
Giessen**

Gießen, 2009

Aus dem Institut für Physiologie

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

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Dill

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Brosig

Tag der Disputation: 26.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Kapitel: Einleitung	2
1.1 Definition und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	2
1.2 Calcitonin gene-related Peptide (CGRP)	4
1.3 Adrenomedullin (ADM)	6
1.4 Amylin	8
1.5 Intermedin (IMD)	9
1.6 Vergleich	10
1.7 Methodische Voraussetzungen zur Untersuchung der Zellkontraktion	12
1.8 Fragestellung	13
2. Kapitel: Material	14
2.1. Chemikalien	14
2.2 Medien	15
2.3 Puffer	16
2.4 Geräte und Laborbedarf	16
2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur	16
2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion	17
2.4.3 Langendorff - System	17
2.4.4 Sonstige Geräte	17
2.4.5 Verbrauchsmaterialien	17
2.4.6 Software	18
3. Kapitel: Methoden	19
3.1 Versuchstiere	19

	3.1.1	Präparation isolierter Kardiomyozyten aus Rattenherzen	19
3.2		Zellkultur	20
	3.2.1	Vorplattieren	20
	3.2.2	Ausplattieren	20
3.3		Messung der Kardiomyozytenkontraktionen an isolierten Zellen	21
	3.3.1	Vorbereitung der Kultur	21
	3.3.2	Messvorgang der elektrischen Stimulation der Kardiomyozyten	21
	3.3.3	Messvorgang der Kontraktionswerte	22
	3.3.4	Messprotokoll	25
3.4		Messung der Parameter am isoliert perfundiertem Herzen	25
	3.4.1	Langendorff Modell	25
	3.4.2	Versuchsaufbau	26
	3.4.3	Vorbereitung der Langendorff Perfusionsanlage	26
	3.4.4	Präparation der Rattenherzen	26
	3.4.5	Aufzeichnen der Versuchsparameter	27
	3.4.6	Versuchsprotokoll	28
3.5		Statistik	28
 4. Kapitel: Ergebnisse			 29
4.1		Akutwirkung von CGRP- α auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	29
	4.1.1	Stimulation mit 0,5 Hz	29
	4.1.2	Stimulation mit 1 Hz	30
	4.1.3	Stimulation mit 2 Hz	31
4.2		Akutwirkung von CGRP- β auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	31
4.3		Akutwirkung von CGRP- $\alpha(8-37)$ auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	33
4.4		Antagonisierung der Akutwirkung von CGRP- α auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten mit CGRP- $\alpha(8-37)$	35

4.5	Einfluss der Hemmung der Proteinkinase A-Aktivierung mittels H89 auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten bei Akutwirkung von CGRP	37
4.6	Akutwirkung von CGRP auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten unter dem Einfluss von Indomethacin bzw. L-NA	39
4.7	Die Akutwirkung von CGRP- α auf Wistar-Ratten Herzen im Langendorff-System	41
4.7.1	Einfluss auf den linksventrikulären entwickelten Druck (LVDP)	41
4.7.2	Einfluss auf Herzfrequenz und Frequenz-Druck Produkt	42
4.7.3	Einfluss auf den Perfusionsdruck	43
4.8	Einfluss von Atenolol bzw. L-NA auf die Akutwirkung von CGRP- α im Langendorff-System mit Wistar-Ratten Herzen	44
4.8.1	Wirkung auf den linksventrikulären entwickelten Druck (LVDP)	44
4.8.2	Wirkung auf die Herzfrequenz	44
4.8.3	Wirkung auf das Frequenz-Druck Produkt	45
4.9	Akutwirkung von CGRP- α , unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von Wistar Ratten	46
4.10	Akutwirkung von CGRP- α , unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten aus spontan hypertensiven Ratten (SHR)	48
4.11	Die Akutwirkung von CGRP- α auf SHR Herzen im Langendorff-System	50
4.11.1	Einfluss auf den linksventrikulären entwickelten Druck (LVDP)	50
4.11.2	Einfluss auf Herzfrequenz und Frequenz-Druck Produkt	51
4.11.3	Einfluss auf den Perfusionsdruck	52
4.12	Akutwirkung von Intermedin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	53
4.13	Einfluss der Hemmung der Proteinkinase A-Hemmung mittels H89 auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten bei Akutwirkung von Intermedin	55
4.14	Akutwirkung von Adrenomedullin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	57
4.15	Die Akutwirkung von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf Herzmuskelzellen von Wistar Ratten im Langendorff-System	59

4.15.1	Einfluss auf linksventrikulären Druckanstieg, Herzfrequenz und Frequenz-Druck Produkt	59
4.15.2	Einfluss auf den Perfusionsdruck	60
4.16	Akutwirkung von Intermedin und Adrenomedullin, unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von Wistar Ratten	61
4.17	Akutwirkung von Intermedin und Adrenomedullin, unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von SHR	63
4.17.1	Stimulation mit 0,5 Hz	63
4.17.2	Stimulation mit 1,0 Hz	64
4.17.3	Stimulation mit 2,0 Hz	65
4.18	Die Akutwirkung von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf Herzmuskelzellen von SHR im Langendorff-System	65
4.18.1	Einfluss auf den linksventrikulären Druckanstieg	65
4.18.2	Einfluss auf HR und Frequenz-Druck Produkt	66
4.18.3	Einfluss auf den Perfusionsdruck	67
4.19	Akutwirkung von Amylin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	68
4.20	Akutwirkung von Amylin(8-37) auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten	70
4.20.1	Stimulation mit 0,5 Hz und 1,0 Hz	70
4.20.2	Stimulation mit 2,0 Hz	71
4.21	Akutwirkung von Amylin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten unter dem Einfluss von L-NA	72
4.22	Die Akutwirkung von Amylin auf Herzmuskelzellen von Wistar Ratten im Langendorff-System	73
4.22.1	Einfluss auf den linksventrikulären Druckanstieg und das Frequenz-Druck Produkt	73
4.22.2	Einfluss auf die Herzfrequenz und den Perfusionsdruck	74
4.23	Die Akutwirkung von Amylin und Isoprenalin auf den linksventrikulären Druckanstieg von Wistar Ratten im Langendorff-System unter Blockierung mit Atenolol	76
4.23.1	Änderung des LVDP bei Amylin und Atenolol	76
4.23.2	Änderung des LVDP bei Isoprenalin und Atenolol	76
4.24	Wirkung von Angiotensin II auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von Wistar Ratten unter Amylin	77

4.25	Akutwirkung von Angiotensin II unter Zugabe von Amylin, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von SHR	78
4.26	Die Akutwirkung von Amylin auf Kardiomyozyten von SHR im Langendorff-System	79
4.26.1	Einfluss auf den linksventrikulären Druckanstieg und das Frequenz-Druck Produkt	79
4.26.2	Einfluss auf die Herzfrequenz	80
4.26.3	Einfluss auf den Perfusionsdruck	81
4.27	Zusammenfassender Vergleich der Untersuchungen an den Peptiden aus der CGRP Familie	82
5. Kapitel: Diskussion		83
5.1	Hauptbefunde	83
5.2	Die Rolle von CGRP auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten	84
5.3	Adrenomedullin und seine Wirkung auf Kardiomyozyten	86
5.4	Auswirkungen von Intermedin auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten	89
5.5	Die kontraktile Effekte durch Amylin	87
5.6	Schlussfolgerung	90
6. Kapitel: Zusammenfassung		92
7. Kapitel: Summary		93
8. Literaturverzeichnis		95
9. Danksagung		102
10. Lebenslauf		103
11. Erklärung		104

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
ADM	Adrenomedullin
AM	Adrenomedullin Rezeptor
AM-2	Adrenomedullin 2
Amy ₁₋₃	Amylin Rezeptor
Amylin(8-37)	Acetyl-Amylin (8-37)
Ang II	Angiotensin II
AS	Aminosäure
Ate	Atenolol
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related Peptide
CT	Calcitonin Rezeptor
CL	Calcitoninreceptor-like receptor
FCS	Fetal-Calf-Serum
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
IAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid
IMD	Intermedin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Iso	Isoprenalin
l	Gefäßlänge
LVDP	left ventricular developed pressure
L-Diast	diastolische Zellverkürzung
L-NA	Nitro-L-arginine
NO	Stickstoffmonoxid
P _{sys}	systolischer Druck
P _{dias}	diastolischer Druck
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal 20-Peptid
PP	Aortendruck
Δp	Änderung des Perfusionsdrucks
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
R	Strömungswiderstand
r	Radius
RAMP	Receptor activity modifying protein
Stab.	Stabilisierung
TTP	Time-to-Peak
η	Viskosität
φ	konstanter Fluss

1. Einleitung

1.1 Definition und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Herz-Kreislauf Erkrankungen stehen in den westlichen Industrieländern unter den häufigsten Todesursachen an erster Stelle (Destatis 2005). Die Herzinsuffizienz stellt einen großen Anteil davon.

Unter dem Begriff Herzinsuffizienz versteht man einen Krankheitszustand unterschiedlicher Ätiologie. Es ist eine Multisystemerkrankung mit Beeinträchtigung der Funktion vor allem von Herz, Kreislauf, Nieren, Lunge und Skelettmuskulatur. Die Herzinsuffizienz kann definiert werden als Unvermögen des Herzens, bei ausreichendem venösem Volumenangebot und unter normalen Füllungsbedingungen, ausreichend Blut in die peripheren Gewebe / Organe zu fördern. Man unterscheidet zwischen akuten und chronischen Formen. Zu einer akuten Linksherzinsuffizienz führen zum Beispiel ein neu aufgetretener Myokardinfarkt oder eine hypertensive Krise.

Ein progredienter Verlauf mit meist ausgeprägter myokardialer Schädigung ist bei der chronischen Form zu finden. Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist heute die häufigste Ursache für die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz. Es können jedoch auch andere Krankheiten wie Hypertonus, Klappenvitien, Kardiomyopathien, Herzrhythmusstörungen und Myokarditiden für dieses Auftreten verantwortlich sein (Bourassa et al., 1992; Cowie et al., 1999; Lip et al., 2000). Folgen dieser Herzfunktionsminderung äußern sich als Veränderung der Kontraktilität, Herzfrequenz, Vorlast oder Nachlast. Als Prädiktor für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz mit erhöhter Morbidität und Mortalität gilt die Myokardhypertrophie (Levy et al., 1990).

Desweiteren lassen sich die Ventrikelfunktionsstörungen in systolisch und diastolisch untergliedern. Ursachen der systolischen Störungen finden sich bei Kontraktionsschwäche (dilatative Kardiomyopathie, Myokarditis, KHK), Volumenbelastung durch Shuntvitien oder Klappeninsuffizienzen, und bei Druckbelastungen (Klappenstenosen, arterielle Hypertonie, pulmonale Hypertonie). Die diastolischen Ventrikelfunktionsstörungen treten im Rahmen von konstriktiver Perikarditis oder restriktiver Kardiomyopathie auf, welche zu einer Behinderung der Ventrikelfüllung führen (Goebell et al., 1992).

Ergebnisse aus klinischen und experimentellen Studien zeigten, dass es bei der Herzinsuffizienz zu Änderungen der intrazellulären Signaltransduktion und Konzentration

von neurohumoralen Mediatoren kommt. Durch eine erhöhte kardiale Wandspannung, Barorezeptorenaktivierung und Gewebsminderperfusion werden vasokonstriktorische Mediatoren wie Noradrenalin, Angiotensin II, Vasopressin und Endothelin ausgeschüttet (Chidsey et al., 1962; Dzau et al., 1981; Kojima, 1966; Stewart et al., 1992). Diese Kompensationsmechanismen dienen der Aufrechterhaltung des systemischen Blutdrucks und Verbesserung der kardialen Leistung durch ein erhöhtes Volumenangebot und erhöhte myokardiale Kontraktilität. Die genannten Veränderungen erlauben jedoch nur eine kurzfristige Stabilisierung der Herzfunktion und der Organperfusion. Die chronische Aktivierung der Mechanismen führt zu einer Salz- und Volumenbelastung, Nachlasterhöhung und Fibroblastenproliferation, welche die kardiale Pumpschwäche verstärkt und letztlich in einem Circulus vitiosus endet, der zur Progression der Herzinsuffizienz führt (Abb. 1.1.1).

Es wurden andererseits Gegenspieler identifiziert, die eine kompensatorische Wirkung im Rahmen der neurohumoralen Aktivierung haben. Sie besitzen einen vasodilatatorischen, natriuretischen und anti mitogenen Effekt. Wie in der Abbildung 1.1.2 zu sehen, gehören zu diesen Mediatoren ANP, BNP, Adrenomedullin, Bradykinin und Prostaglandine. Ziel der heutigen Herzinsuffizienztherapie ist es demnach, den Circulus vitiosus durch gezielte Mediatorenbeeinflussung, zu durchbrechen.

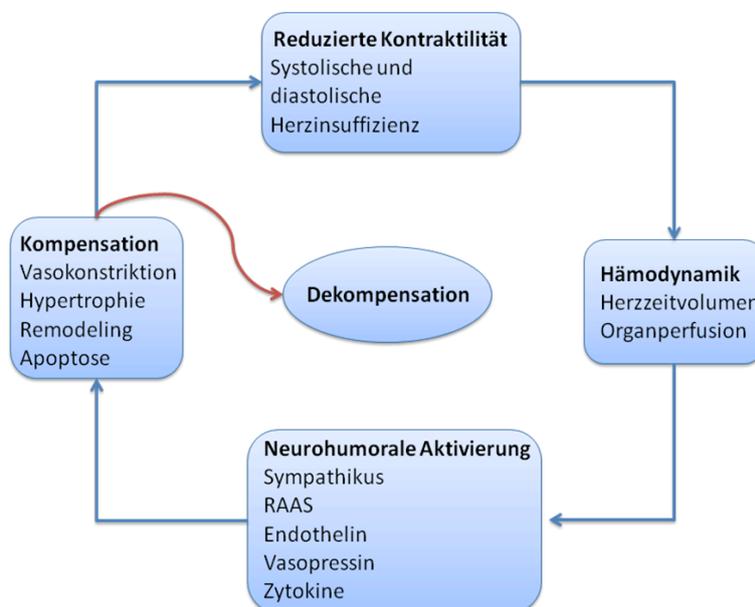


Abb. 1.1.1: Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz, modifiziert nach „Therapie der Herzinsuffizienz“, Prof. Strödter, UNI.MED Verlag 2000

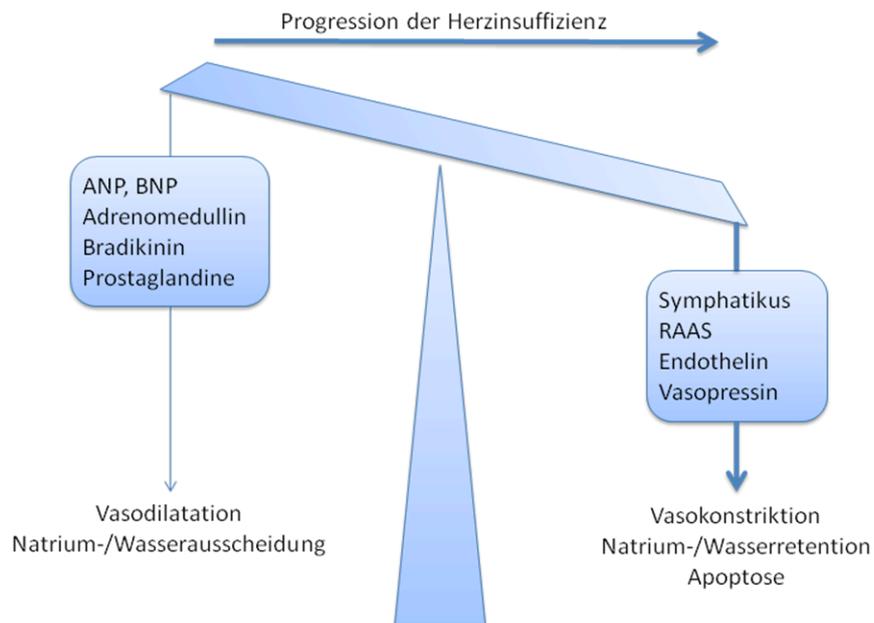


Abb. 1.1.2: Neurohormonale Aktivierung bei Herzinsuffizienz, modifiziert nach P. Rickenbacher, Herzinsuffizienz: Epidemiologie, Pathophysiologie, Swiss Medical Forum Nr. 1/2 10. Januar 2001

1.2 Calcitonin gene-related Peptide (CGRP)

Das Calcitonin gene-related Peptide (CGRP) ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid und gehört gemeinsam mit Calcitonin, Adrenomedullin, Amylin und Intermedin, welche weiter unten einzeln besprochen werden, zu einer Familie (Oliver et al., 1998). Diese Polypeptide weisen strukturelle und biologische Gemeinsamkeiten auf.

Es gibt zwei verschiedene CGRP Formen, welche sich lediglich in drei Aminosäuren voneinander unterscheiden (Abb. 1.6.1). Das zunächst entdeckte wird heute CGRP- α genannt. CGRP- β bezeichnet man das Produkt, welches durch gewebespezifisches alternatives Spleißen der mRNA entsteht. Beide CGRP Formen weisen bisher keinen festgestellten Unterschied hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität auf. Wie bereits genannt entsteht durch alternatives Spleißen das jeweilige Peptid. Man versteht darunter das Herausschneiden von Introns und Kombinieren bestimmter Exons, woraus dann eine fertige mRNA entsteht, welche transkribiert werden kann. Werden die Exons 1, 2, 3, und 4 in thyroidalen C-Zellen transkribiert und danach translatiert entsteht Calcitonin. CGRP- α ist das Endprodukt der Kombination von Exon 1, 2, 3, 5 und 6 im Nervengewebe.

Es wurden zwei Subtypen von CGRP Rezeptoren klassifiziert und als CGRP 1 bzw. CGRP 2 bezeichnet, welche die physiologischen und pathophysiologischen Effekte des CGRP

vermitteln. Die Einteilung der Subtypen basiert auf der Affinität zu CGRP α (8-37) wobei zu CGRP 1 Rezeptoren eine hohe und zu CGRP 2 keine Affinität besteht. Dem Peptid CGRP α (8-37) fehlen die ersten sieben Aminosäuren und es hat eine antagonistische Wirkung zu CGRP (Verheggen et al., 2005). Hieraus lässt sich schließen, dass die Aminosäuren 1-37 eine entscheidene Rolle für die Effekte bzw. Wirkung des CGRP Moleküls einnehmen (Yoshimoto et al., 1998). In diesem C-terminalen Bereich befindet sich eine Disulfidbrücke, welche für die Sekundärstruktur des Moleküls verantwortlich sein könnte (Abb. 1.6.1).

Forschungen haben gezeigt, dass es noch weitere Rezeptoren der CGRP 1 Klasse gibt, zum Beispiel RCD 1 im Hippokampusbereich der Ratte und ein mit dem Calcitonin-Rezeptor (CT) verwandter Rezeptor namens Calcitonin receptor-like receptor (CL), welcher ebenfalls im Rattenhirn gefunden wurde. Oliver et al., beschrieben 1998 in ihrer Arbeit, dass das humane Homolog von CL die pharmakologischen Eigenschaften der CGRP 1 Klasse besitzt. Der CL ist durch Proteine modulierbar und kann dadurch z.B. als CGRP 1 Rezeptor oder als Adrenomedullin Rezeptor fungieren. Diese modulierenden Proteine werden als RAMPs (Receptor activity modifying proteins) bezeichnet, welche integrale Membranproteine sind und aus einem langen extrazellulär gelegenen N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulär gelegenen C-Terminus bestehen. Es sind 3 verschiedene RAMPs beschrieben worden, welche mit dem Calcitonin Rezeptor und dem Calcitonin receptor-like receptor interagieren (Foord et al., 1999). Der Rezeptor wird ohne RAMP Beteiligung CT genannt, da er in diesem Zustand sensitiv für Calcitonin ist. Bei egal welcher Anwesenheit von RAMP wird der CT sensitiv für Amylin. Es entsteht ein CGRP sensibler Rezeptor wenn RAMP 1 vorhanden ist. Werden in einer Zelle CL und RAMP 1 exprimiert, kommt es unter Zugabe von CGRP zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels in der Zelle (Cueille et al., 2002), bei alleinigem Vorhandensein der jeweiligen Moleküle konnte keine signifikante Reaktion gemessen werden.

Die CGRP Agonisten oder Antagonisten werden derzeit noch nicht in der Prophylaxe oder Therapie von Erkrankungen eingesetzt. Durch einen vasorelaxierenden Effekt und Einfluss auf die Inotropie am Herzen (Katori et al., 2005) werden die CGRP Agonisten als etwaige Arzneistoffe in der Therapie von KHK, pulmonaler Hypertension oder peripherer Durchblutungsstörungen angesehen.

1.3 Adrenomedullin (ADM)

Dieses Peptid ist im Zusammenhang mit dem oben genannten CGRP zu sehen. Adrenomedullin wurde 1993 von Kitamura et al. in menschlichen Phäochromozytom Gewebe entdeckt und zeigte eine stark gefäßerweiternde Wirkung. Aufgrund des Vorhandenseins im Nebennierenmark gab man dem neuen Peptid den Namen Adrenomedullin. Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch in anderen Geweben, insbesondere im Bereich des Herz-Kreislaufsystems, der Lunge und den Nieren, mehr oder weniger Adrenomedullin synthetisiert wird (Hinson et al., 2000; Sakata et al., 1994).

Das menschliche Adrenomedullin besteht aus 52 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke zwischen der sechzehnten und einundzwanzigsten Aminosäure. Diese Brücke führt zur Ausbildung eines charakteristischen 6-Aminosäureringes, den Adrenomedullin mit den Peptiden der CGRP Familie gemeinsam hat. Anhand der Abbildung 1.6.1 lassen sich die Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz vergleichen.

Adrenomedullin entsteht aus einem Vorläuferprotein Namens Präproadrenomedullin, welches vom ADM Gen kodiert wird. Dieses Gen ist beim Menschen auf Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus vier Exons und drei Introns (Ishimitsu et al., 1994). Das humane Präproadrenomedullin besteht aus 185 Aminosäuren und enthält eine 21 AS lange Signalsequenz am N-Terminus. Nach der Abspaltung der Signalsequenz erhält man Proadrenomedullin, bestehend aus insgesamt 164 AS. Im nächsten Schritt des posttranslationalen Prozessierens entstehen die beiden biologisch aktiven Peptide Adrenomedullin und Proadrenomedullin N-terminal 20-Peptid (PAMP).

Man ging zunächst davon aus, dass die Wirkungen von Adrenomedullin wegen der strukturellen Ähnlichkeit zu CGRP über die bereits bekannten CGRP Rezeptoren vermittelt würden. Bestärkt wurde diese Annahme durch Versuche, bei denen CGRP α (8-37), ein CGRP-Rezeptor-Antagonist, diverse Wirkungen von Adrenomedullin blockierte (Nuki et al., 1993). In weiteren Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass CGRP α (8-37) nicht alle Effekte des ADM aufhebt. Edwards et al. schlossen daher auf die Existenz von zwei unterschiedlichen Rezeptortypen. Einen ADM Rezeptor mit hoher Affinität für Adrenomedullin und geringer Affinität für CGRP und einen CGRP Rezeptor mit niedriger Affinität für Adrenomedullin und hoher Affinität für CGRP. In Untersuchungen von Eguchi et al. 1994 konnten mittels Rezeptor Bindungs-Assays Rezeptoren nachweisen, welche eine 23fach höhere Affinität für Adrenomedullin im Vergleich zu CGRP hatten. Aus diesen Ergebnissen schloss man auf das Vorhandensein von eigenen ADM Rezeptoren. Mittels radioaktiv markiertem ADM wurde in verschiedenen Organen, zum Beispiel Herz, Lunge,

Leber, Milz und Muskulatur spezifische Bindungsstellen für ADM festgestellt (Owji et al., 1995).

Vasodilatation und Natriurese sind die beiden meist untersuchten Effekte von Adrenomedullin. Im Fall der Vasodilatation wirkt Adrenomedullin über mindestens zwei verschiedene Signaltransduktionswege. Es wird einerseits durch direkte Wirkung von Adrenomedullin auf die glatte Muskulatur der intrazelluläre cAMP Spiegel erhöht, andererseits die NO-Produktion in Endothelzellen stimuliert. Durch Versuche an Endothelzellen aus Rinder Aorten konnte gezeigt werden, dass Adrenomedullin durch Kopplung an G-Proteine die Adenylzyklase aktiviert und zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration führt. Die Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration ist der Endpunkt einer Signalkaskade. Als erstes wird durch Aktivierung der Phospholipase C vermehrt IP_3 gebildet, wodurch die Öffnung der Ca^{2+} - Kanäle in der Zellmembran unterstützt wird, danach führt die erhöhte Ca^{2+} Konzentration zu einer gesteigerten NO Produktion (Shimekake et al., 1995).

Zu den kardialen Wirkungen von Adrenomedullin wurden bis heute gegensätzliche Effekte beschrieben. Unter Bolus - Gabe von Adrenomedullin in ein isoliertes Rattenherz zeigte sich bei Perret et al. 1993 ein gering negativ inotroper Effekt. Weitere negative inotrope Effekte konnten an isolierten adulten Kardiomyozyten von Kaninchen gezeigt werden, welche durch eine Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration und des Ca^{2+} Einstroms in die Zelle bedingt waren. Diese Wirkung erklärte man über eine NO induzierte Zunahme der intrazellulären cGMP Konzentration (Ikenouchi et al., 1997). Bei Versuchen an menschlichen Myozyten ließ sich unter Vorbehandlung mit Adrenomedullin eine geringere Ansprechbarkeit der Zellen auf ein positiv inotrop wirkendes Katecholamin (Isoproterenol) zeigen, desweiteren konnte ebenfalls ein negativ inotroper Effekt von Adrenomedullin nachgewiesen werden (Mukherjee et al., 2002).

Von Szokodi et al. 1997 konnte, im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen, eine positiv inotrope Wirkung von Adrenomedullin in isolierten Ratten Kardiomyozyten, über einen cAMP unabhängigen Mechanismus, gemessen werden. Bei einer anderen Arbeitsgruppe wurden ebenfalls positiv inotrope Effekte aufgezeichnet, welche jedoch über cAMP vermittelt schienen (Ihara et al., 2000). Einen zweiphasigen Wirkungsverlauf von Adrenomedullin an adulten Ratten Kardiomyozyten konnte in einer weiteren Arbeit festgestellt werden. Es zeigte sich innerhalb der ersten 30 Minuten ein positiver inotroper Effekt, welcher nach längerer Inkubationsdauer, größer 60 Minuten, in eine negativ inotrope Wirkung überging (Mittra et al., 2004).

1.4 Amylin

Amylin oder auch Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) genannt, gehört ebenfalls zu der Familie der Calcitonin gene-related Peptide. Die humane Form dieses Polypeptidhormones besteht aus 37 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 2 und 7. Im Pankreas wird Amylin zusammen mit Insulin und Glucagon durch die β -Zellen gebildet. Mengenmäßig stellt die Amylin Produktion nur ein Hundertstel der Menge von Insulin dar. Kommt es im Zuge eine Krankheit zur Funktionsunfähigkeit des Pankreas, zum Beispiel beim Diabetes mellitus, kann es wie Insulin nicht mehr produziert werden. Amyloidablagerungen in den Langerhansschen Inseln, welche beim Diabetes Typ II vorkommen, bestehen zu einem großen Teil aus Amylin. Auf der Gefäßebene führt es wie CGRP- α , CGRP- β und Adrenomedullin, über die Interaktion mit dem CGRP Rezeptor, zu einer Vasodilatation (Hasbak et al., 2001). In den meisten wissenschaftlichen Arbeiten ist die Wirkung von Amylin auf den Kohlenhydratstoffwechsel untersucht worden. Hierbei zeigte sich, dass es bei Nahrungsaufnahme oder einer Erhöhung der Plasmaglukosekonzentration zu einer gemeinsamen Sekretion von Insulin und Amylin, im Verhältnis 32:1 kommt (Pieber et al., 1994; O'Brien et al., 1991). Man fand zusätzlich zu den Pankreaszellen auch kleine Mengen an Amylin mRNA im Magen, Darm, Lunge und weiteren verschiedenen Neuronen des Nervensystems (Edwards et al., 1992; Mulder et al., 1995).

In früheren Arbeiten wurde vorgeschlagen, dass Amylin über einen CGRP Rezeptor seine biologischen Effekte erzielt. Die Wirkung von Amylin auf ventrikuläre Kardiomyozyten und der vasodilatatorische Effekt lassen sich durch CGRP- α (8-37) blocken, wobei Amylin (8-37) diese Effekte nicht aufheben kann. Man suchte dennoch weiter nach spezifischen Amylin Rezeptoren. Die Problematik dabei war, die Amylin Rezeptoren im Gewebe oder Zellen, die auf das Peptid reagierten, als solche zu benennen, da diese schon als Calcitonin Rezeptoren gekennzeichnet waren. In neuen Arbeiten stellte sich heraus, dass die Rezeptoren, welche hochaffin zu Amylin sind, sich aus Calcitonin Rezeptoren gebildet haben (Christopoulos et al., 1999). Der Umstand, unter dem dieser Effekt auftritt ist sehr ungewöhnlich. Anders als die meisten G-Protein vermittelten Rezeptoren kann der Calcitonin Rezeptor verändert werden, wodurch sich seine Affinität zu Amylin erhöhen lässt. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, übernehmen die RAMPs diese Aufgabe und spielen demnach pharmakologischer Schalter und modulieren die Antwort der Zelle auf ihre extrazellulären Stimuli (Sexton et al., 2001).

Es lassen sich demnach mindestens sechs verschiedene humane Amylin Rezeptoren herstellen. Diese entstehen aus Interaktion zwischen den drei RAMPs, dem Calcitonin Rezeptor und seiner Hauptpleißvariante.

Molekulare Zusammensetzung der CGRP Rezeptoren

Eigenname des Rezeptors	Kombination aus
CGRP	CL + RAMP1
AM ₁	CL + RAMP2
AM ₂	CL + RAMP3
CT	CT
AMY _{1(a)}	CT _(a) + RAMP1
AMY _{2(a)}	CT _(a) + RAMP2
AMY _{3(a)}	CT _(a) + RAMP3
AMY _{1(b)}	CT _(b) + RAMP1
AMY _{2(b)}	CT _(b) + RAMP2
AMY _{3(b)}	CT _(b) + RAMP3

Abb. 1.4.1: Molekulare Zusammensetzung der Rezeptoren aus der CGRP Familie. CT = Calcitonin Rezeptor, CL = Calcitonin receptor-like receptor, AM = Adrenomedullin Rezeptor, RAMP = Receptor activity modifying Proteins.

Die Amylin Rezeptoren werden je nach Spleißvariante des Calcitonin Rezeptors (CT_(a)) = hier fehlen die ersten 16 Aminosäuren und CT_(b)) und Kombination mit dem jeweiligen RAMP Amy_{1-3(a)} bzw. Amy_{1-3(b)} genannt. Näheres kann aus der Abbildung 1.4.1 entnommen werden.

Die Herausforderung ist jetzt, die Lokalisation und pharmakologische Wirkung von jedem dieser Rezeptoren festzustellen, wobei unbekannte Gewebefaktoren offenbar eine wichtige Rolle in der pharmakologischen Eigenschaft spielen.

1.5 Intermedin (IMD)

Intermedin (IMD) bzw. Adrenomedullin 2 (AM-2) ist das 2004 von Roh et al. entdeckte, gefäßerweiternde Peptid der Calcitonin gene-related Peptide Familie. Durch proteolytische Spaltung können aus dem Vorläuferpeptid Preprointermedin zwei unterschiedliche Peptide erzeugt werden, Intermedin (IMD 1-47) bestehend aus 47 Aminosäuren und das kürzere IMD (8-47), welchem die ersten 7 Aminosäuren fehlen. Durch eine Aminosäuresequenzanalyse

konnte gezeigt werden, dass eine Spaltung an der Spaltungsstelle Arg₉₃ und Arg₉₄ zum Produkt Preprointermedin (preproIMD(95-147)), genannt IMD(1-53), führt.

Auch die Wirkungen von Intermedin werden über einen Calcitonin receptor-like receptor in Anwesenheit von eines der drei RAMPs vermittelt. Die Intermedin Rezeptoren zeigen geringe Selektivität und haben eine beträchtliche Affinität für CGRP β (McLatchie, 1998). Intermedin agiert nicht selektiv mit an allen drei RAMP- Calcitonin receptor-like receptor Kombinationen (Roh et al., 2004). Es wird vermutet, dass die Antwort des Gewebes auf das Peptid von der Höhe der Expression von Calcitonin receptor-like receptor und der Anwesenheit des entsprechenden RAMPs abhängig ist. Receptor activity modifying Protein 2 (RAMP2) hat zum Beispiel im Vergleich zu RAMP1 eine höhere Konzentration im Herzen, während RAMP3 mRNA dort fast überhaupt nicht nachgewiesen werden kann (Autelitano et al., 2001).

In der Arbeit von Yang et al. 2005 wurden die Effekte von Intermedin auf isolierte Ratten Herzen getestet. Diese Herzen wurden mit einer Langendorff Apparatur perfundiert und dabei zunächst einer 45 min globaler Ischämie unterworfen, worauf eine 30 min Reperfusion folgte. Als Resultat der Ergebnisse schlug man vor, Intermedin wie Adrenomedullin kardioprotective Effekte gegen myokardiale Ischämie und Reperfusionsschäden zuzusprechen. Auch Chun-Shui Pan et al. 2005 schlugen aufgrund ihrer Ergebnisse vor, dass Intermedin ein regulierender Faktor für Herzgefäß-Funktion und myokardiale Hypertrophie als kardiovaskulär aktives Peptid sein könnte.

1.6 Vergleich

In der folgenden Abbildung 1.6.1 sollen die Gemeinsamkeiten, der Peptide aus der Familie der Calcitonin gene-related Peptide, bezüglich ihrer Aminosäuresequenz verdeutlicht werden. In der Klammer ist die Stelle der Disulfid-Brücke eingezeichnet, welche für die Sekundärstruktur der Moleküle verantwortlich sein könnte. Die einzigen Unterschiede in AS Sequenz von CGRP- α und β sind mit roten Kreisen umrandet.

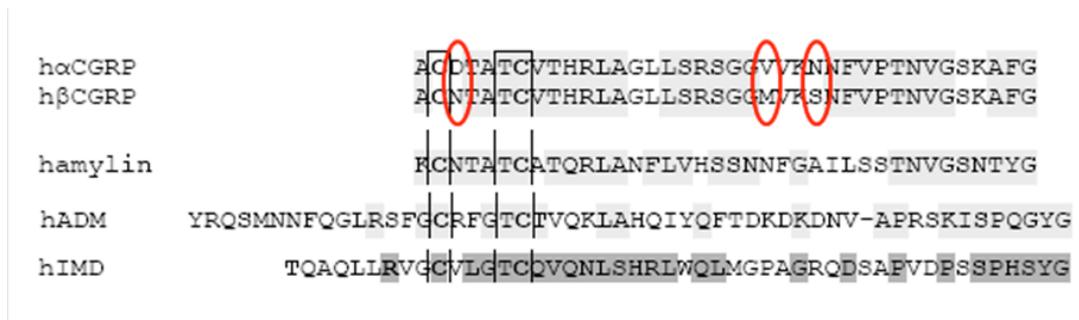


Abb. 1.6.1: Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von humanem CGRP, Amylin, Adrenomedullin und Intermedin. Unterschiede zwischen CGRP- α und CGRP- β sind eingekreist. Die gemeinsame Disulfid-Brücke (C-TC) in Klammer dargestellt. Homologe Genstellen sind eingefärbt.

Übersicht über die Wirkung der CGRP Familie

Peptid	spezifische Wirkungen
Calcitonin	hypokalzämisch, analgetisch
CGRP	vasodilatatorisch Einfluss auf Chronotropie und Inotropie am Herzen
Amylin	Hemmung der Insulinsekretion, Glukoseaufnahme und Glykogensynthese im Skelettmuskel Einfluss auf Chronotropie und Inotropie am Herzen
Adrenomedullin	vaso- und bronchodilatatorisch Wasser und Elektrolythaushalt Einfluss auf Chronotropie und Inotropie am Herzen
Intermedin	Vasodilatatorisch Einfluss auf Chronotropie und Inotropie am Herzen

Abb. 1.6.2: Spezifische Wirkungen einzelner Peptide der CGRP Familien. Modifiziert nach Koller, D.. Short N-Terminal Regions of the Calcitonin-Like Receptor Define Ligand Specificity. ETH Zürich, 2004.

1.7 Methodische Voraussetzungen zur Untersuchung der Zellkontraktion

In dieser Arbeit wurde das Kontraktionsverhalten adulter Rattenkardiomyozyten untersucht. Die zu untersuchenden Zellen wurden dazu je nach Protokoll entweder über 24 Stunden oder für 2 Minuten mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Das hier verwendete Modell konnte bereits in anderen Arbeiten zeigen, dass die einzige messbare Veränderung hinsichtlich der basalen Funktion eine Beeinträchtigung der Frequenz-Kontraktionsbeziehung ist. Die nicht inkubierten Zellen zeigen demnach bei Zunahme der Frequenz eine Abnahme der basalen Zellverkürzung.

Aufgrund der Tatsache, dass die Kardiomyozyten der Ratte auch basal eine negative Frequenz-Verkürzungsbeziehung im Bereich von 0,5 Hz bis 1,0 Hz zeigen können, sind diese nicht direkt mit humanen Zellen vergleichbar, obwohl die Veränderung mit der negativen Kraft-Frequenz-Beziehung des insuffizienten menschlichen Herzens verglichen werden kann. Es wurde trotz speziebedingten Vorbehalten, hinsichtlich einer direkten Übertragbarkeit auf das menschliche System, in dieser Arbeit mit Herzmuskelzellen der Ratte gearbeitet. Kardiomyozyten der Ratte, im Vergleich zur Maus oder anderen Tieren, gelten als am besten untersuchtes Modell und zeigen viele Parallelen im Bereich der Signaltransduktion und Entwicklung einer Myokardhypertrophie, zu den humanen Systemen.

In der Arbeit wurden zum Einen Versuche an isolierten Herzmuskelzellen durchgeführt, die eine detaillierte Analyse der maximalen Zellkontraktion und der Verkürzungsfraction ermöglichten, desweiteren wurde mittels eines Langendorff – System die Dynamik am schlagendem Herzen gemessen.

Zur Erstellung von repräsentativen Ergebnissen und Ausschaltung individueller Unterschiede in den Präparationen von Kardiomyozyten wurden pro Versuch Zellen aus mindestens zwei verschiedenen Herzen isoliert und vereint.

1.8 Fragestellung

In der vorgelegten Arbeit sollten die Auswirkungen der Calcitonin gene-related Peptide Familie auf das Kontraktionsverhalten des Herzens von normotensiven und chronisch hypertensiven Ratten untersucht werden. Hierzu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet.

1. Übt CGRP einen positiven oder negativen Effekt auf die Kontraktion aus?
2. Welche intrazellulären Signaltransduktionswege sind bei diesen Effekten beteiligt?
3. Gibt es Unterschiede in der kontraktilen Antwort von CGRP auf normotensive und chronisch hypertensive (SHR) isolierte Kardiomyozyten?
4. Welchen Einfluss übt Angiotensin II auf die kontraktilen Effekte der CGRP aus?
5. Sind die Ergebnisse der isolierten Kardiomyozyten auf das komplette Herzmodell übertragbar?

Im Vergleich zu den vasodilatatorischen und natriuretischen Effekten, sowie Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel, sind die Angaben über die Beeinflussung der Inotropie und Wirkmechanismen am Herzen nicht einheitlich. Es wurden zwei verschiedene Systeme angewandt, um die Wirkung der jeweiligen Substanzen auf die kontraktilen Parameter des Herzens untersuchen zu können.

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Herzmuskelzellen aus hypertrophen Herzen zu analysieren wurden Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten (SHR) isoliert. Diese Ratten weisen in vivo eine druckinduzierte Myokardhypertrophie auf, welche wahrscheinlich auf einer Aktivierung des Sympathikus als auch des Renin-Angiotensin-Systems beruht.

2. Material

2.1. Chemikalien

Acetyl-Amylin (8-37)	Bachem, Weil am Rhein
Amylin	Bachem, Weil am Rhein
Adrenomedullin 1-50	Calbiochem, Bad Soden
Atenolol	Sigma, Taufkirchen
Angiotensin II	Sigma, Taufkirchen
Intermedin	Bachem, Weil am Rhein
CGRP α	Bachem, Weil am Rhein
CGRP β	Bachem, Weil am Rhein
CGRP α (8-37)	Bachem, Weil am Rhein
H89	Calbiochem, Bad Soden
Indometacin	Synopharm GmbH&Co.KG, Barsbüttel
Isoprenalin	Sigma, Taufkirchen
L-NA	Sigma-Aldrich, Seelze
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glucose	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Roche Applied Science, Mannheim
Kaliumchlorid	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ CLSII	Biochrom, Berlin
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
NaHCO ₃	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Eggenstein

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

2.2 Medien

Calciumchlorid-Stammlösung:

CaCl₂ 100 mM

CCT-Kulturmedium:

M 199-HEPES gepuffert x ml
 Kreatin 5 mM
 Karnitin 2 mM
 Taurin 5 mM
 Streptomycin 100 µg/ml
 Penicillin 100 IU/ml
 Cytosin-β-Arabinofuranosid 100 µM
 auf pH 7,4 titriert und steril filtriert

M 199-HEPES gepuffertes Perfusions-Medium:

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

Powell-Medium:

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

Vorplattiermedium:

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

Waschmedium:

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

Langendorff-Perfusionslösung

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

Zur Hemmung der Proliferation verbliebener Nicht-Herzmuskelzellen wurde Cytosin- β -D-Arabinofuranosid zugesetzt. Alle Medien wurden steril filtriert, bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt und vor dem Gebrauch auf 37°C erwärmt.

2.3 PufferKollagenasepuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25 mg (chargenabhängig)
Calciumchlorid-Stammlösung	12,5 μ l

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	30 mg

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

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

2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips One Dimensional Camera ZK4
	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Stimulator	Physiologisches Labor des Physiologischen Institutes der J.-L.-Universität Gießen

2.4.3 Langendorff - System

Schlauchpumpe	Ismatec Reglo Dig NS-4/8V1.13
Umwälzpumpe	MGW Lauda Typ DP8/17
Relaisbox	Univ. Relaisbox R2 Elec. MGW Lauda
Druckaufnehmer	Combitrans 1-fach Set Mod. II
	J.-L.-Universität Gießen Braun
Thermokammer	Eigenbau des Physiologischen Institutes der J.-L.-Universität Gießen
Phylab	Eigenprogrammierung des Physiologischen Institutes der J.-L.-Universität Gießen mittels LabVIEW von Nat. Instruments

2.4.4 Sonstige Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke&Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn

2.4.5 Verbrauchsmaterialien

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

2.4.6 Software

Excel
MUCEL
Phylab

Microsoft
Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Eigenprogrammierung des
Physiologischen Institutes
der J.-L.-Universität Gießen

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus

1. ca. 12 Wochen alten, 200-300g schweren, männl. Wistar Ratten
2. ca. 12 Wochen alten, 200-300g schweren, männl. spontan hypertensiven Ratten (SHR)

isoliert. Diese verwendeten Tiere kamen aus der eigenen Züchtung des Tierstalles des Physiologischen Institutes der Justus Liebig Universität Giessen. Während des Aufwachsens hatten die Tiere freien Zugang zu Nahrung, Standardfutter: Altromin® und Wasser.

3.1.1 Präparation isolierter Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Die verwendete Methode zur Isolierung der Herzmuskelzellen stammte von Piper et al. 1982. Vor der Präparation wurde eine Langendorff-Perfusionsanlage mit Powell Medium gespült und danach luftblasenfrei mit dem gleichen Medium befüllt und auf 37°C erwärmt. Das Powell Medium wurde während der gesamten Isolierung mit Carbogen begast.

Die Wistar Ratten wurden mit einer ca. ein bis zwei Minuten langer Diethylethernarkose narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend, nach Eröffnen des Thorax, trennte man mit einem Scherenschlag Herz und Lunge ab und legte sie in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung. Von dem nun still gestellten Herzen entfernte man die Lunge und das noch anhängende Mediastinalgewebe. Nach dem Freipräparieren der Aorta ascendens wurde diese mittels einer Perfusionskanüle an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und das Herz retrograd perfundiert. Mit zunächst 40ml Powell-Medium wurde das noch verbliebene Blut im Herzen ausgewaschen.

Anschließend wurde für ca. 30min mit 50ml Kollagenasepuffer rezirkulierend perfundiert. Die dabei verwendete Flussrate wurde mittels eines Ventils auf 2-3ml/min eingestellt.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Ventrikel von Aorta und Vorhöfen abgetrennt und das Ventrikelgewebe zunächst mechanisch, mittels eines Gewebhackers bei einer Schnittbreite von 0,7mm, anschließend manuell mit zwei Skalpell, zerkleinert. Danach wurde der Gewebebrei für ca. 10 Minuten in 30ml Kollagenasepuffer bei 37°C unter ständiger

Carbogen-Begasung nachverdaut. Die Auftrennung der Herzmuskelzellverbände in einzelne Zellen wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren begünstigt.

Um in der gewonnenen Zellsuspension restliche Zellaggregate zu entfernen, wurde diese durch ein Nylonnetz mit 200µm Porengröße filtriert und für 3 Minuten bei 400U/min (ca. 25 x g) zentrifugiert, wobei Zelltrümmer, Bindegewebsstücke und die Kollagenase Lösung von den intakten Zellen abgelöst wurden. Das Filtrat mit den Herzmuskelzellen wurde anschließend in Powell-Medium mit zusätzlich 100µl CaCl₂ 100mM gegeben und nochmals bei 400U/min (ca. 25 x g) für 2 Minuten zentrifugiert.

Intakte Ca²⁺-tolerante Myozyten wurden durch Sedimentation durch ein Medium hoher Dichte aufkonzentriert. Hierfür wurde die Suspension in Powel-Medium, das 200µL CaCl₂ 100mM enthielt, durch Aufschütteln resuspendiert und entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläsern verteilt, welche zuvor bis zur Hälfte mit Powell-Medium, welches 500µL CaCl₂ 100mM enthielt, gefüllt wurden. Mit einer letzten Zentrifugation für 1 Minute bei 300U/min (ca. 15 x g) wanderten Aggregate aus vorwiegend intakten Zellen auf den Boden der Reagenzgläser und bildeten dort ein lockeres Sediment. Hierbei erhielt man eine Zellpopulation aus ca. 80% intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Vorplattieren

Die 35mm Gewebekulturschalen (Falcon Nr. 3004) wurden für mindestens vier Stunden, bzw. über Nacht, mit 1ml Vorplattiermedium bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert und unmittelbar vor dem Ausplattieren wurde das Medium wieder abgesaugt. Hierdurch wurde das Anheften der Kardiomyozyten sichergestellt.

3.2.2 Ausplattieren

Die zuletzt erhaltene Zellpopulation wurde in CCT-Kulturmedium (26ml pro Herz) zu einer homogenen Suspension aufgenommen. Pro Kulturschale wurde dann jeweils 1ml der Zellsuspension ausplattiert und für zwei bis drei Stunden bei 37°C unter CO₂ freien

Bedingungen inkubiert. Während dieser Zeit konnten die intakten, stäbchenförmigen Zellen sedimentieren und sich auf dem Boden der vorinkubierten Kulturschalen anheften. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit jeweils 1ml Waschmedium pro Schale zweimal gewaschen, wobei die runden, defekten Zellen und Zelltrümmer mit dem überstehenden Medium abgesaugt werden konnten. Die verbliebene Zellkultur bestand nun aus etwa 90% stäbchenförmigen intakten Zellen auf dem Boden der Kulturschale mit 1ml CCT-Waschlösung. Diese Kultur wurde dann je nach Versuchsprotokoll am gleichen oder nächsten Tag (über Nacht mit einer Substanz inkubiert) weiterverarbeitet.

3.3 Messung der Kardiomyozytenkontraktionen an isolierten Zellen

3.3.1 Vorbereitung der Kultur

Für die Messung wurden Zellkulturen entweder direkt nach dem Waschen oder nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden benutzt. Je nach Versuchsprotokoll (siehe Ergebnisteil) wurden die Kardiomyozyten für 2 Minuten oder 24 Stunden vor dem Messen mit einer Substanz versetzt.

3.3.2 Messvorgang der elektrischen Stimulation der Kardiomyozyten

Nach kurzer Akklimatisierung aus dem 37°C warmen Brutschrank wurde eine Kulturschale auf den Objektisch eines Mikroskops gestellt und mit einem präparierten Deckel verschlossen. Dieser spezielle Deckel hatte vier Löcher, die in etwa die Eckpunkte eines Quadrates bildeten. Durch eines dieser Löcher wurde ein Draht senkrecht geführt, sodass er in das Medium in der Kulturschale eintauchen konnte. Der Draht bildete einen 90° Winkel an der Stelle wo er ins Medium eintauchte, verlief dann horizontal im Medium und wurde durch einen weiteren 90° Winkel wieder durch das zweite Loch aus dem Inneren herausgeführt. Auf die gleiche Weise wurde ein zweiter Draht parallel zum Ersten eingeführt. Man hatte nun zwei Drähte parallel im Medium liegen, welche außerhalb der Schale an den Stimulator angeschlossen wurden. Der eine Draht wurde an die Kathode, der andere an die Anode angeklemt. Aufgrund dieser Anordnung in dem Medium konnte sich ein annähernd homogenes Feld aufbauen, das zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss durch die Kardiomyozyten führte. Mittels zweier 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen wurden die Zellen mit biphasischen Stromstößen von jeweils 0,5 ms zur

Kontraktion stimuliert. Eine Vereinheitlichung der Kontraktionen wurde durch eine Stimulation erreicht, indem der Stimulator den Zellen seine Stromstoßfrequenz als Kontraktionsfrequenz aufzwang. Auftretende Spontankontraktionen in unregelmäßiger Frequenz wurden so beseitigt. Kardiomyozyten, welche die Stimulationsfrequenz nicht annahmen, wurden nicht im Messprotokoll aufgenommen bzw. berücksichtigt.

Durch Änderung der Stimulationsfrequenz wurden den Zellen verschiedene Frequenzen, je nach Protokoll, von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz vorgegeben.

3.3.3 Messvorgang der Kontraktionswerte

Mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg wurden die Messwerte der Versuche erfasst. Es wurde jeweils eine Kulturschale auf dem Objektisch eines Mikroskops gestellt, wobei es möglich war, die Zellen während der Stimulation bei den Kontraktionen zu beobachten. Zwei verschiedene Kameras waren an dem Mikroskop angeschlossen. Die eine war eine normale Videokamera, die das Okularbild auf einen Monitor wiedergab. Bei der zweiten handelte es sich um eine Zeilenkamera, die verschiedene Helligkeiten aufnehmen konnte. Hierdurch war sie in der Lage, die Zellgrenzen aufgrund des Hell-Dunkel- bzw. Dunkel-Hell-Überganges an den Grenzen der Zelle zum Hintergrund wahrzunehmen.

Um eine Kontraktion mit der Zeilenkamera aufnehmen zu können, musste man diese so einstellen, dass die Zelle längs mit ihren Enden im Bild der eindimensionalen Zeile lag. Mit Bewegungen der Kulturschale auf dem Objektisch zentrierte man als erstes die zu untersuchende Zelle in die Mitte des Okularbildes, danach drehte man die Zeilenkamera, bis die Enden der Zelle im Erfassungsbereich lagen.

Über das Interface wurden die elektrischen Signale, des zuvor umgewandelten Bildes der Zeilenkamera, auf einem Oszillographen dargestellt. Der Horizontalverstärker war auf eine feste Ablenkzeit von 0,1 ms/cm eingestellt, während der Vertikalverstärker auf 5 V/div stand und intern getriggert wurde, um ein stehendes Bild zu erzeugen. Auf dem Oszillographen stellten sich die verschiedenen wahrgenommenen Helligkeitsunterschiede der Zeilenkamera in vertikale Auslenkungen dar.

Aufgrund der Tatsache, dass sich die Amplituden der Zellgrenzen in horizontaler Richtung bewegten, konnte man die Zellkontraktionen als elektrische Signale beobachten.

Für das Protokollieren der Kontraktionen wurde der Oszillograph als Zwei-Kanaloszillograph eingesetzt, indem man eine feste Spannung des Interfaces am zweiten Kanal anschloss. Diese Spannung, eine horizontale Linie auf dem Oszillograph, wurde extern über das Interface

getriggert, indem man jeweils einen Triggermarker des Interfaces, welcher sich als Amplitude darstellte, vor die Amplituden der Zellgrenzen setzte.

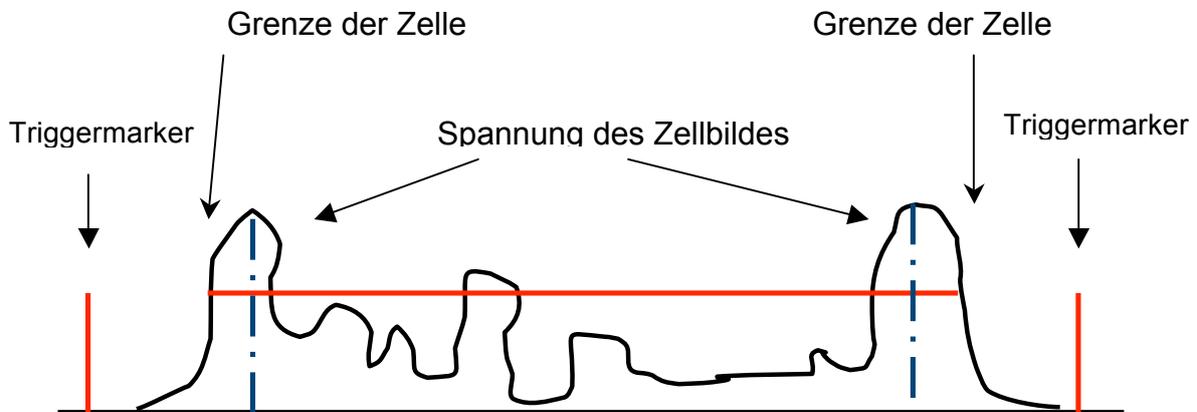


Abb. 3.3.3-1: Einstellung des Zwei-Kanaloszillograph

Überstieg nun die Spannung des Zellbildes (Amplitude des Zellbildes) den Wert des Triggermarkers (Amplitude des Triggermarkers), so begann der Oszillograph die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Auf dem Oszillographen konnte man dies durch einen Sprung der Horizontalen des zweiten Kanals in die Höhe sehen.

Während einer Zellkontraktion veränderten sich die horizontalen Lagen der Amplituden des Zellbildes (Grenzen der Zelle), und somit auch die Position, an welcher der Trigger-Wert erreicht wurde. Hierbei veränderte sich auch die Stelle, an der die Horizontale in die Höhe sprang. Nicht nur die Lage sondern auch die Länge änderte sich. Man konnte nun die Zellkontraktion und Zelllänge anhand der Veränderung der Horizontalen beobachten.

Der Oszillograph lieferte die Information Interface-Spannung „an“ bzw. „aus“ an das Interface weiter, welches an einem Computer angeschlossen war. Das Programm Mucell der Firma Scientific Instruments GmbH, welches auf dem Computer lief, registrierte aus den Informationen Spannung „an“ bzw. „aus“ die Längen der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Durch die kontinuierliche Aufzeichnung der Kombination aus Zelllänge und Zeitpunkt erstellte das Programm einen Graphen aus Zelllänge in Abhängigkeit von der Zeit. In diesem wurde eine Kurve generiert, die der Kontraktion der Zelle entsprach.

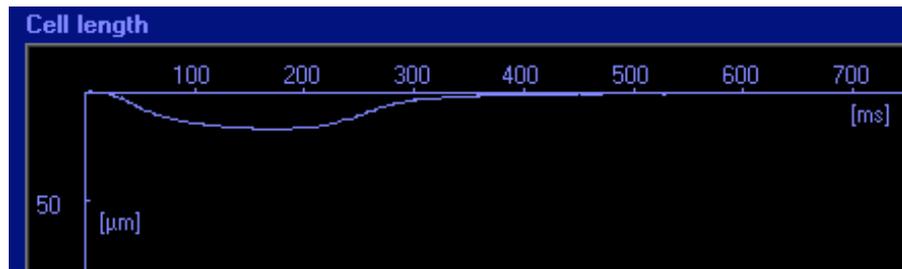


Abb. 3.3.3-2: Zellkontraktion bei 1 Hz (Programm Mucell)

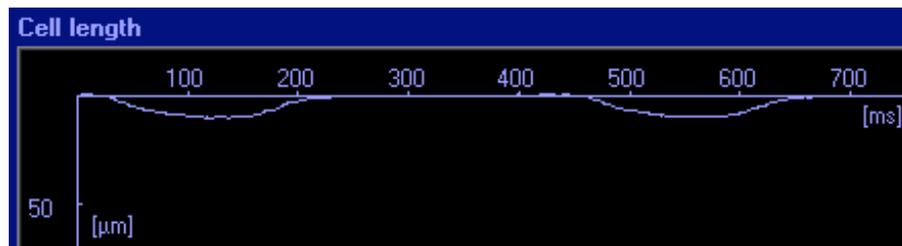


Abb. 3.3.3-3: Zellkontraktion bei 2 Hz (Programm Mucell)

Nachdem man die Aufnahme der Daten im Programm startete, erkannte es, anhand der Verkürzung der Horizontalen, den Beginn einer Kontraktion und nahm vier Kontraktionen auf.

Aus diesen einzelnen Messungen ermittelte das Programm Mittelwerte folgender Parameter:

- | | |
|------------------|---|
| 1. L Diast | maximale Zelllänge in Mikrometern (diastolische Zelllänge) |
| 2. TTP | Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion in Millisekunden („Time-to-Peak“) |
| 3. Amplitude | minimale Zelllänge in Mikrometern (systolische Zelllänge) |
| 4. TTP50 | Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden |
| 5. R50 | Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke |
| 6. Contraction V | maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve) |
| 7. Relaxation V | maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunden (bestimmt aus der ersten Ableitung der Relaxationskurve) |

Des Weiteren wurde aus diesen Parametern errechnet:

- | | |
|-----------------|--|
| 8. $\Delta L/L$ | Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge.
Zeigt an, um wieviel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt. |
|-----------------|--|

3.3.4 Messprotokoll

Wie oben beschrieben wurde jede Zelle bei einer Frequenz 1 Hz, 0,5 Hz und 2 Hz jeweils viermal gemessen. Die jeweils vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter, welche das Programm Mucell lieferte, wurden in dem Programm Excel weiter verarbeitet. Excel errechnete daraus den Mittelwert, Standardabweichung und den Median.

3.4 Messung der Parameter am isoliert perfundiertem Herzen

3.4.1 Langendorff Modell

Es wurde das von Oskar Langendorff 1895 (nach Döring und Dehnert (1985)) eingeführte Modell angewandt. Grundlage des Versuches ist die retrograde Perfusion eines Versuchsherzens. Eine Langendorff-Perfusionslösung wird dabei, entgegen der physiologischen Flussrichtung des Blutes, über die Aorta eingeleitet. Hierdurch fließt die Lösung durch die Aorta und anschließend in die Koronarien, da die Aortenklappe geschlossen ist. Ab dieser Stelle erhält man wieder eine orthograde Perfusion. Die Perfusionslösung passiert nun die Koronarien und gelangt in den Sinus venosus. Von dort geht es in das rechte Atrium, den rechten Ventrikel mit anschließendem Auswurf in die Pulmonalarterie. In unseren Versuchsreihen sollten Änderungen des Perfusionsdruckes gemessen werden, wodurch nach dem Ohmschen Gesetz der Fluss konstant gehalten werden musste.

$$R = \frac{\Delta p}{\varphi} \quad R = \text{Strömungswiderstand} \quad \varphi = \text{konstanter Fluss} \quad \Delta p = \text{Perfusionsdruck}$$

Aufgrund der Tatsache, dass der Strömungswiderstand vom Hagen-Poiseuilleschen Gesetz abhängig ist,

$$R = \frac{1}{r^4} \times \frac{l \times \eta \times 8}{\pi} \quad r = \text{Radius} \quad l = \text{Gefäßlänge} \quad \eta = \text{Viskosität}$$

und die darin enthaltenen Parameter als konstant angesehen werden können, lässt sich folgende Gleichung erstellen: $\Delta p \approx \frac{1}{r^4}$

Hieraus folgt, dass entstehende Änderungen des Druckes Rückschlüsse auf den koronaren Strömungswiderstand zulassen.

3.4.2 Versuchsaufbau

In die linke Kammer wurde ein Latexballon eingeführt, welcher an einem Druckaufnehmer angeschlossen war. So war es möglich kontinuierlich den systolischen als auch den diastolischen Druck zu registrieren. Durch das Befüllen des Ballons mit saliner Lösung wurde der diastolische Druck auf ca. 10 – 12 mmHg eingestellt. Mit einer Rollerpumpe stellte man den Perfusionsdruck auf Werte zwischen 46 und 48 mmHg ein. Dieser Druck, Aortendruck, wurde bis zum Ende der Stabilisierungsphase konstant gehalten und mittels eines Druckaufnehmers kontinuierlich registriert. Der nun erreichte Fluss wurde bis zum Ende des Experiments ebenfalls konstant gehalten, um Änderungen des Druckes erfassen zu können.

Die Temperatur im Innenraum der Kammer der Langendorff-Apparatur wurde konstant auf 37°C gehalten. Ebenfalls auf 37°C wurde die Langendorff-Perfusionslösung, durch eine im Wasserbad liegende Spirale, eingestellt. Die beiden Temperaturen wurden mittels Temperaturmessfühlern im Wasser, bzw. frei in der Kammer liegend, gemessen.

3.4.3 Vorbereitung der Langendorff Perfusionsanlage

Als erstes wurden die jeweils verwendeten Substanzen, Versuchssubstanz und Langendorff-Perfusionslösung, vorbereitet und an die Anlage angeschlossen. Die Lösungen wurden mittels Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂ auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Als nächstes wurde die Anlage mit dem Perfusat luftblasenfrei befüllt und der Ballon auf Dichtigkeit überprüft. Danach kalibrierte man die Messinstrumente.

3.4.4 Präparation der Rattenherzen

Es wurden die Tiere aus der eigenen Züchtung des Tierstalles des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen genommen. Sie wurden wie unter Punkt 3.1.2 präpariert und in die bereits laufende Langendorff-Apparatur überführt.

Das Herz wurde frei schwebend an einer Kanüle, mittels einer Krokodilklemme, in der Aorta aufgehängt und retrograd perfundiert. Innerhalb der ersten drei Minuten regelte man den Perfusionsdruck stufenweise auf ca. 48 mmHg hoch. Zwischenzeitlich wurde eine Ligatur um die Aorta ascendens, zwischen dem Koronararterienabgang und dem Abgang des Truncus brachiocephalicus, gelegt. Hiernach wurde die Krokodilklemme gelöst und entfernt. In den linken Ventrikel wurde dann über einen Schnitt, zum öffnen des linken Vorhofes, ein

Latexballon eingeführt. Dieser diente zum erstellen des diastolischen Druckes von 10 – 12 mmHg und registrierte entstehende Druckunterschiede. Um ein Herausrutschen des Ballons zu verhindern, wurde dessen zuführender Schlauch mit einem Klebestreifen an der Perfusionskanüle fixiert. Für die gesamte Präparation und Fixierung von zwei Herzen wurden nicht mehr als zehn Minuten gebraucht.

Nachdem sich das Herz stabilisiert hatte, Dauer ca. 25 – 30 Minuten, konnte mit den Versuchsprotokollen, wie unten beschrieben, angefangen werden.

3.4.5 Aufzeichnen der Versuchsparameter

Die beiden Druckaufnehmer sowie die Temperaturmessfühler waren mit einem Computer verbunden und gaben ihre Messdaten fortlaufend an das Programm Phylab weiter. Es wurden so direkt fünf Messwerte aufgezeichnet:

- | | |
|------------------------|--------------------------------------|
| 1. P_{sys} | systolischer Druck |
| 2. P_{dias} | diastolischer Druck |
| 3. PP | Aortendruck |
| 4. Temperatur $Kammer$ | Temperatur in der Langendorff Kammer |
| 5. Temperatur $Wasser$ | Temperatur des Perfusats |

Des Weiteren wurden aus diesen Parametern errechnet:

- | | |
|---|---|
| 6. $\frac{\Delta P}{\Delta t_{max}}$ | maximaler linksventrikulärer Druckanstieg |
| 7. $\frac{\Delta P}{\Delta t_{min}}$ | Relaxationsgeschwindigkeit |
| 8. $LVDP = P_{sys} - P_{dias}$ | linksventrikulärer entwickelter Druck |
| 9. $LVDP \times HF = \frac{LVDP \times HF}{1000}$ | Frequenz - Druck - Produkt |

Mittels eines Messröhrchens wurde der Fluss am Ende der Stabilisierungsphase manuell gemessen und protokolliert. Die Herzfrequenz wurde aus den Veränderungen des Drucks während der Herzaktion durch das Programm errechnet.

3.4.6 Versuchsprotokoll

Am Anfang des Versuches durchlief jedes Herz eine 2 x 10 minütige Stabilisierungsphase. Während eines Versuchsablaufes wurden die Herzen mit verschiedenen Substanzen für 5 Minuten perfundiert und im minütlichem Abstand die oben genannten Parameter dokumentiert. Zwischen den Perfusionsmedien erfolgte für jeweils 10 Minuten eine Auswaschphase.

In der nachfolgenden Tabelle ist der komplette Versuch detailliert aufgeführt.

Stab 1	Stab 2	Inter- medin	Aus- waschen	Adre- no	Aus- waschen	CGRP α	Aus- waschen	Amy- lin	Aus- waschen	Iso
5 min	5 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min

Tabelle 3.4.6: Versuchsprotokoll Langendorff

3.5 Statistik

Beim Auswerten der Daten wurden die Einzelkontraktionen aus verschiedenen Präparationen zusammengefasst und aus diesen der Mittelwert bestimmt. Zur Darstellung kommen die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler. Um zwei Gruppen vergleichen zu können, wurde ein konventioneller T-Test herangezogen. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als voneinander statistisch signifikant bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Akutwirkung von CGRP- α auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

Zur Darstellung der Wirkung von CGRP- α auf das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen adulter Ratten, wurden diese in Kulturschalen damit inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 2 Stunden wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen in dem standardisiertem Zellkulturmedium unter elektrischer Stimulation untersucht. Es wurde die prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (dL/L in %) als Vergleichsparameter der Kontraktion gemessen. Die Zellen wurden jeweils mit verschiedenen Konzentrationen von CGRP- α inkubiert.

4.1.1 Stimulation mit 0,5 Hz

Als Stimulationsfrequenz wurde 0,5 Hz gewählt, was für die Herzmuskelzelle der Ratte zwar unphysiologisch niedrig ist, aber eine ausgeprägte Verkürzung der Zelle erlaubt. Die lastfreie Zellverkürzung wird dabei als indirektes Maß für die Kontraktilität bestimmt.

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturschalen zeigten die behandelten Kulturen eine konzentrationsabhängige Ab- oder Zunahme der Verkürzung. Bei niedrigen Konzentrationen an CGRP- α fand sich eine negative Verkürzungs-Konzentration-Beziehung. Bei hohen Konzentrationen von 10 nM und 100 nM führte die Stimulation zu einer signifikanten stärkeren Zellverkürzung (Abb. 4.1.1).

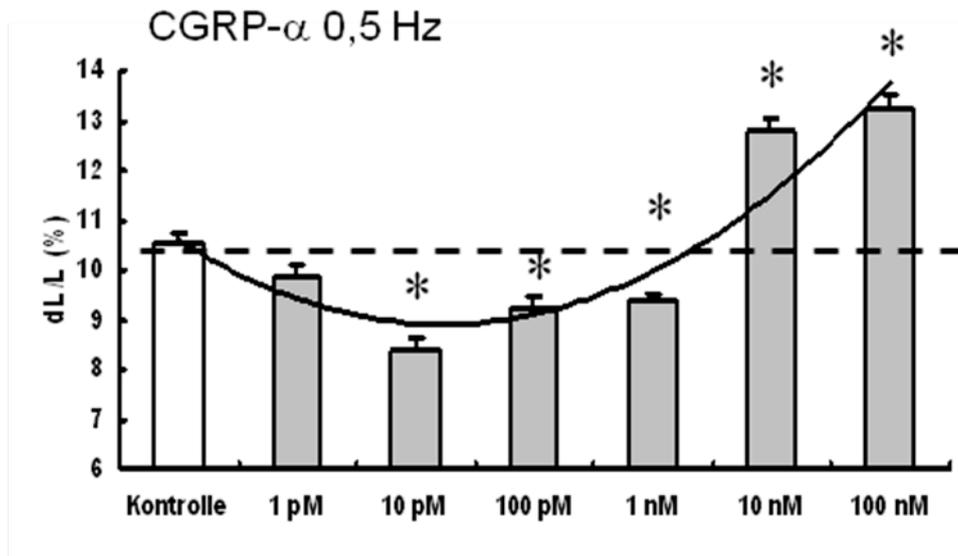


Abb. 4.1.1: Einfluss unterschiedlicher CGRP- α Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.1.2 Stimulation mit 1 Hz

Im nächsten Versuch wurde eine Stimulationsfrequenz von 1 Hz eingestellt. Auch bei dieser Frequenz zeigte sich eine signifikante negative Kontraktionsverkürzung, wobei diese bei 10 pM CGRP- α am stärksten ausgeprägt ist. Es zeigte sich zwar eine Zunahme der Verkürzung bei den hohen Konzentrationen, doch diese waren nicht mehr signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.1.2).

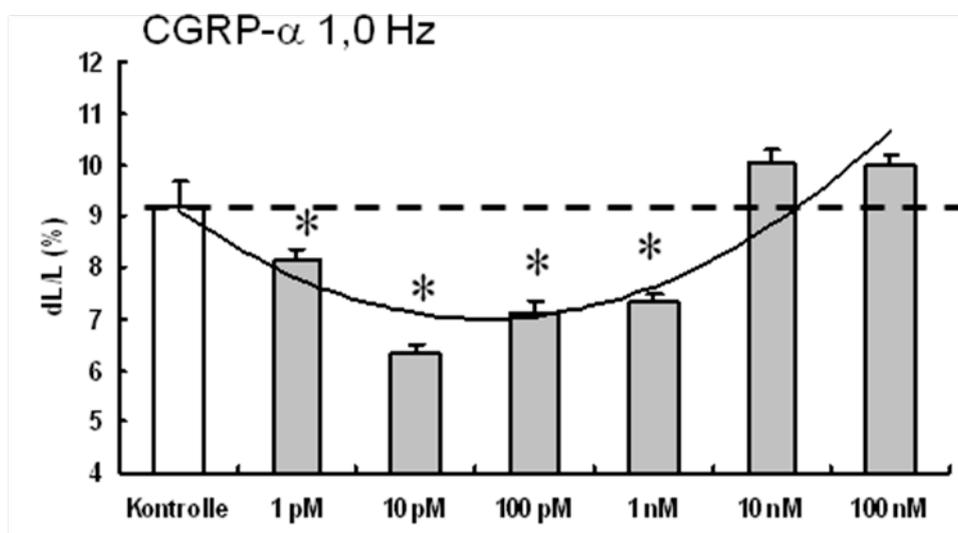


Abb. 4.1.2: Einfluss unterschiedlicher CGRP- α Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und

Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.1.3 Stimulation mit 2 Hz

Bei einer für die Herzmuskelzelle der Ratte dem physiologischen Bereich näher liegenden Frequenz von 2 Hz, ließen sich wieder signifikante negative Verkürzungseffekte messen (Abb. 4.1.3). Die bei niedrigen Konzentrationen aufgetretenen positiven Kontraktionswerte fanden sich hier nicht mehr.

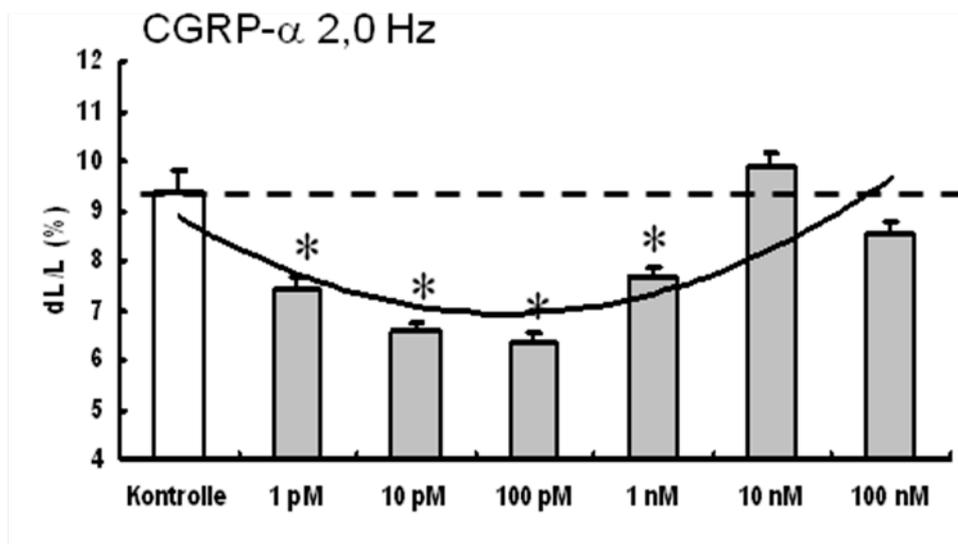


Abb. 4.1.3: Einfluss unterschiedlicher CGRP- α Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.2 Akutwirkung von CGRP- β auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

In den folgenden drei Versuchen wurden die Herzmuskelzellen mit CGRP- β inkubiert und der Einfluss auf Kontraktionsverhalten bei 0,5, 1 und 2 Hz untersucht.

Die Kardiomyozyten wiesen ein ähnliches Verhalten wie mit der Substanz CGRP- α auf und zeigten im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine konzentrationsabhängige Verkürzung.

Niedrige Konzentrationen von CGRP- β führten bei allen Stimulationsfrequenzen zu einer negativen Kontraktionsverkürzung, die besonders bei 10 pM und 1 nM zu sehen war (Abb.

4.2.1 - 4.2.3). Im höheren Bereich von 10 nM und 100 nM CGRP- β zeigten die Kardiomyozyten nur bei 0,5 Hz eine signifikante stärkere Zellverkürzung (Abb. 4.2.1).

Aufgrund der Tatsache, dass die Versuche mit der Substanz CGRP- α im Vergleich zu CGRP- β ähnliche Ergebnisse lieferte, welche jedoch bei CGRP- α signifikanter und homogener waren, wurden die weiteren Versuche zum Mechanisieren auf CGRP- α beschränkt.

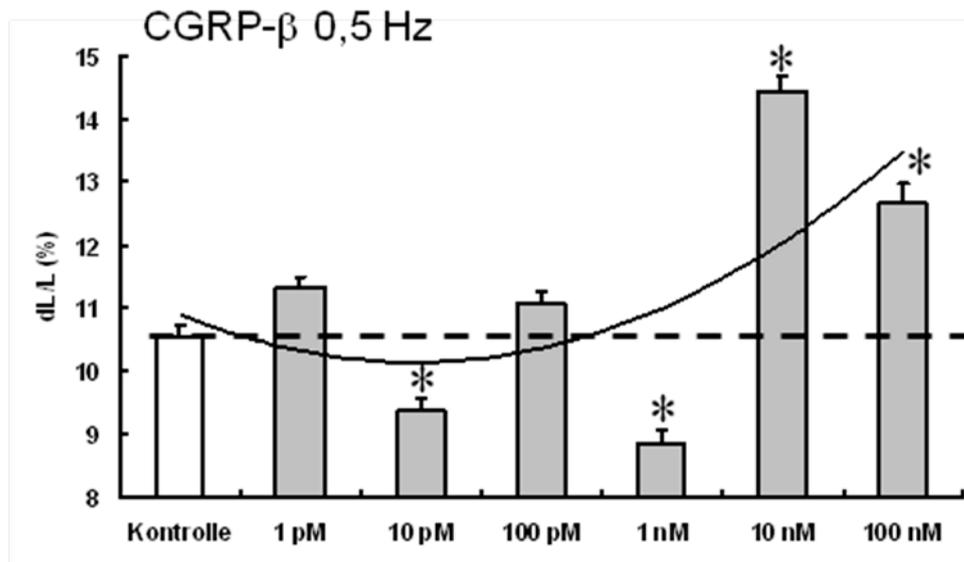


Abb. 4.2.1: Einfluss unterschiedlicher CGRP- β Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

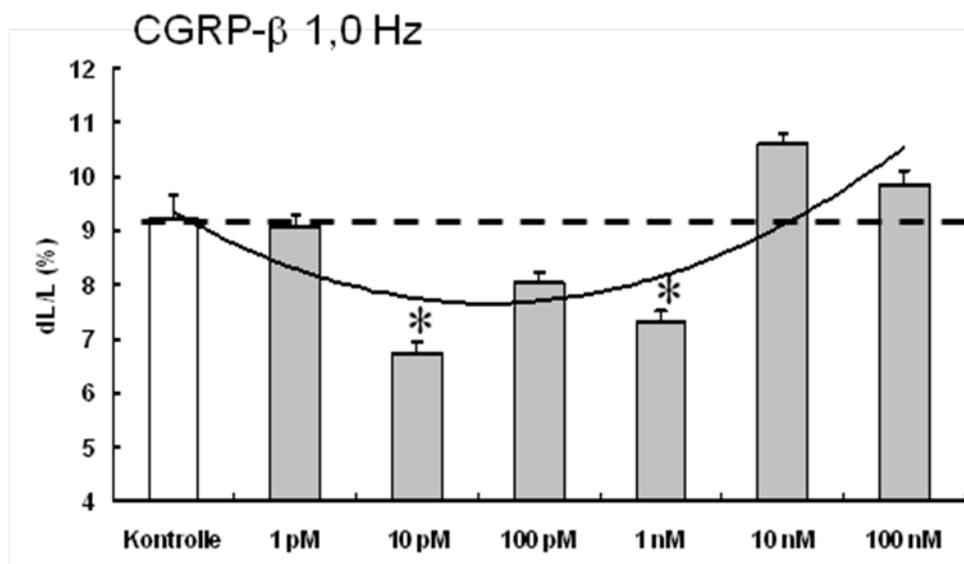


Abb. 4.2.2: Einfluss unterschiedlicher CGRP- β Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und

Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

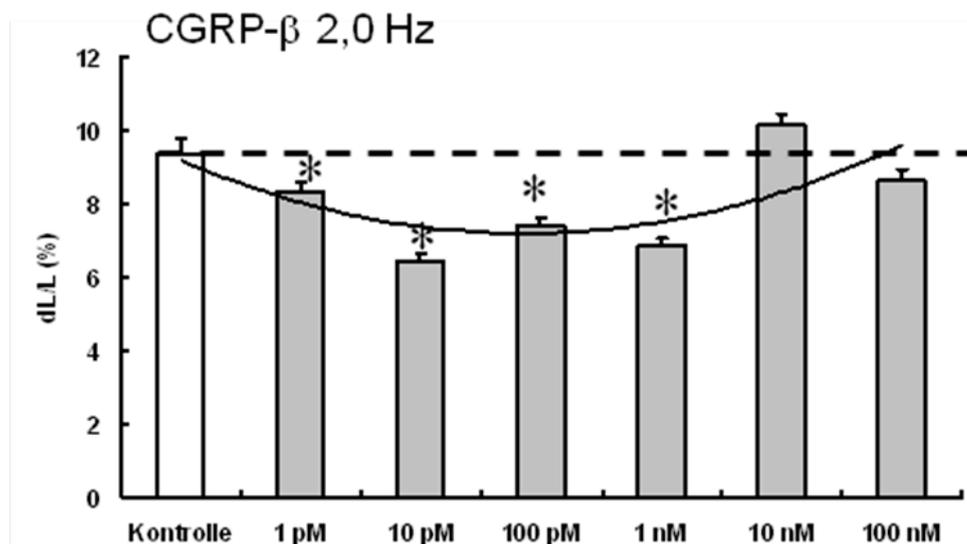


Abb. 4.2.3: Einfluss unterschiedlicher CGRP- β Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.3 Akutwirkung von CGRP- α (8-37) auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

Die nächsten Versuchsreihen wurden mit CGRP- α (8-37), einem Peptid aus der CGRP Familie, dem die ersten 7 Aminosäuren fehlen, durchgeführt. Dieses Peptid wird häufig zur Unterscheidung verschiedener Rezeptorsubtypen verwendet.

Bei Konzentrationen von 10 nM und 100 nM zeigten sich bei Stimulation mit jeweils 0,5 Hz und 1 Hz signifikante positive Verkürzungseffekte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.3.1 u. 4.3.2).

Niedrige Konzentrationen von CGRP- α (8-37) führten bei Stimulationsfrequenzen von 1 Hz und 2 Hz zu einer negativen Kontraktionsverkürzung, welche besonders bei 100 pM und 1 nM zu sehen war (Abb. 4.3.2 u. 4.3.3).

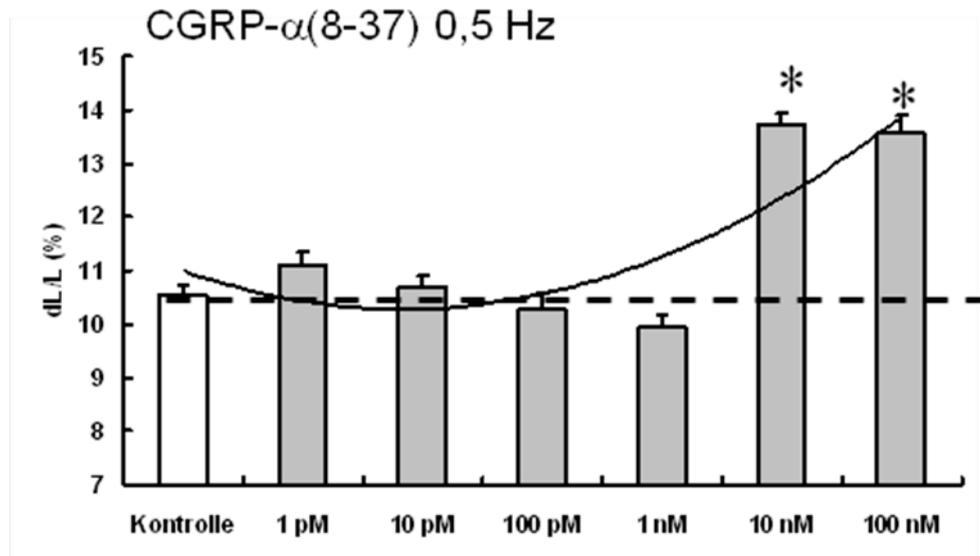


Abb. 4.3.1: Einfluss unterschiedlicher CGRP- α (8-37) Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

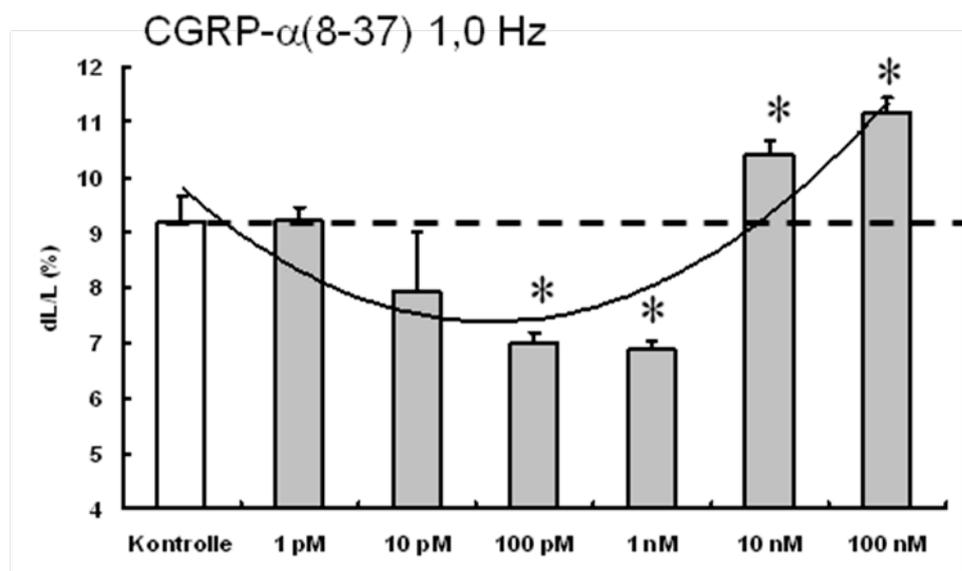


Abb. 4.3.2: Einfluss unterschiedlicher CGRP- α (8-37) Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

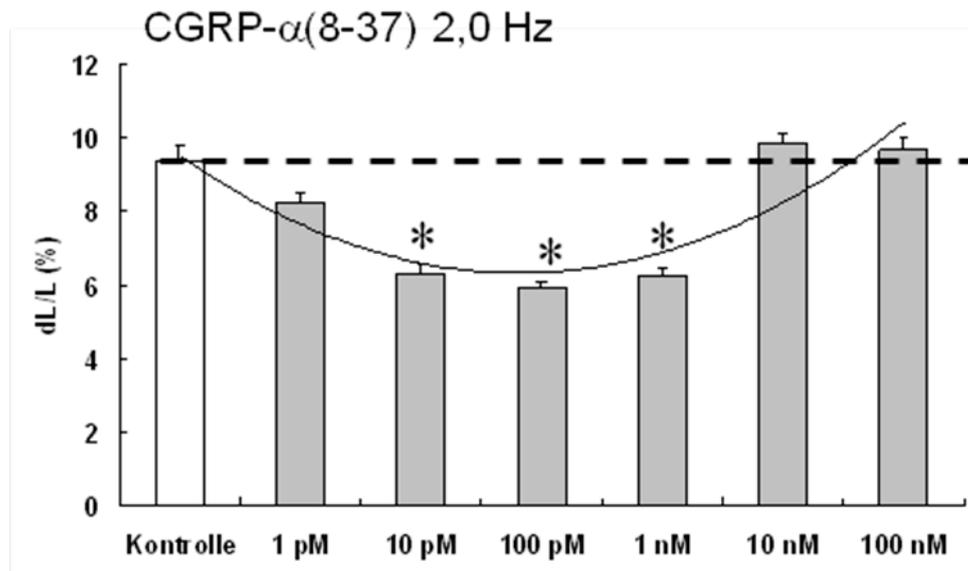


Abb. 4.3.3: Einfluss unterschiedlicher CGRP- $\alpha(8-37)$ Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.4 Antagonisierung der Akutwirkung von CGRP- α auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten mit CGRP- $\alpha(8-37)$

Um die antagonisierende Wirkung von CGRP- $\alpha(8-37)$ auf CGRP- α zu untersuchen, wurden folgende Versuche durchgeführt.

In der ersten Reihe wurden Konzentrationen von 10 nM CGRP- α benutzt. Bei dieser Konzentration zeigte sich bereits eine signifikante positive Verkürzung bei 0,5 Hz im Vergleich zur Kontrolle. Bei Inkubation der Herzmuskelzellen mit CGRP- α und Vorbehandlung mit 100 nM CGRP- $\alpha(8-37)$ war der positive Effekt von CGRP- α , der bei 0,5 Hz zu beobachten ist, verschwunden.

Bei den Frequenzen von 1,0 und 2,0 Hz, wobei CGRP- α alleine keine signifikanten Änderungen der Zellverkürzung zeigte, tritt jedoch in Anwesenheit von CGRP- $\alpha(8-37)$ ein signifikanter negativer Verkürzungseffekt bei 2,0 Hz auf (Abb. 4.4.1).

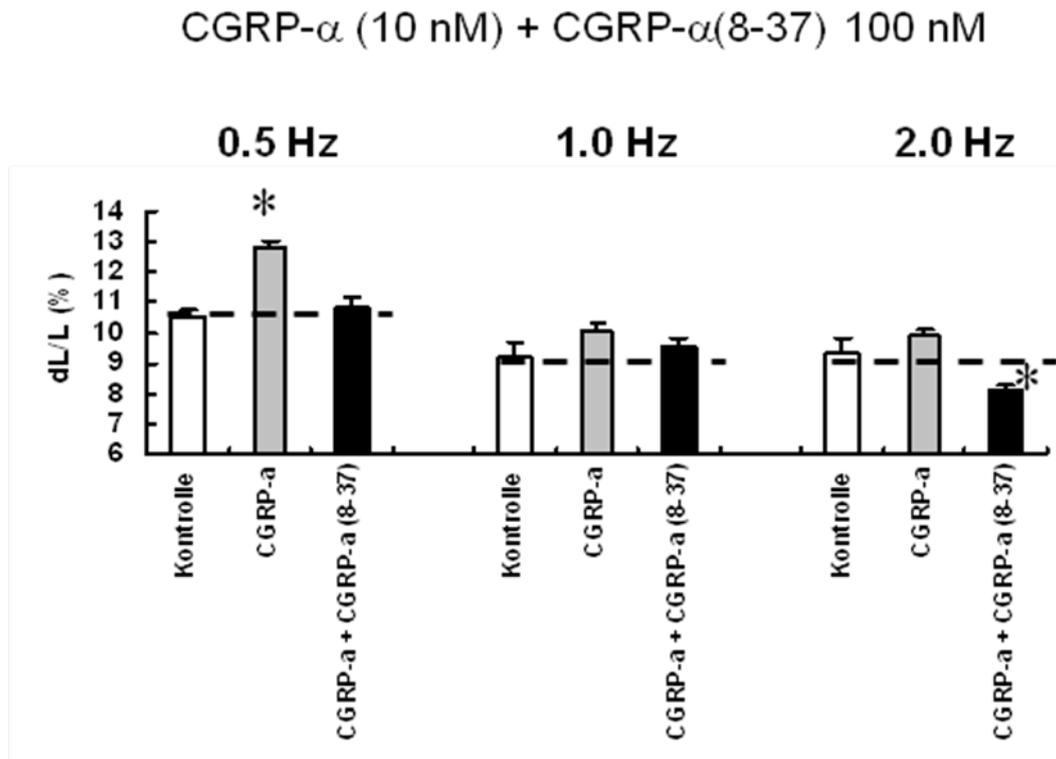


Abb. 4.4.1: Einfluss von CGRP- α 10 nM in Anwesenheit des Antagonisten CGRP- α (8-37) 100 nM auf die relative Zellverkürzung bei Frequenz von 0,5 – 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

Die bei allen Stimulationsfrequenzen, im Vergleich zur Kontrolle, auftretenden negativen Zellverkürzungen von CGRP- α 0,01 nM, wurden durch die Zugabe von 100 nM CGRP- α (8-37) signifikant verstärkt (Abb. 4.4.2).

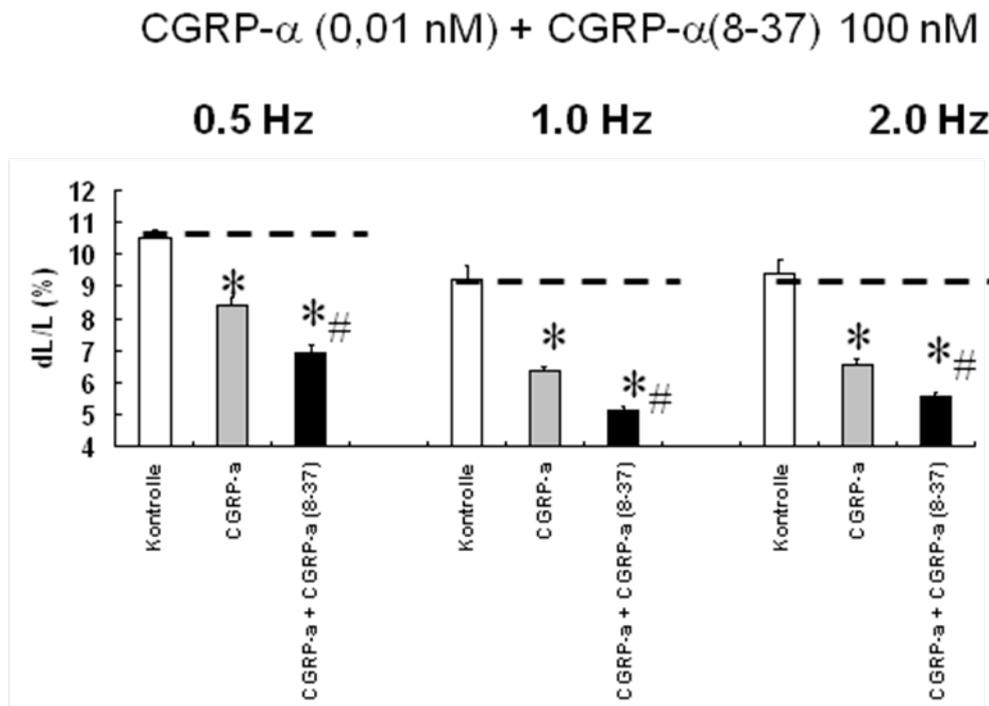


Abb. 4.4.2: Einfluss von CGRP- α 0,01 nM in Anwesenheit des Antagonisten CGRP- α (8-37) 100 nM auf die relative Zellverkürzung bei Frequenz von 0,5 – 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # = $p < 0,05$ vs. CGRP- α , $n = 36$ Zellen.

4.5 Einfluss der Hemmung der Proteinkinase A-Aktivierung mittels H89 auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten bei Akutwirkung von CGRP

In den folgenden Versuchen wurde die Proteinkinase A-Aktivierung mittels des Inhibitors H89 mit einer Konzentration von 1 μ M blockiert.

Bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 und 1,0 Hz zeigten die Herzmuskelzellen bei der Kontrolle und allen CGRP Peptiden mit einer Konzentration von 10 nM, eine signifikant schlechtere Zellverkürzung mit H89 als beim Versuch ohne H89. Die positiven Zellverkürzungseffekte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, blieben bei CGRP- β und CGRP- α (8-37) auch unter Blockierung der Proteinkinase A bei 0,5 Hz und 1,0 Hz erhalten (Abb. 4.5.1 u. 4.5.2).

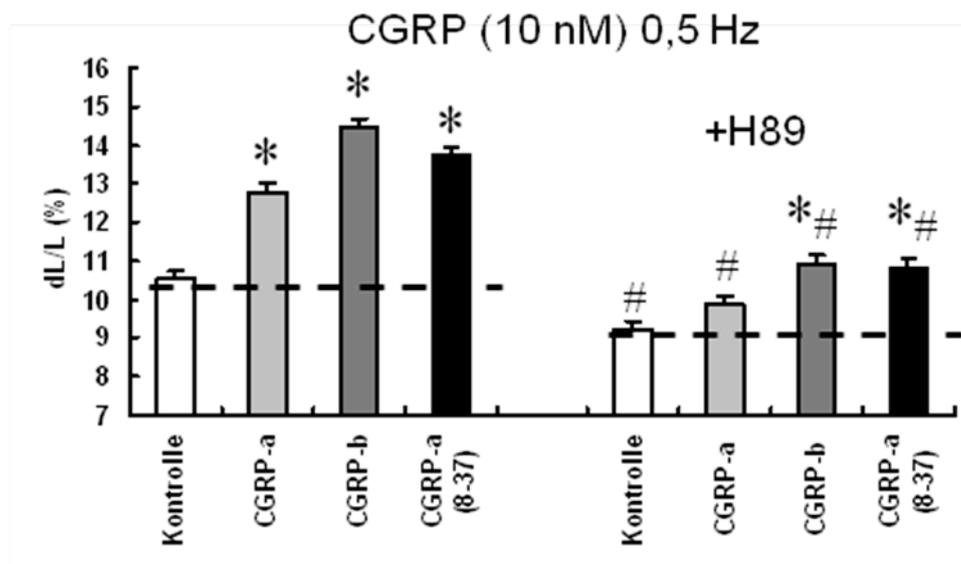


Abb. 4.5.1: Einfluss von CGRP 10 nM in Anwesenheit von H89 1 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # = $p < 0,05$ vs. ohne H89, $n = 36$ Zellen.

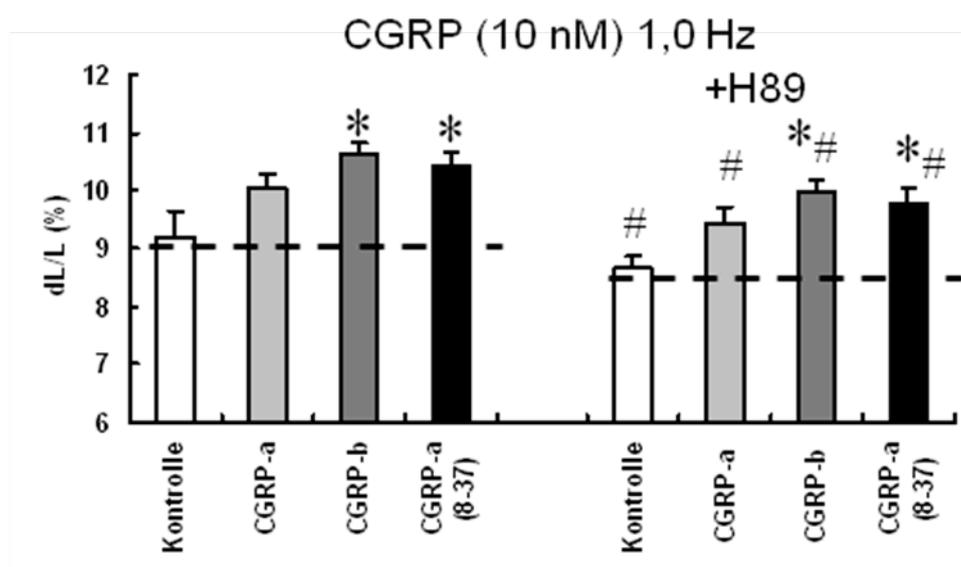


Abb. 4.5.2: Einfluss von CGRP 10 nM in Anwesenheit von H89 1 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # = $p < 0,05$ vs. ohne H89, $n = 36$ Zellen.

In der Abbildung 4.5.3 sind die Versuchsergebnisse der Herzmuskelzellenstimulation mit 2,0 Hz aufgetragen. Bei dieser Frequenz ließen sich bei allen CGRP Peptiden, unter Blockierung mit H89, wieder signifikante negative Zellverkürzungseffekte messen.

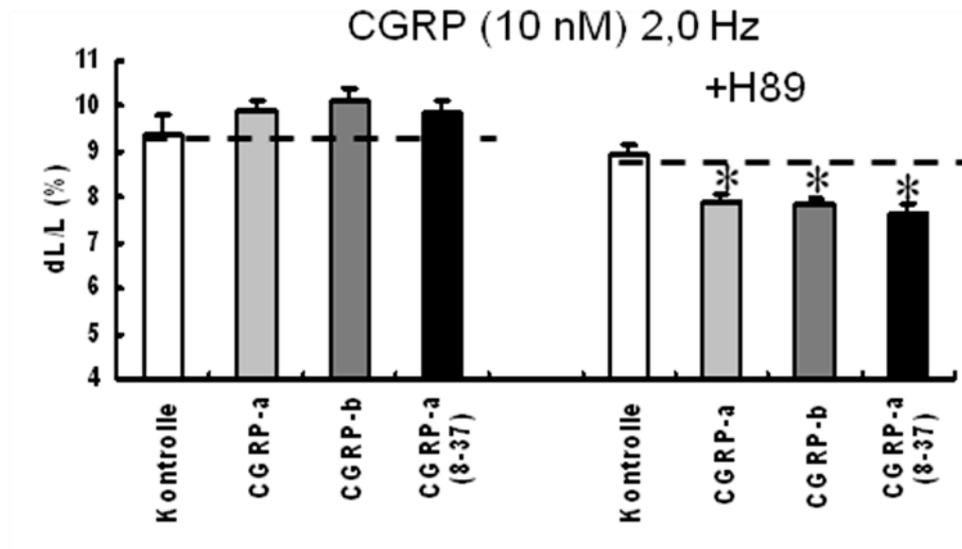


Abb. 4.5.3: Einfluss von CGRP 10 nM in Anwesenheit von H89 1 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.6 Akutwirkung von CGRP auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten unter dem Einfluss von Indomethacin bzw. L-NA

Um die Zykllooxygenase in den Herzmuskelzellen zu hemmen, wurde der COX-Inhibitor Indomethacin in einer Konzentration von 10 μ M verwendet.

Unter diesen Bedingungen wurden die negativen Effekte von CGRP- α 0,01 nM und CGRP- β 0,01 nM, bei der Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, signifikant positiv im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.6.1). Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht bei 1,0 Hz und 2,0 Hz erzeugen (Abb. 4.6.2 u. 4.6.3).

Indomethacin hatte im gesamten untersuchten Frequenzbereich keine Auswirkung auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzelle bei Inkubation mit CGRP- α (8-37) 0,01 nM.

Unter Hemmung der NO-Synthase durch L-NA in einer Konzentration von 10 μ M, ließen sich auch hier keine Veränderungen bei CGRP- α (8-37) 0,01 nM im Vergleich zum Kontrollversuch ohne L-NA bei 0,5 Hz und 2,0 Hz zeigen. Lediglich bei 1 Hz wurde der negative Effekt von CGRP- α (8-37) 0,01 nM, welcher eine große Standardabweichung hatte, unter L-NA aufgehoben (Abb. 4.6.2).

Bei CGRP- α 0,01 nM und CGRP- β 0,01 nM wurde der negative Verkürzungseffekt bei 0,5 Hz und 1,0 Hz unter L-NA signifikant positiv (Abb. 4.6.1 u. 4.6.2). Mit der Stimulation von 2 Hz konnte kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden.

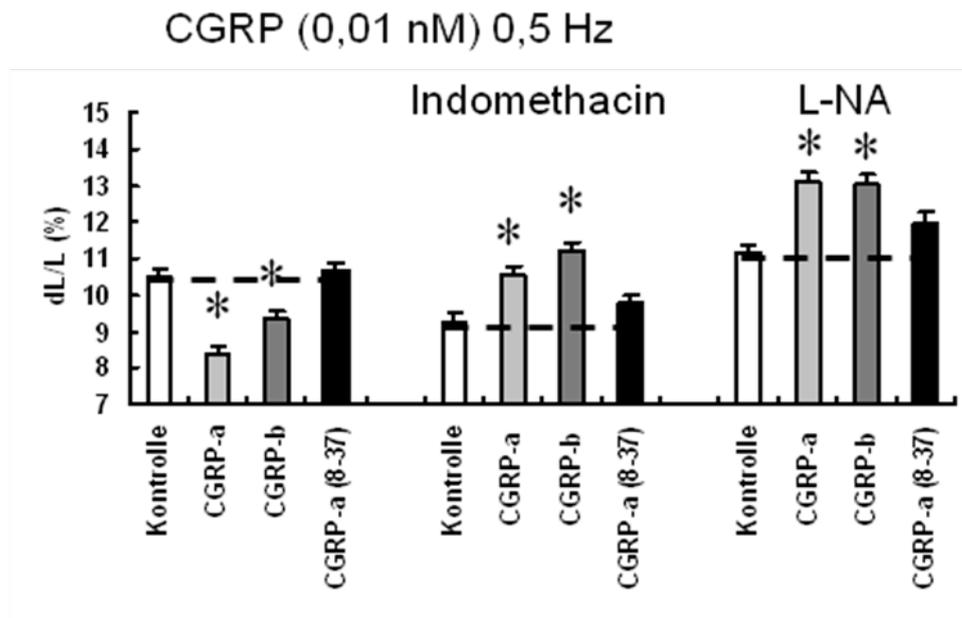


Abb. 4.6.1: Einfluss von CGRP 0,01 nM in Anwesenheit von Indomethacin 10 μ M bzw. L-NA 10 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

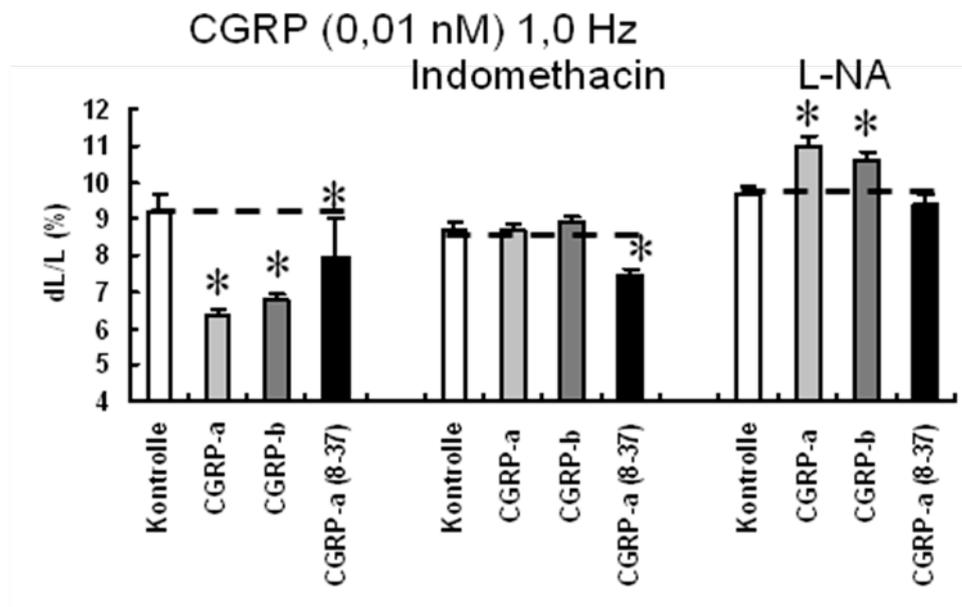


Abb. 4.6.2: Einfluss von CGRP 0,01 nM in Anwesenheit von Indomethacin 10 μ M bzw. L-NA 10 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

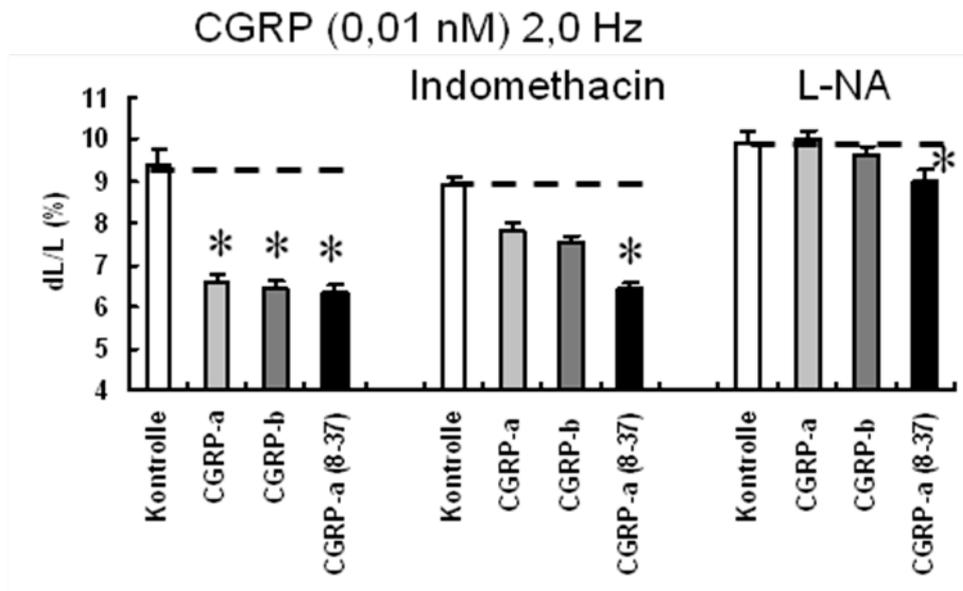


Abb. 4.6.3: Einfluss von CGRP 0,01 nM in Anwesenheit von Indomethacin 10 μ M bzw. L-NA 10 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.7 Die Akutwirkung von CGRP- α auf Wistar-Ratten Herzen im Langendorff-System

Zur Untersuchung der Wirkung von CGRP- α am schlagenden Herzen wurde ein Langendorff-System benutzt. Es wurden wie im Methoden Teil beschrieben, ca. 12 Wochen alte, 200-300 g schwere, männliche Wistar Ratten benutzt.

4.7.1 Einfluss auf den linksventrikulären entwickelten Druck (LVDP)

In der folgenden Abbildung ist der linksventrikuläre entwickelte Druck über einen Zeitraum von 5 Minuten nach Zugabe von CGRP- α 0,1 nM gemessen worden. Es zeigte sich ein signifikanter Druckabfall im Vergleich zum Ausgangsdruck.

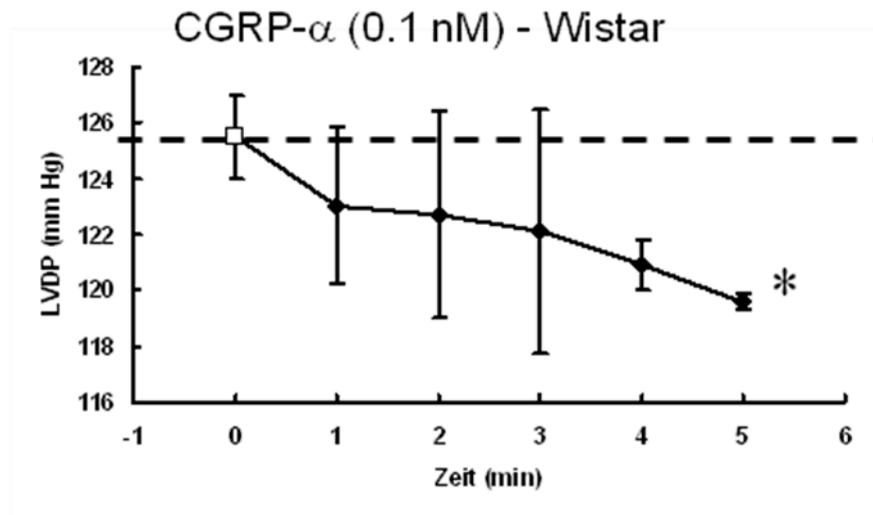


Abb. 4.7.1: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf den LVDP von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.7.2 Einfluss auf Herzfrequenz und Frequenz-Druck Produkt

Die Herzen aus den normotensiven Tieren zeigten keine signifikanten Änderungen der Herzfrequenz und des Frequenz-Druck Produktes bei Gabe von CGRP- α 0,1 nM.

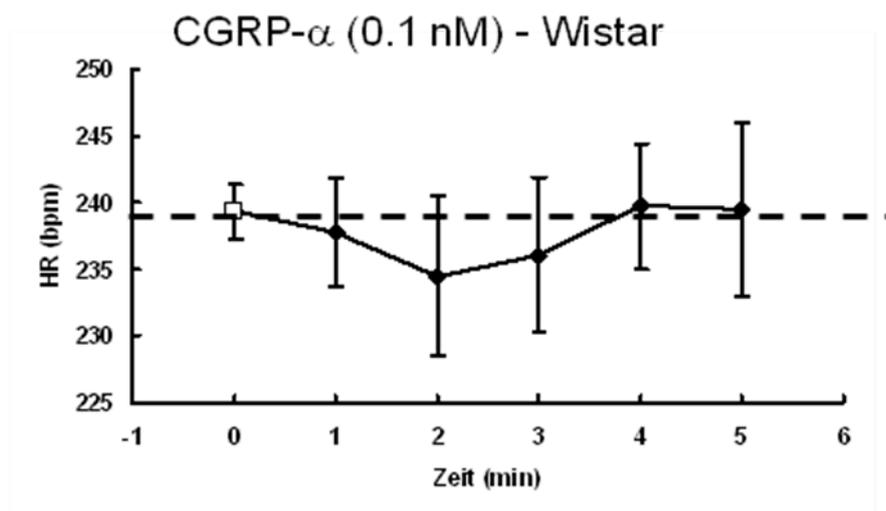


Abb. 4.7.2: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf die HR von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Frequenzveränderung normiert auf die Herzfrequenz. $n = 5$ Herzen.

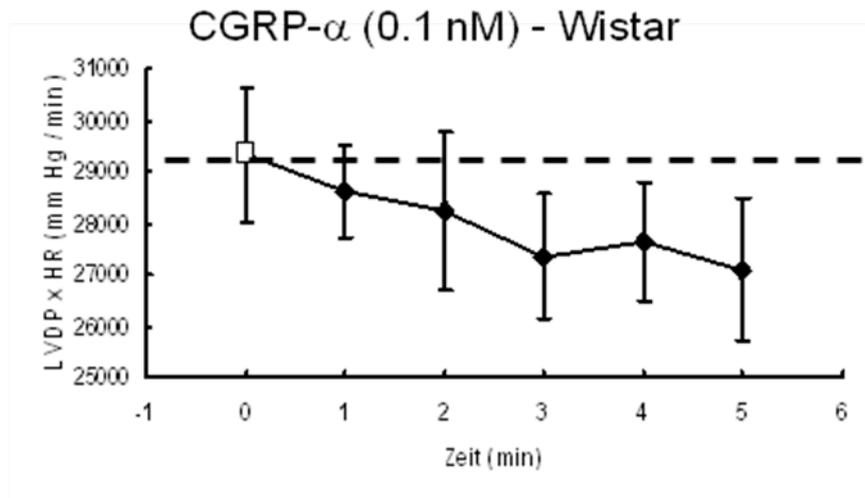


Abb. 4.7.2.1: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf das LVDP x HR von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. n = 5 Herzen.

4.7.3 Einfluss auf den Perfusionsdruck

Der Ausgangsperfusionsdruck lag bei 45,6 mmHg und zeigte nach Zugabe von 0,1 nM CGRP- α in den ersten beiden Minuten einen Anstieg des Druckes. Nach 2 Minuten Perfusion fiel der Perfusionsdruck dann unter den Ausgangswert bis er zu einem signifikant niedrigeren Wert nach 5 Minuten gelangte.

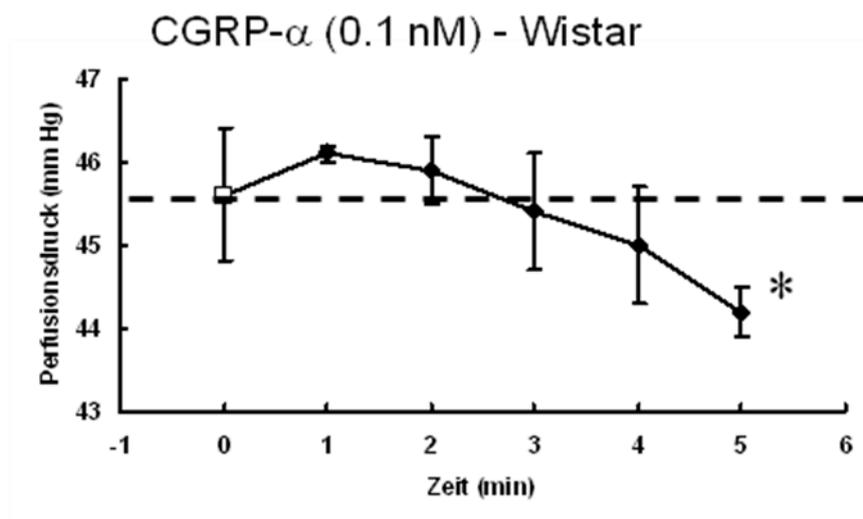


Abb. 4.7.3: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf den Perfusionsdruck von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den Perfusionsdruck. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , n = 5 Herzen.

4.8 Einfluss von Atenolol bzw. L-NA auf die Akutwirkung von CGRP- α im Langendorff-System mit Wistar-Ratten Herzen

Im nächsten Versuch wurden zur Ausschaltung des Sympathikus am Rattenherzen die β_1 Rezeptoren mit Atenolol 10 μM blockiert. Desweiteren wurde im Vergleich dazu die NO-Synthase mit 10 μM L-NA inhibiert.

4.8.1 Wirkung auf den linksventrikulären entwickelten Druck (LVDP)

Der LVDP, welcher unter CGRP- α einen Druckabfall zeigte, blieb auch unter der zusätzlichen Blockierung mit Atenolol signifikant unter dem Ausgangswert. Allerdings führte L-NA zu einer Aufhebung des Druckabfalles.

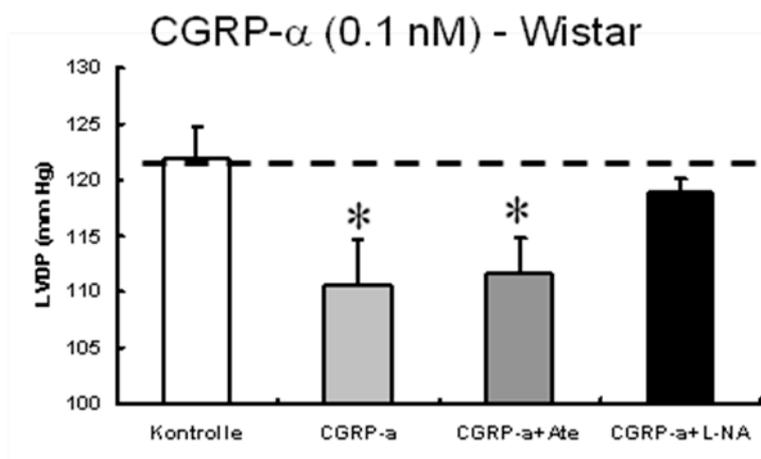


Abb. 4.8.1: Einfluss von CGRP- α , Atenolol und L-NA auf den LVDP von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 5$ Herzen.

4.8.2 Wirkung auf die Herzfrequenz

Die Herzfrequenz, die im Vergleich zur Kontrolle unter CGRP- α und CGRP- α + Atenolol gleich blieb, zeigte einen deutlich signifikanten Frequenzanstieg unter L-NA im Langendorff-System.

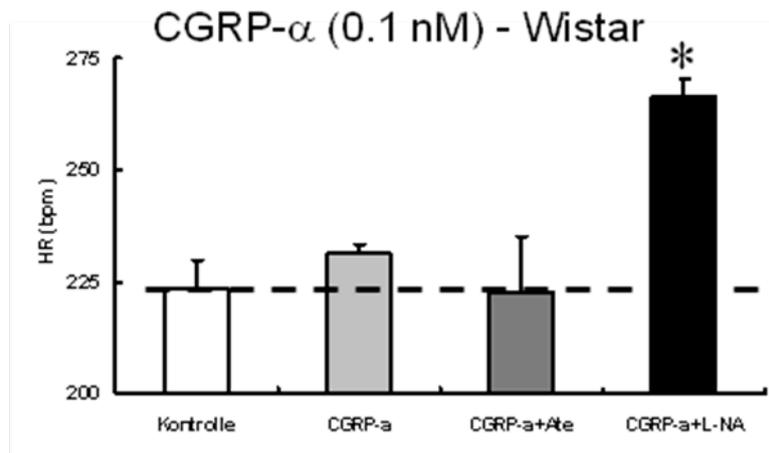


Abb. 4.8.2: Einfluss von CGRP- α , Atenolol und L-NA auf die HR von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Frequenzveränderung normiert auf die Herzfrequenz. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 5$ Herzen.

4.8.3 Wirkung auf das Frequenz-Druck Produkt

Beim Aufzeichnen des LVDP x HR ließen sich keine signifikanten Änderungen durch die Zugabe von Atenolol bzw. L-NA messen. L-NA zeigte zwar einen positiven Effekt im Bezug auf die Kontrolle, jedoch wiesen die Ergebnisse eine größere Standardabweichung auf.

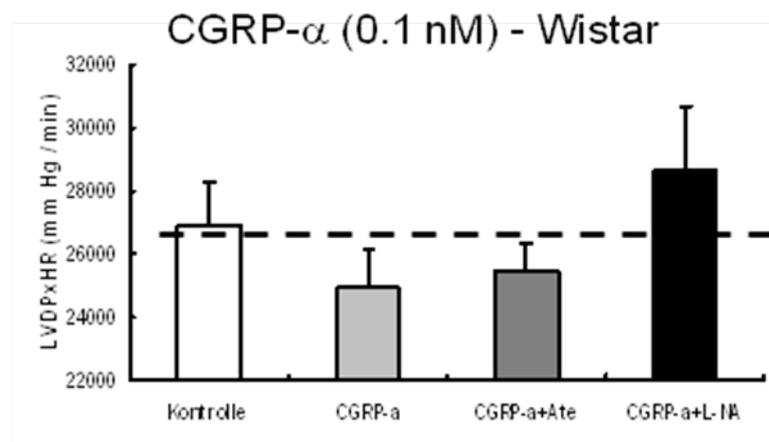


Abb. 4.8.3: Einfluss von CGRP- α , Atenolol und L-NA, auf das LVDP x HR von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. $n = 5$ Herzen.

4.8.4 Wirkung auf den Perfusionsdruck

Wie in der Abb. 4.7.3 zu sehen, führte CGRP- α 0,1 nM zu einer signifikanten Senkung des Perfusionsdruckes im Vergleich zur Kontrolle. Diese Messergebnisse änderten sich auch nicht unter Zugabe von Atenolol bzw. L-NA und blieben weiterhin signifikant negativ.

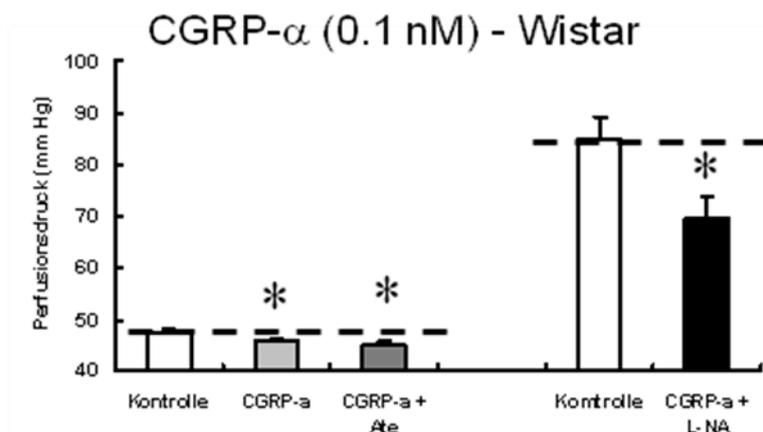


Abb. 4.8.4: Einfluss von CGRP- α , Atenolol und L-NA auf den Perfusionsdruck von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den Perfusionsdruck. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 5$ Herzen.

4.9 Akutwirkung von CGRP- α , unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von Wistar Ratten

In den folgenden drei Versuchen wurden die Herzmuskelzellen mit Angiotensin II 100 nM über Nacht inkubiert, bevor der Einfluss von CGRP- α auf das Kontraktionsverhalten untersucht wurde.

Über den kompletten Frequenzbereich von 0,5 – 2,0 Hz führte die Inkubation mit Angiotensin II dazu, dass die spezifischen signifikanten Zellverkürzungseffekte von CGRP- α 10 nM und CGRP- α 0,01 nM verschwanden.

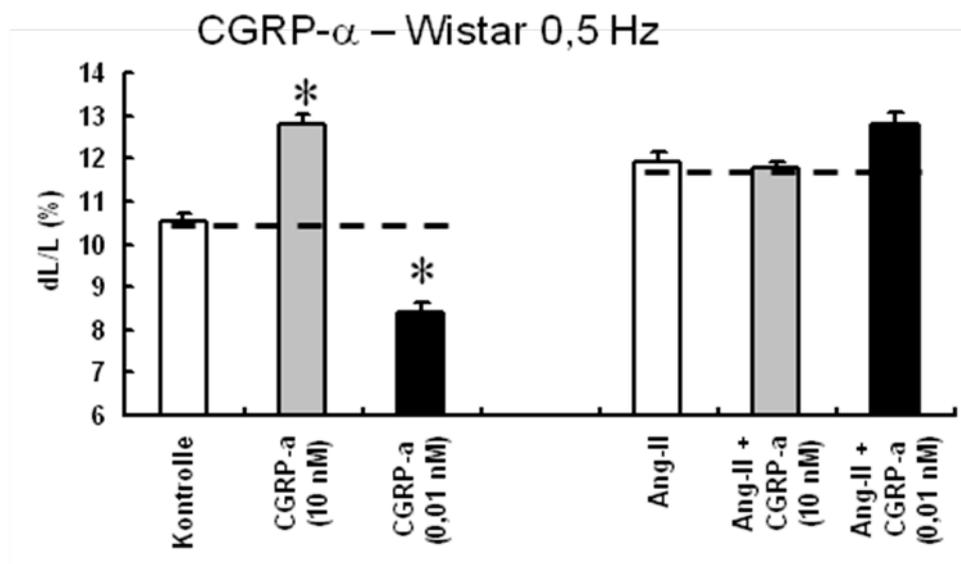


Abb. 4.9.1: Einfluss von CGRP- α und Angiotensin II 100 μ M auf die relative Zellverkürzung, von Wistar Ratten, bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

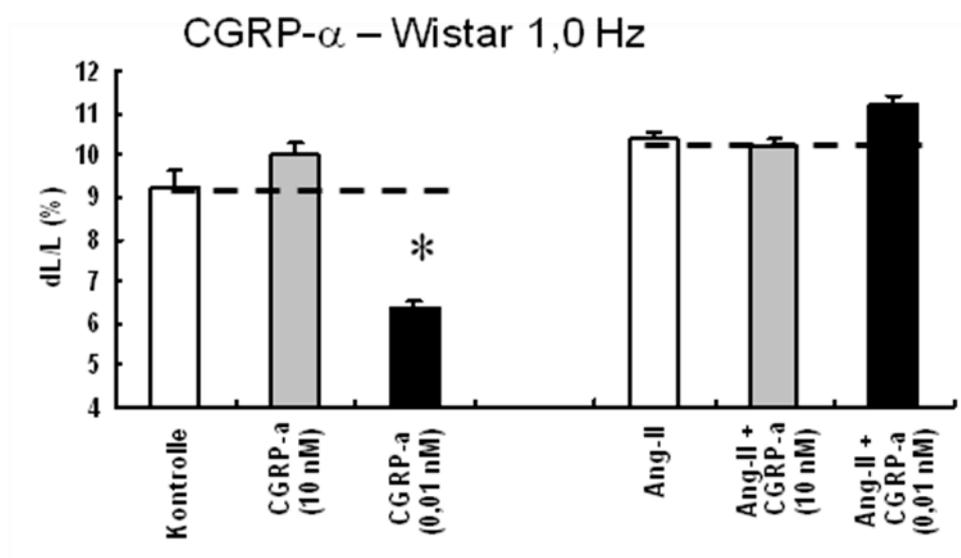


Abb. 4.9.2: Einfluss von CGRP- α und Angiotensin II 100 μ M auf die relative Zellverkürzung, von Wistar Ratten, bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

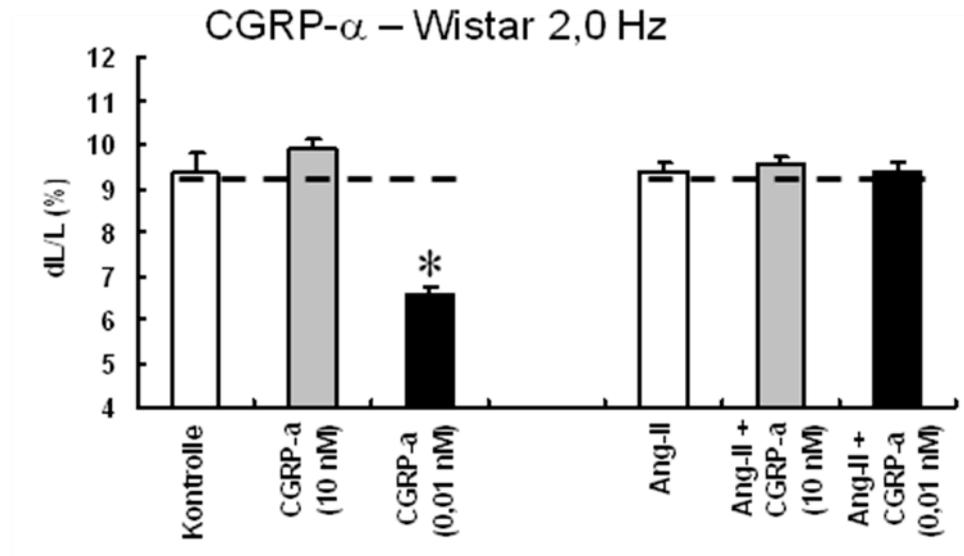


Abb. 4.9.3: Einfluss von CGRP- α und Angiotensin II 100 μ M auf die relative Zellverkürzung, von Wistar Ratten, bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.10 Akutwirkung von CGRP- α , unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten aus spontan hypertensiven Ratten (SHR)

Die folgenden Versuche wurden mit ca. 12 Wochen alten, 200-300 g schweren, männlichen spontan hypertensiven Ratten (SHR) durchgeführt.

Im Unterschied zu den Wistar Tieren zeigten die SHR bei Stimulationsfrequenzen von 0,5 Hz und 1,0 Hz signifikante positive Verkürzungseffekte unter CGRP- α 10 nM und CGRP- α 0,01 nM im Vergleich zur Kontrolle. Besonders bei der Konzentration von 0,01 nM ließen sich die Unterschiede erkennen. War bei der Wistar Ratte noch ein negativer Effekt zu sehen (Abb. 4.7.1 – 4.7.3), so zeigte sich nun bei den SHR eine positive Zellverkürzung (Abb. 4.10.1 u. 4.10.2).

Bei den Versuchen mit einer Frequenz von 0,5 Hz und 1,0 Hz ließen sich unter der Zugabe von Angiotensin II keine Zellverkürzungseffekte, im Vergleich zur Kontrolle, von CGRP- α aufzeichnen (Abb. 4.10.1 u. 4.10.2).

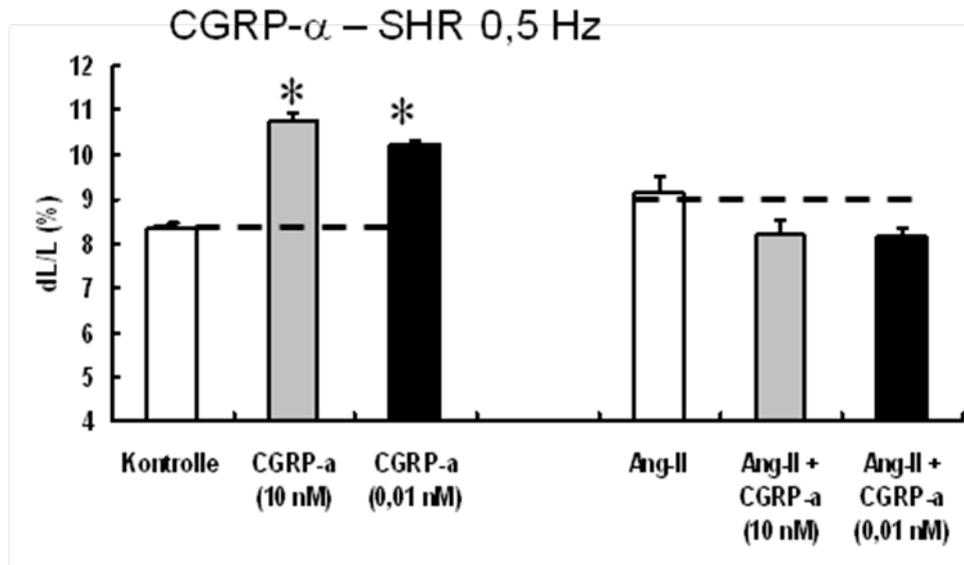


Abb. 4.10.1: Einfluss von CGRP- α und Angiotensin II 100 nM auf die relative Zellverkürzung, von SHR Ratten, bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

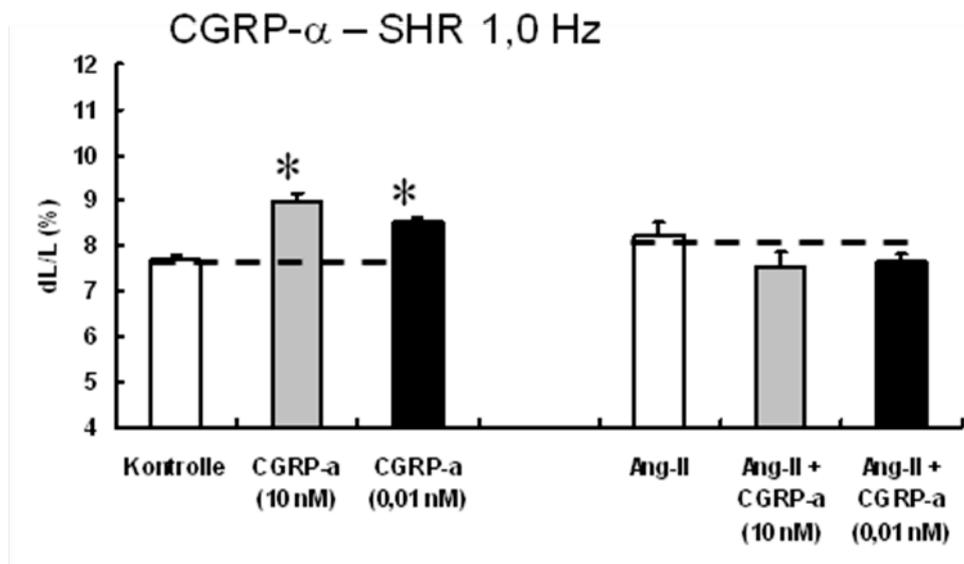


Abb. 4.10.2: Einfluss von CGRP- α und Angiotensin II 100 nM auf die relative Zellverkürzung, von SHR Ratten, bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

Auch bei einer Frequenz von 2,0 Hz zeigten sich Unterschiede unter den verschiedenen Ratten Arten. Der negative Effekt von CGRP- α 0,01 nM, der bei den Wistar Tieren auftrat, war bei den SHR nicht zu messen (Abb. 4.7.4 u. 4.10.3). Bei der Zugabe von Angiotensin II

kam es dafür aber bei den SHR zu einer negativen signifikanten Zellverkürzung, im Vergleich zur Kontrolle. (Abb. 4.10.3)

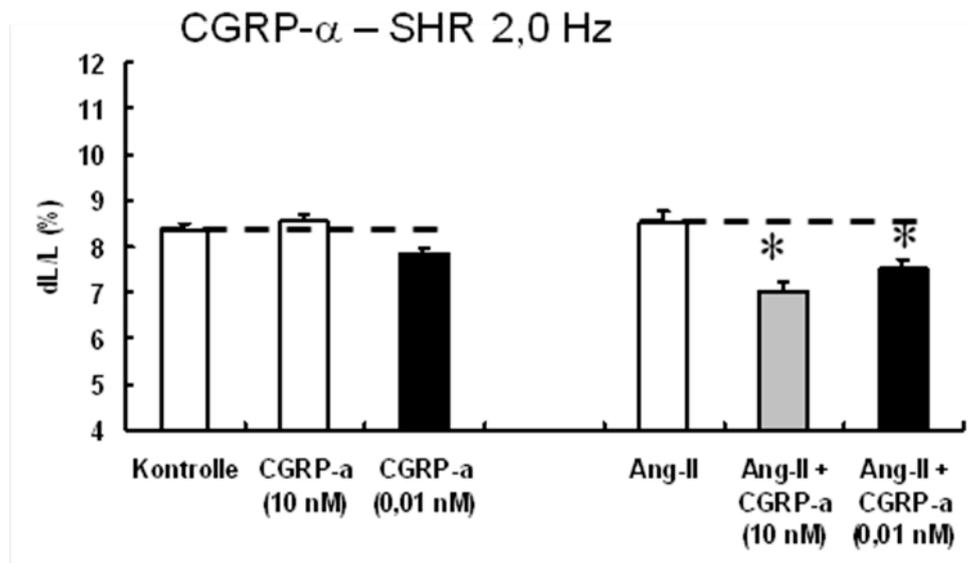


Abb. 4.10.3: Einfluss von CGRP- α und Angiotensin II 100 nM auf die relative Zellverkürzung, von SHR Ratten, bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Ang-II, $n = 36$ Zellen.

4.11 Die Akutwirkung von CGRP- α auf SHR Herzen im Langendorff-System

Zur Untersuchung der Wirkung von CGRP- α 0,1 nM am schlagenden Herzen wurde ein Langendorff-System benutzt. Es wurden wie im Methoden Teil beschrieben, ca. 12 Wochen alte, 200-300 g schwere, männliche SHR Tiere verwendet.

4.11.1 Einfluss auf den linksventrikulären entwickelten Druck (LVDP)

In der folgenden Abbildung ist der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) über einen Zeitraum von 5 Minuten nach Zugabe von CGRP- α 0,1 nM gemessen worden. Es zeigte sich kein signifikanter Druckabfall im Vergleich zum Ausgangsdruck, wie im Versuch mit Wistar Tieren zu beobachten war.

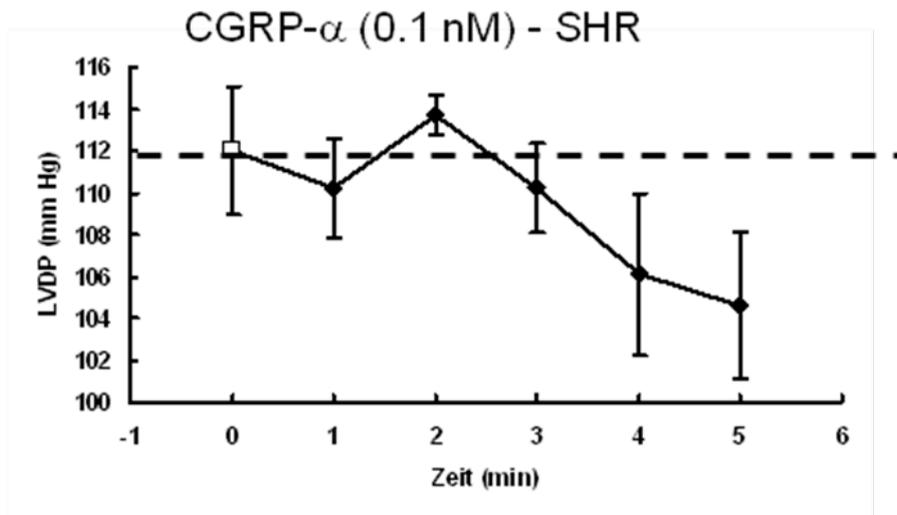


Abb. 4.11.1: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf den LVDP von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. n = 5 Herzen.

4.11.2 Einfluss auf Herzfrequenz und Frequenz-Druck Produkt

Die SHR Herzen zeigten eine Zunahme der Herzfrequenz und des Frequenz-Druck Produktes bei Gabe von CGRP- α 0,1 nM, welche nach 4 Minuten signifikant gegenüber des Ausgangswertes waren.

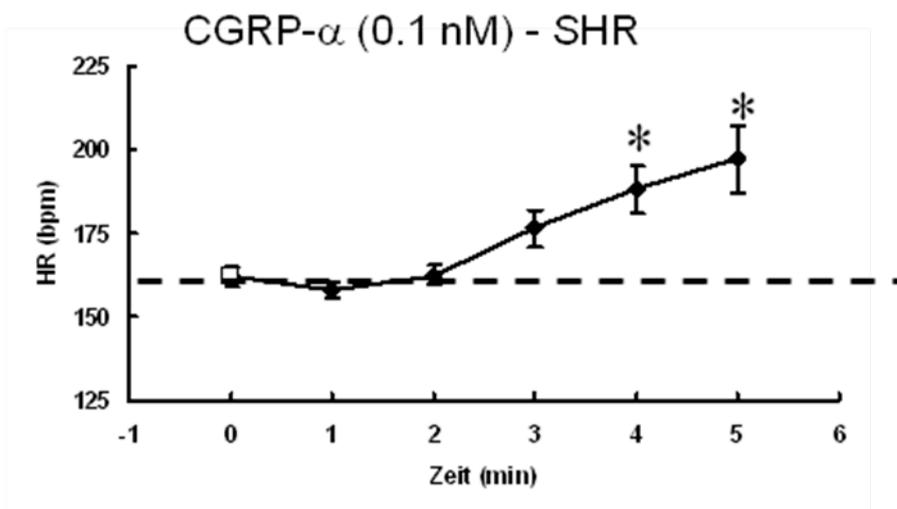


Abb. 4.11.2: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf die HR von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Frequenzveränderung normiert auf die Herzfrequenz. * = p < 0,05 vs. t₀, n = 5 Herzen.

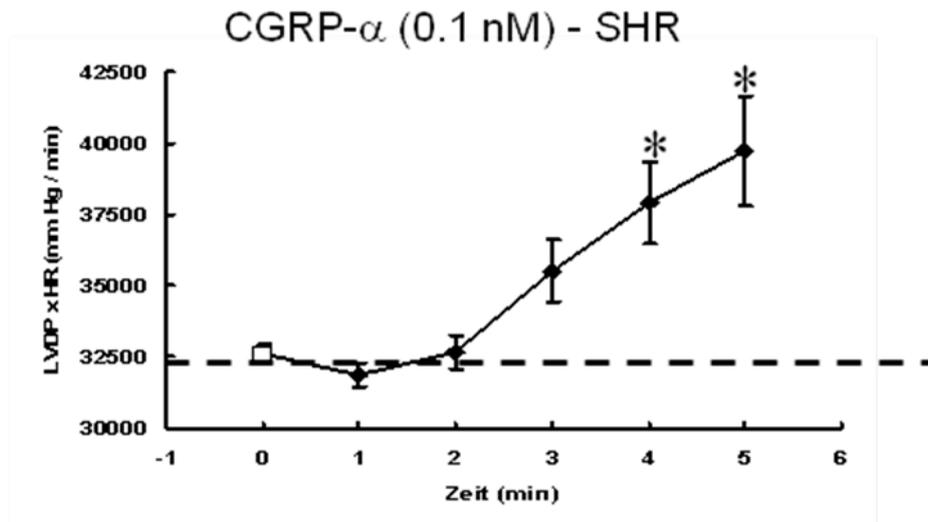


Abb. 4.11.2.1: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf das LVDP x HR von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.11.3 Einfluss auf den Perfusionsdruck

Der Perfusionsdruck bei den SHR zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei den Wistar Ratten (Abb. 4.7.3 u. 4.11.3). Nach einer Minute Perfusion kam es zu einer kurzfristigen Zunahme des Perfusionsdruckes. In den darauffolgenden Minuten zeigte sich ein Abfall des Perfusionsdruckes, der nach 4 Minuten signifikant niedriger war als der Ausgangswert.

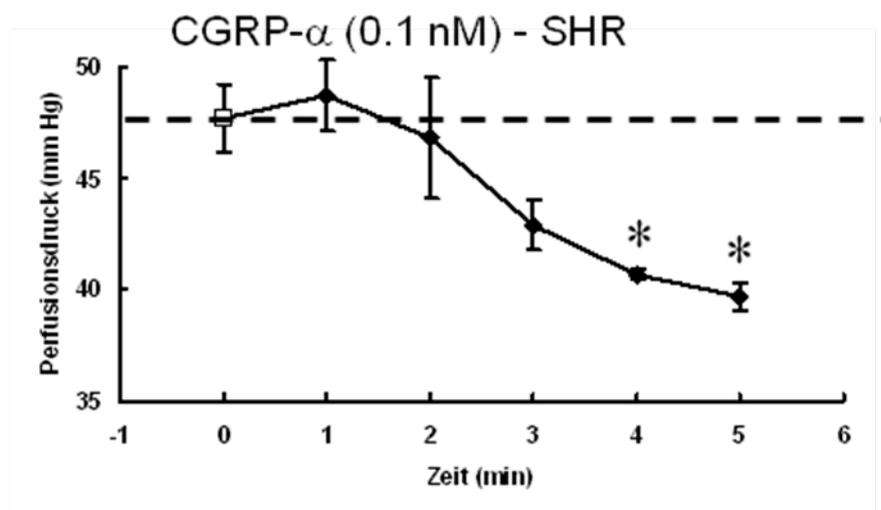


Abb. 4.11.3: Einfluss von CGRP- α 0,1 nM auf den Perfusionsdruck von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den Perfusionsdruck. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.12 Akutwirkung von Intermedin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

Für die Bestimmung der Akutwirkung von Intermedin, wurden die Kulturschalen mit verschiedenen Konzentrationen inkubiert und danach stimuliert.

Unter der Stimulation mit 0,5 Hz reagierten die Kardiomyozyten mit einer signifikanten Zunahme der Verkürzung im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt zeigte sich ab einer Konzentration von 1 pM (Abb. 4.12.1).

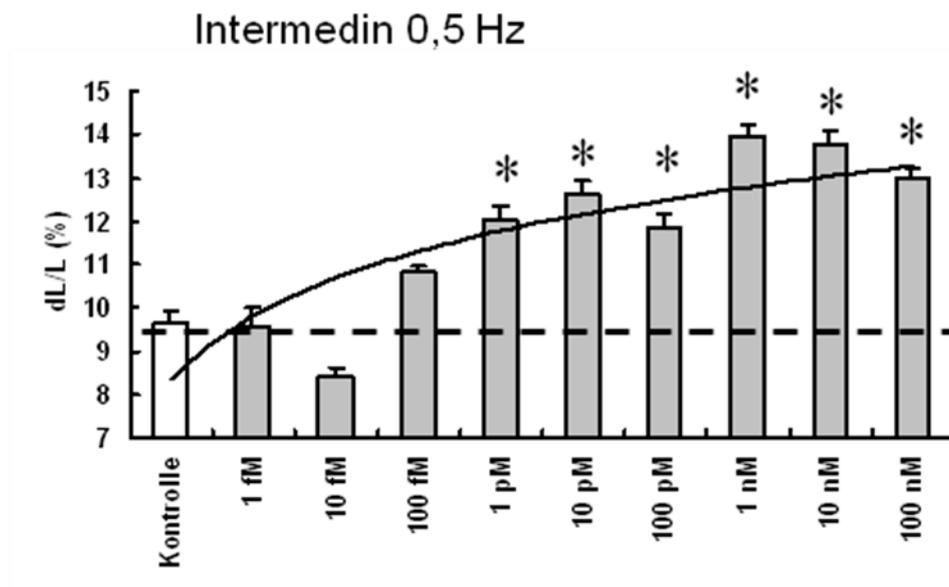


Abb. 4.12.1: Einfluss unterschiedlicher Intermedin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

Bei Verwendung der Stimulationsfrequenz von 1,0 Hz wurden ähnliche Messergebnisse aufgezeichnet wie bei 0,5 Hz. Zwischen 10 pM und 100 nM traten positive Verkürzungseffekte auf, die zwar signifikant waren, aber einen kleineren Effekt aufzeigten als bei 0,5 Hz (Abb. 4.12.1 u. 4.12.2).

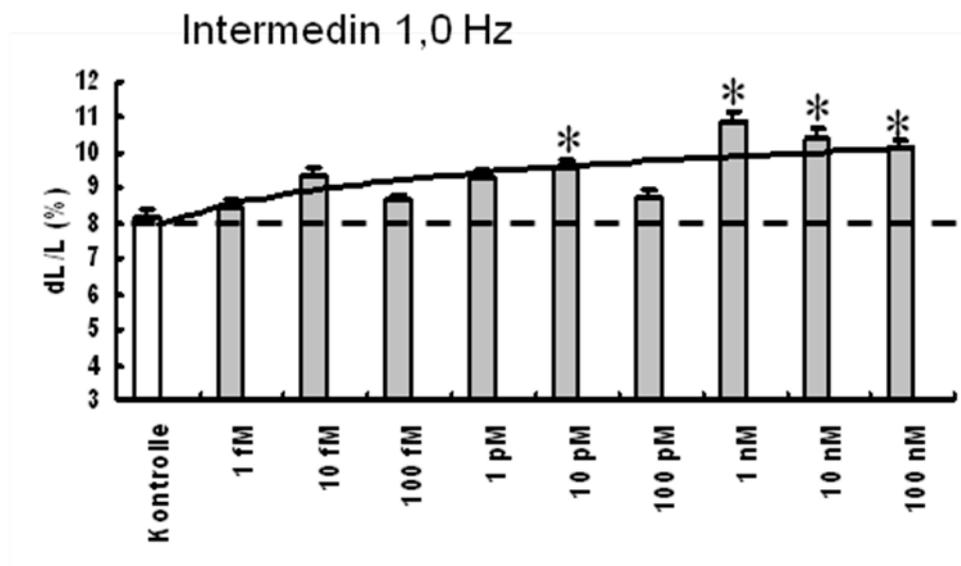


Abb. 4.12.2: Einfluss unterschiedlicher Intermedin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

Intermedin zeigte bei einer Stimulationsfrequenz von 2,0 Hz keine Effekte. Außer bei der Konzentration von 1 nM ließ sich ein signifikanter positiver Verkürzungseffekt messen (Abb. 4.12.3).

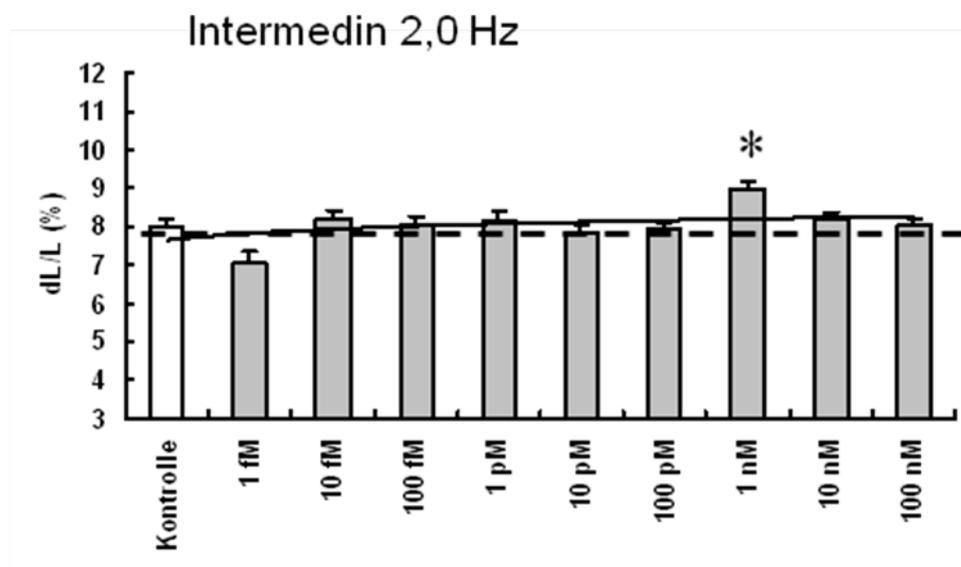


Abb. 4.12.3: Einfluss unterschiedlicher Intermedin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.13 Einfluss der Hemmung der Proteinkinase A-Hemmung mittels H89 auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten bei Akutwirkung von Intermedin

In den folgenden Versuchen wurde die Proteinkinase A-Hemmung mittels des Inhibitors H89 mit einer Konzentration von 1 μ M blockiert.

Bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 und 1,0 Hz zeigten die Herzmuskelzellen eine signifikant bessere Zellverkürzung mit Intermedin 1 nM bzw. unter Zugabe von H89 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Zugabe von H89 bei Stimulation von 2,0 Hz ließ den signifikant positiven Effekt verschwinden.

Die positiven Zellverkürzungseffekte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, blieben bei Intermedin 1 nM auch unter Blockierung der Proteinkinase A bei 0,5 Hz und 1,0 Hz erhalten (Abb. 4.13.1 u. 4.13.2).

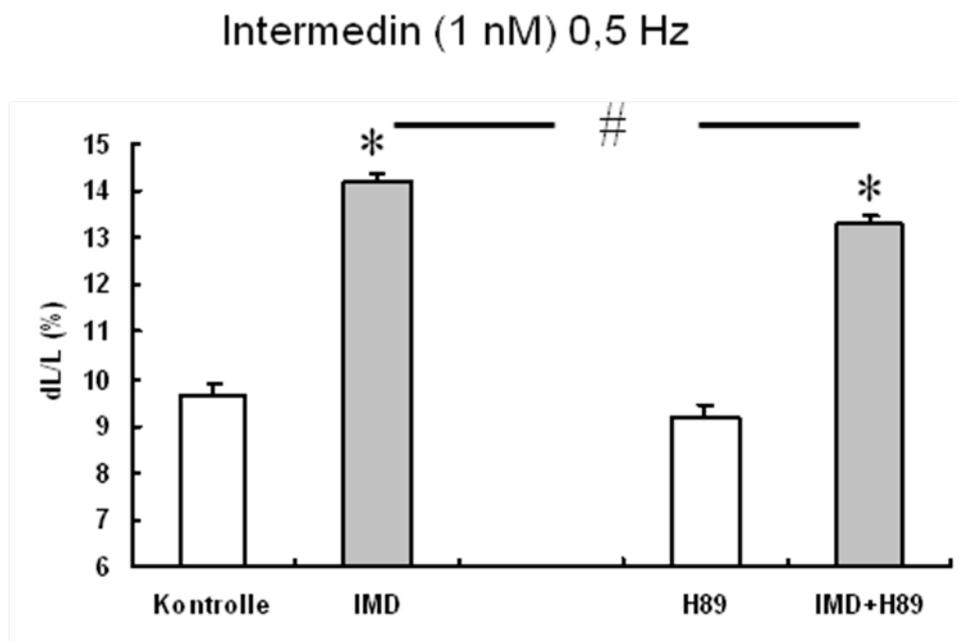


Abb. 4.13.1: Einfluss von Intermedin 1 nM in Anwesenheit von H89 1 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # = $p < 0,05$ vs. ohne H89, $n = 36$ Zellen.

Intermedin (1 nM) 1,0 Hz

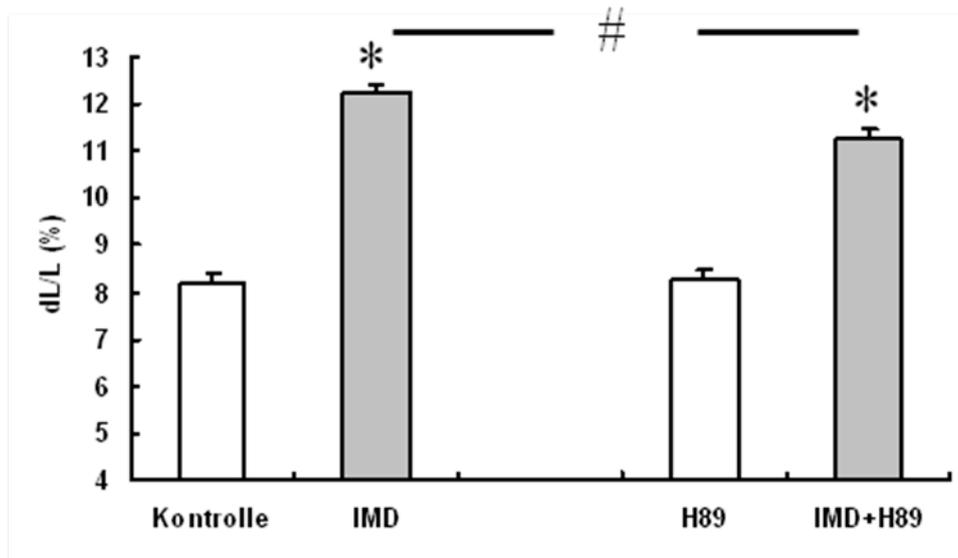


Abb. 4.13.2: Einfluss von Intermedin 1 nM in Anwesenheit von H89 1 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # = $p < 0,05$ vs. ohne H89, $n = 36$ Zellen.

Intermedin (1 nM) 2,0 Hz

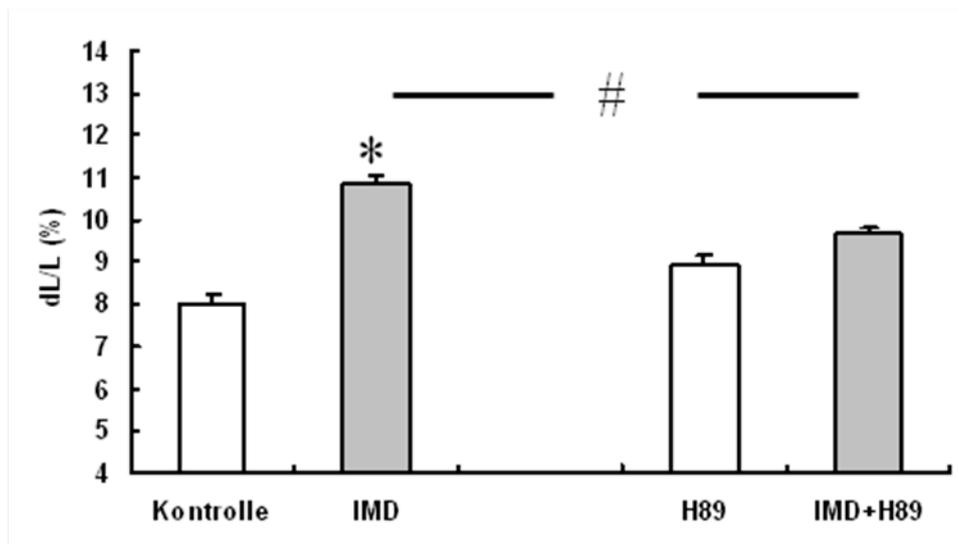


Abb. 4.13.3: Einfluss von Intermedin 1 nM in Anwesenheit von H89 1 μ M auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # = $p < 0,05$ vs. ohne H89, $n = 36$ Zellen.

4.14 Akutwirkung von Adrenomedullin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

In den folgenden Versuchen wurden die Herzmuskelzellen mit Adrenomedullin inkubiert und danach stimuliert. Die Zellen zeigten bei 0,5 Hz, ähnlich wie Abb. 4.12.1, ab Konzentrationen von 1 pM und höher eine Zunahme der relativen Verkürzung, welche signifikant im Vergleich zur Kontrolle war (Abb. 4.14.1). Mit einer Stimulationsfrequenz von 1,0 Hz waren diese Effekte nicht mehr messbar. Es zeigte sich sogar bei 1 fM eine signifikante negative Zellverkürzung (Abb. 4.14.2). Unter 2,0 Hz Stimulation wurde von 1 fM bis 100 nM Adrenomedullin eine signifikante Abnahme der Verkürzung gemessen (Abb. 4.14.3).

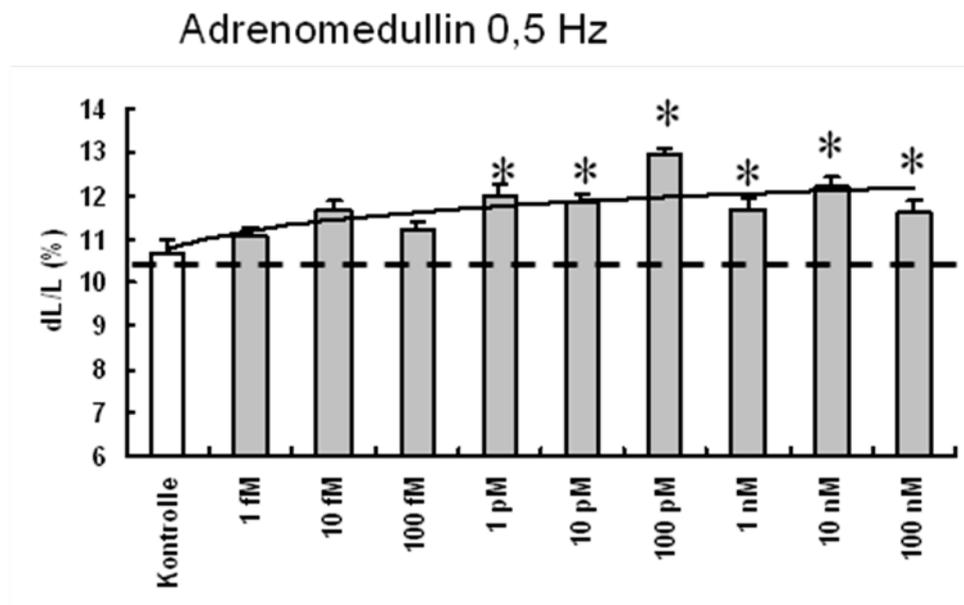


Abb. 4.14.1: Einfluss unterschiedlicher Adrenomedullin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

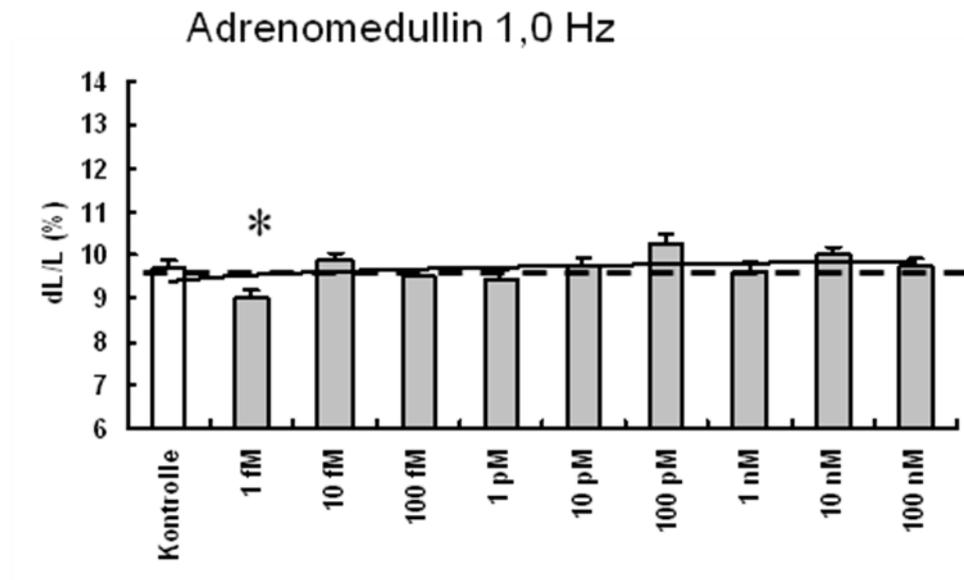


Abb. 4.14.2: Einfluss unterschiedlicher Adrenomedullin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

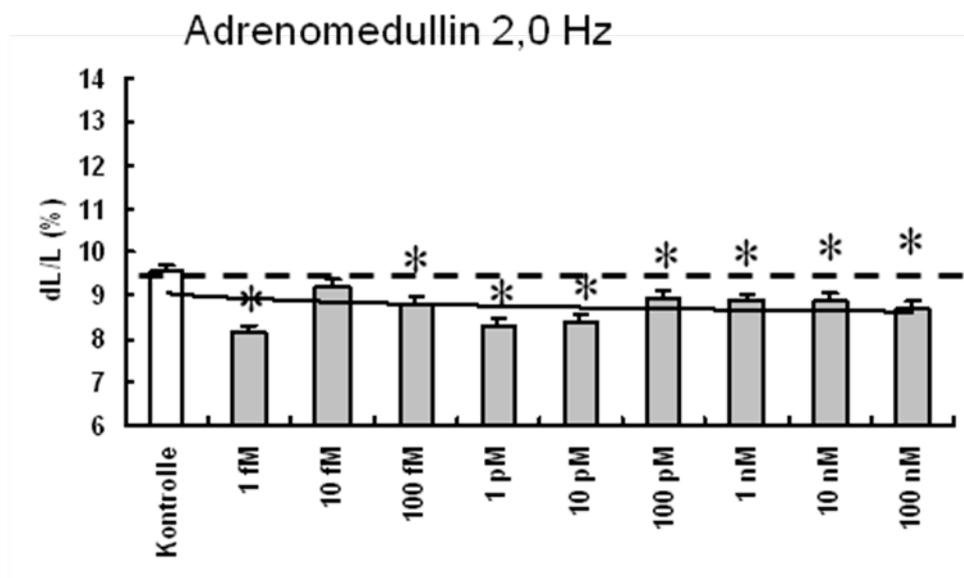


Abb. 4.14.3: Einfluss unterschiedlicher Adrenomedullin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.15 Die Akutwirkung von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf Herzmuskelzellen von Wistar Ratten im Langendorff-System

In den nächsten Versuchen wurden die Wirkungen von Intermedin 1 nM, Adrenomedullin 1 nM und Isoprenalin 10 nM am schlagenden Rattenherz untersucht.

4.15.1 Einfluss auf linksventrikulären Druckanstieg, Herzfrequenz und Frequenz-Druck Produkt

Im Vergleich zu Isoprenalin, was einen signifikanten positiven Effekt zeigte, Anstieg von LVDP, HR und LVDP x HR nach 3 Minuten, führten die Substanzen Intermedin und Adrenomedullin zu keiner Änderung im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 4.15.1.1 – 4.15.1.3).

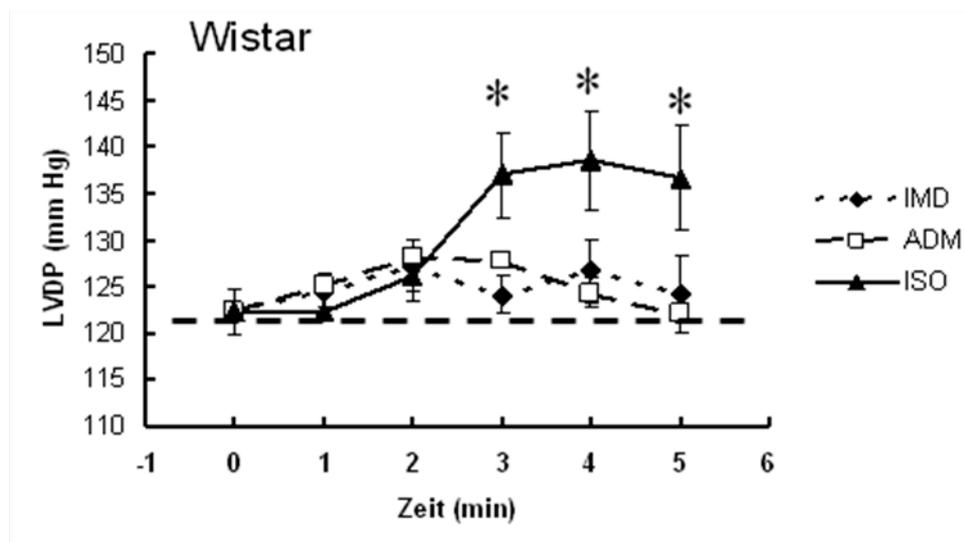


Abb. 4.15.1.1: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf den LVDP von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen..

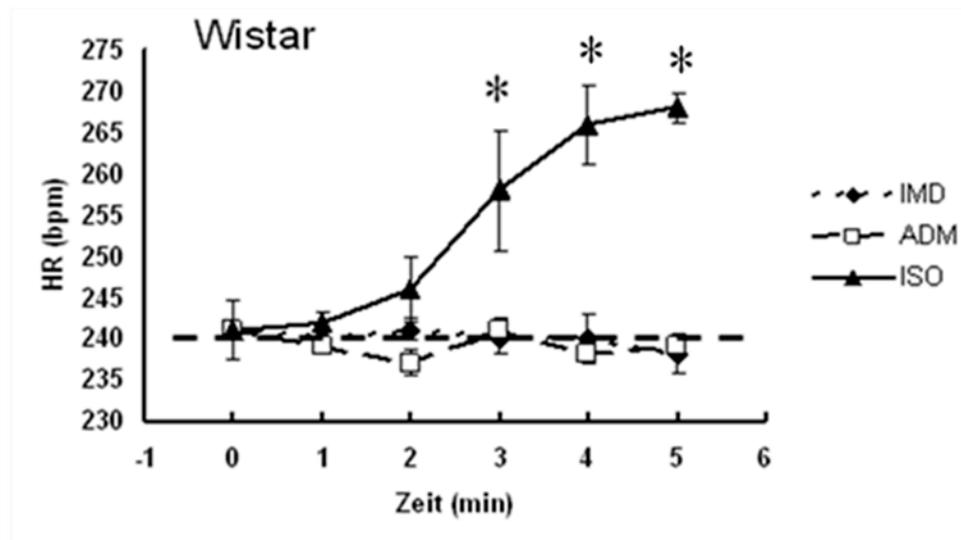


Abb. 4.15.1.2: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf die HR von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Frequenzveränderung normiert auf die Herzfrequenz. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

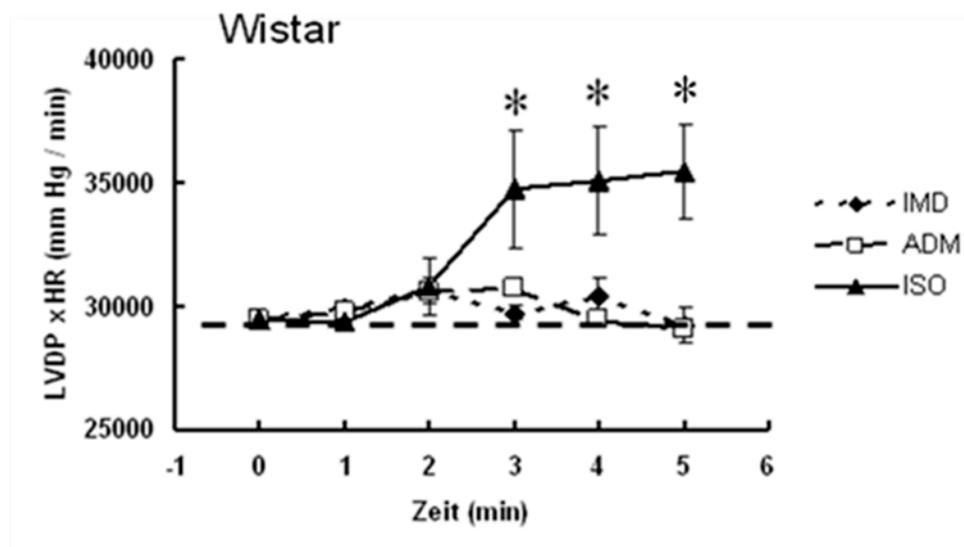


Abb. 4.15.1.3: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf das LVDP x HR von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt.

* = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.15.2 Einfluss auf den Perfusionsdruck

Anhand der Abbildung 4.15.2 ist zu sehen, dass Isoprenalin und Adrenomedullin einen signifikant negativen Einfluss auf den Perfusionsdruck von Wistar Herzen hatten. Bei Gabe von Intermedin ließen sich nach 4 Minuten positive Effekte aufzeichnen, die jedoch große Standardabweichungen zeigten und zu keinem signifikanten Ergebnis führten.

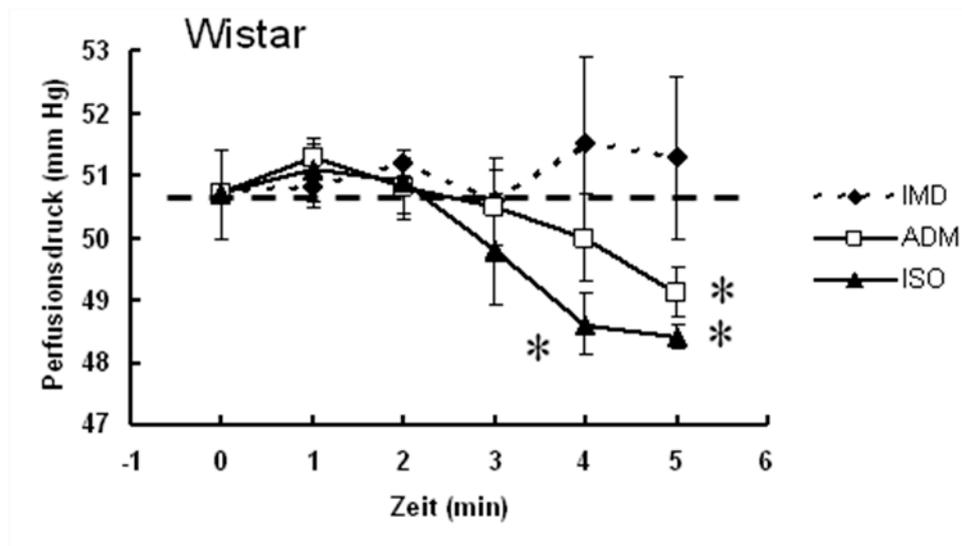


Abb. 4.15.2: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf den Perfusionsdruck von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.16 Akutwirkung von Intermedin und Adrenomedullin, unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von Wistar Ratten

In den folgenden drei Versuchen wurden die Herzmuskelzellen mit Angiotensin II 100 nM über Nacht inkubiert, bevor der Einfluss von Intermedin und Adrenomedullin auf das Kontraktionsverhalten untersucht wurde.

Über den kompletten Frequenzbereich von 0,5 – 2,0 Hz führte die Inkubation mit Angiotensin II dazu, dass die spezifischen signifikanten Zellverkürzungseffekte von Intermedin 1 nM verschwanden.

Der signifikante positive Effekt von Adrenomedullin 1 nM, bei der Stimulation mit 0,5 Hz, blieb auch unter Angiotensin II bestehen (Abb. 4.16.1). Bei 1,0 Hz wurde aus der positiven Zellverkürzung nun ein signifikanter Effekt (Abb. 4.16.2). Beim letzten Versuch wurden die Kardiomyozyten mit 2,0 Hz stimuliert. Hier bewirkte die Inkubation mit Angiotensin II eine Änderung des Adrenomedullin Effektes. Aus einer zunächst negativen Verkürzung, im Vergleich zur Kontrolle, wurde durch Angiotensin II eine signifikant positivere Zellverkürzung (Abb. 4.16.3).

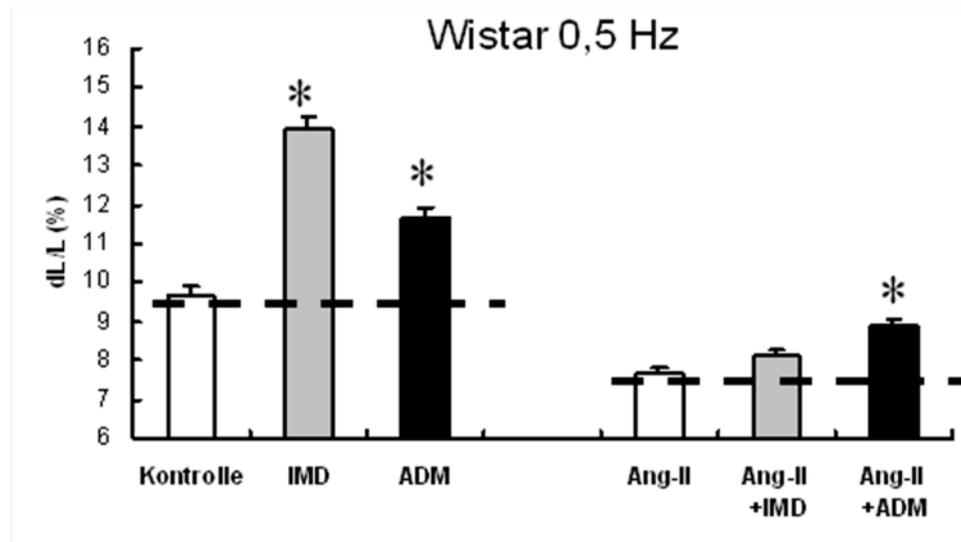


Abb. 4.16.1: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Angiotensin II 100 nM auf die relative Zellverkürzung, von Wistar Ratten, bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

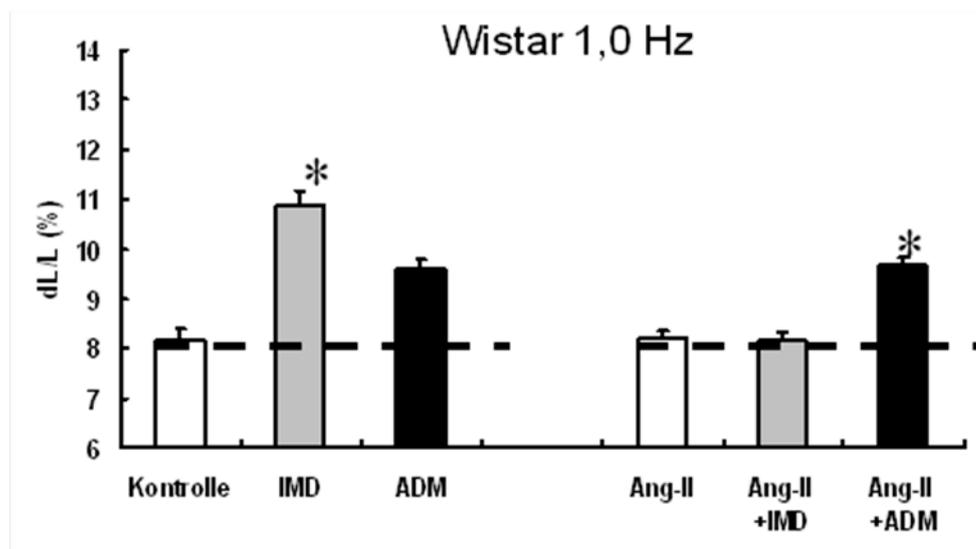


Abb. 4.16.2: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Angiotensin II 100 nM auf die relative Zellverkürzung, von Wistar Ratten, bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

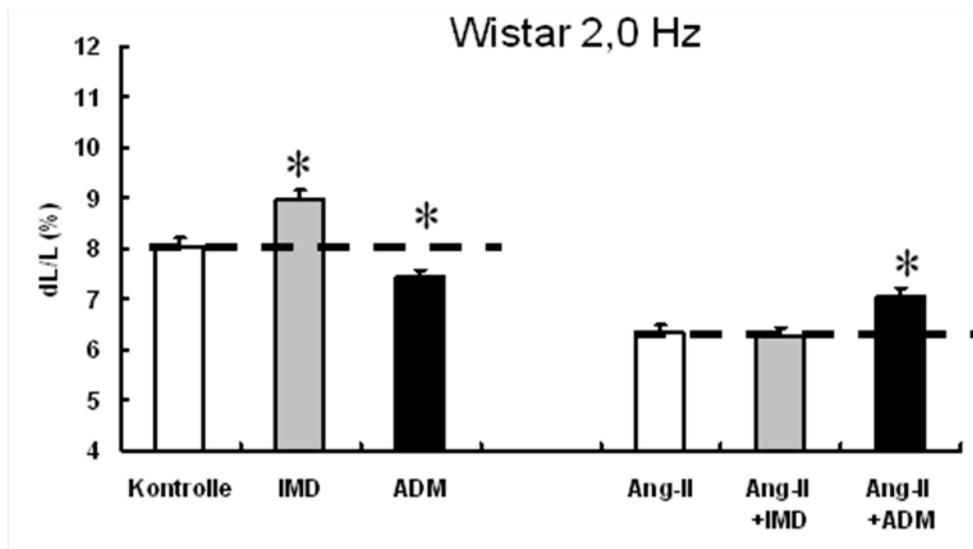


Abb. 4.16.3: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Angiotensin II 100 nM auf die relative Zellverkürzung, von Wistar Ratten, bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.17 Akutwirkung von Intermedin und Adrenomedullin, unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von SHR

Im Vergleich zu Versuch 4.16 wurden nun anstatt Wistar Ratten SHR benutzt.

4.17.1 Stimulation mit 0,5 Hz

Als Stimulationsfrequenz wurde 0,5 Hz benutzt. Intermedin und Adrenomedullin führten dabei zu einer signifikanten positiven Zellverkürzung im Vergleich zur Kontrolle. Diese Effekte wurden durch Angiotensin II aufgehoben und führten bei Adrenomedullin sogar zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktion.

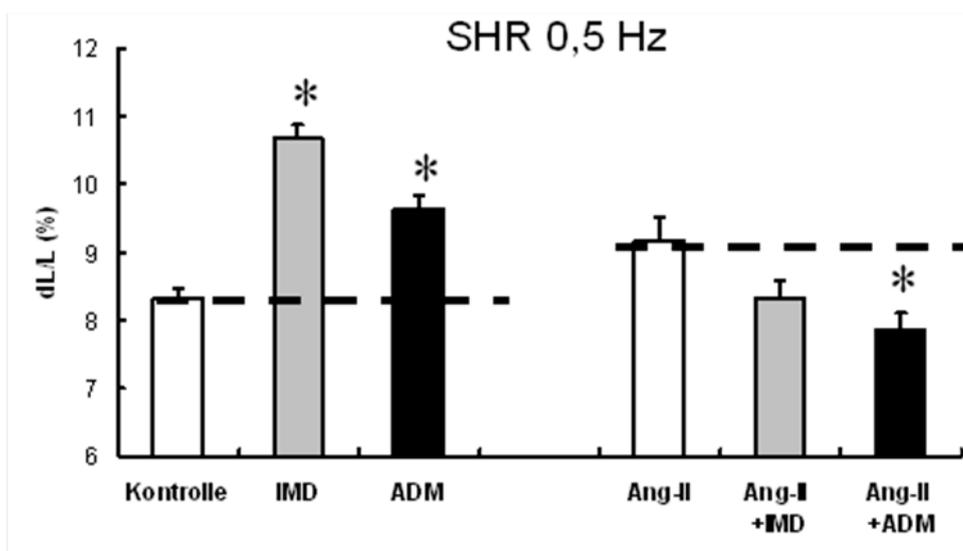


Abb. 4.17.1: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Angiotensin II 100 μ M auf die relative Zellverkürzung, von SHR, bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.17.2 Stimulation mit 1,0 Hz

Bei 1,0 Hz Stimulation wurde die signifikant bessere Kontraktion von Intermedin durch Angiotensin II aufgehoben.

Adrenomedullin hatte keinen Effekt auf die SHR. Erst nach dem Inkubieren mit Angiotensin II konnte eine negative Zellverkürzung gemessen werden, welche signifikant gegenüber der Kontrolle war.

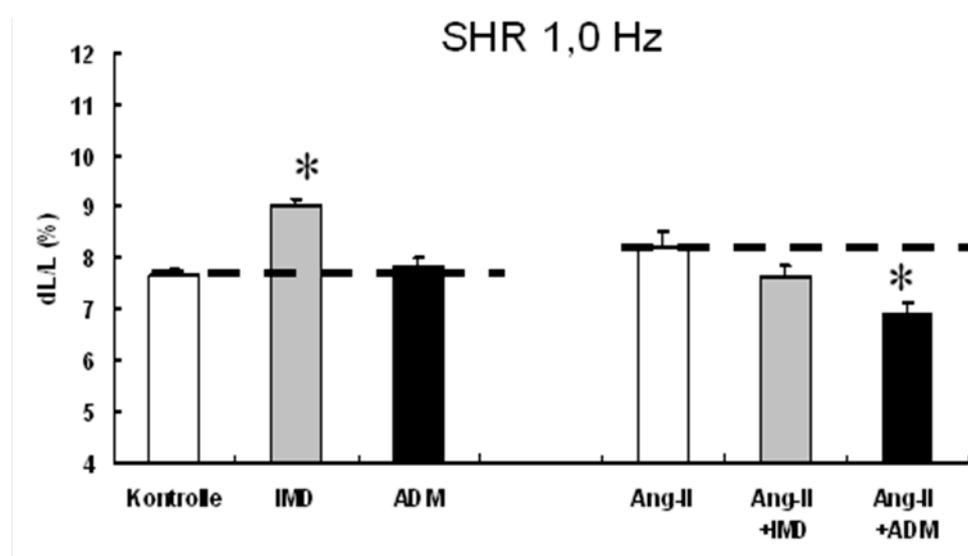


Abb. 4.17.2: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Angiotensin II 100 μ M auf die relative Zellverkürzung, von SHR, bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind

die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.17.3 Stimulation mit 2,0 Hz

Im Versuch mit der Stimulationsfrequenz von 2,0 Hz ließen sich keine Effekte durch die vorherige Inkubation mit Angiotensin II erzielen.

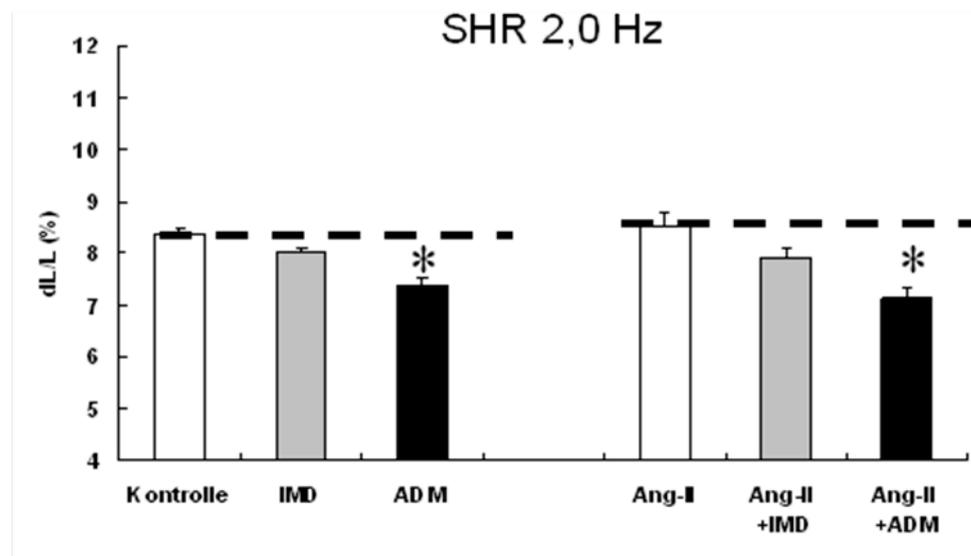


Abb. 4.17.3: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Angiotensin II 100 μ M auf die relative Zellverkürzung, von SHR, bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.18 Die Akutwirkung von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf Herzmuskelzellen von SHR im Langendorff-System

In den nächsten Versuchen wurden die Wirkungen von Intermedin 1 nM, Adrenomedullin 1 nM und Isoprenalin 10 nM am schlagenden Herzen von SHR untersucht.

4.18.1 Einfluss auf den linksventrikulären Druckanstieg

Bei der Untersuchung des LVDP konnten keine signifikanten Messergebnisse bei der SHR aufgezeichnet werden.

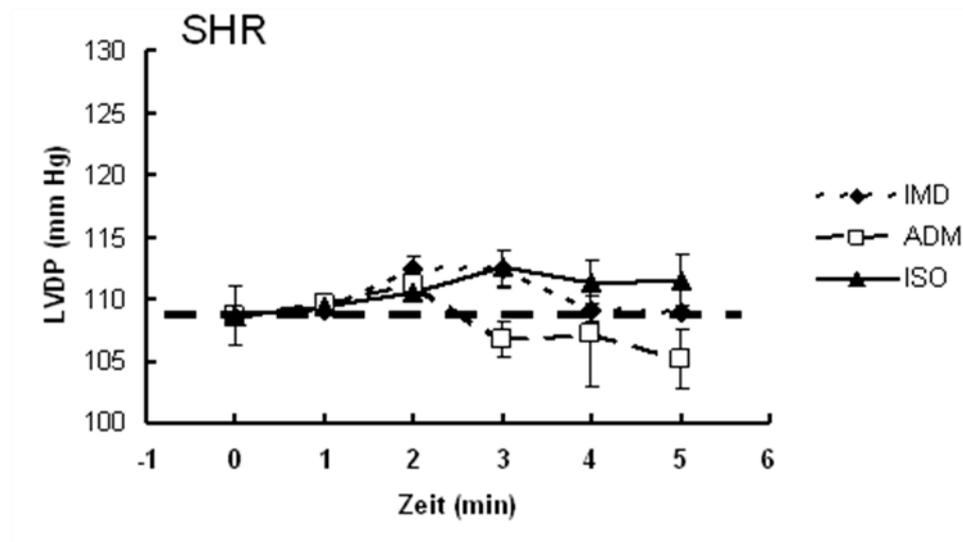


Abb. 4.18.1: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf den LVDP von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. n = 5 Herzen.

4.18.2 Einfluss auf HR und Frequenz-Druck Produkt

Adrenomedullin und Intermedin konnten bei den SHR im Langendorff-System keinen Effekt auf HR und LVDP x HR erzielen. Es konnten nur signifikante Änderungen bei Isoprenalin gemessen werden, die auch schon bei den Wistar Ratten aufgetreten waren (4.15.1).

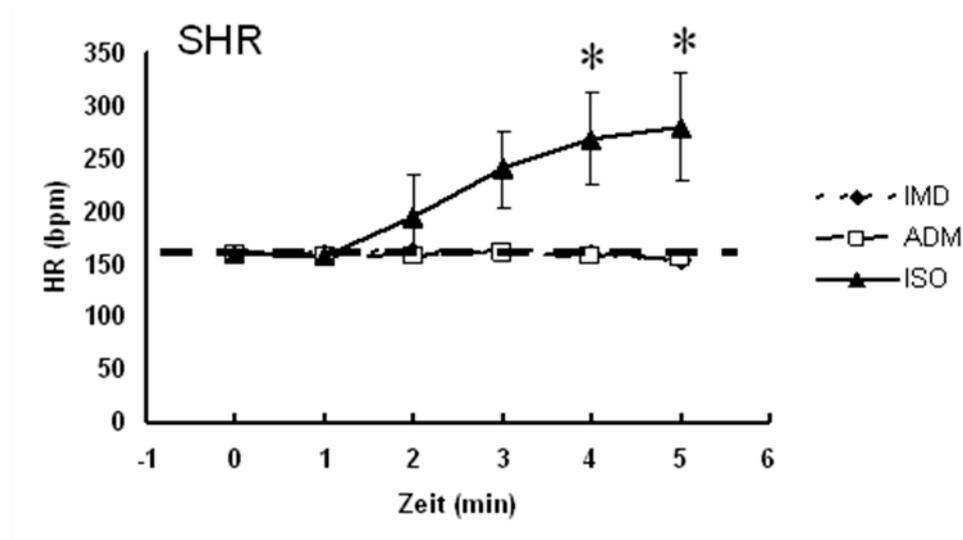


Abb. 4.18.2.1: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf die HR von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Frequenzveränderung normiert auf die Herzfrequenz. * = p < 0,05 vs. t₀, n = 5 Herzen.

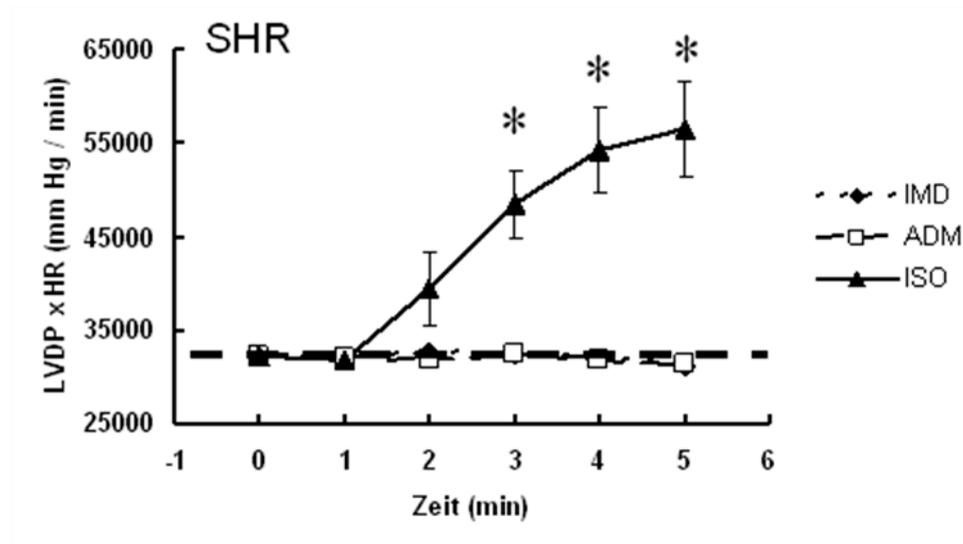


Abb. 4.18.2.2: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenalin auf das LVDP x HR von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt.

* = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.18.3 Einfluss auf den Perfusionsdruck

Anhand der Abbildung 4.18.3 ist zu sehen, dass Isoprenaline und Intermedin einen signifikant negativen Einfluss auf den Perfusionsdruck von SHR hatten. Bei Wistar Ratten wurden diese Effekte von Isoprenaline und Adrenomedullin erzeugt. Bei Gabe von Adrenomedullin ließen sich keine signifikanten Effekte bei der SHR messen.

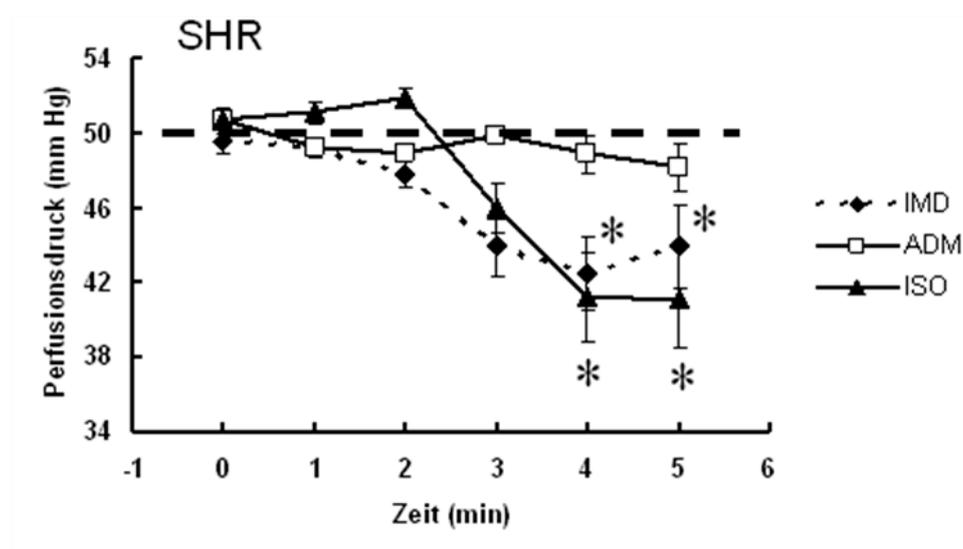


Abb. 4.18.3: Einfluss von Intermedin, Adrenomedullin und Isoprenaline auf den Perfusionsdruck von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen

als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt.

* = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.19 Akutwirkung von Amylin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

In den nachfolgenden Versuchen wurden die Herzmuskelzellen mit Amylin inkubiert, welches mit CGRP und Adrenomedullin zu einer Familie strukturell und biologisch verwandter Polypeptide gehört.

Unter der Stimulation mit 0,5 Hz bis 2,0 Hz zeigten sich jeweils signifikant schlechtere Kontraktionen gegenüber der Kontrolle, bei Konzentrationen von 1 pM - 100 pM Amylin.

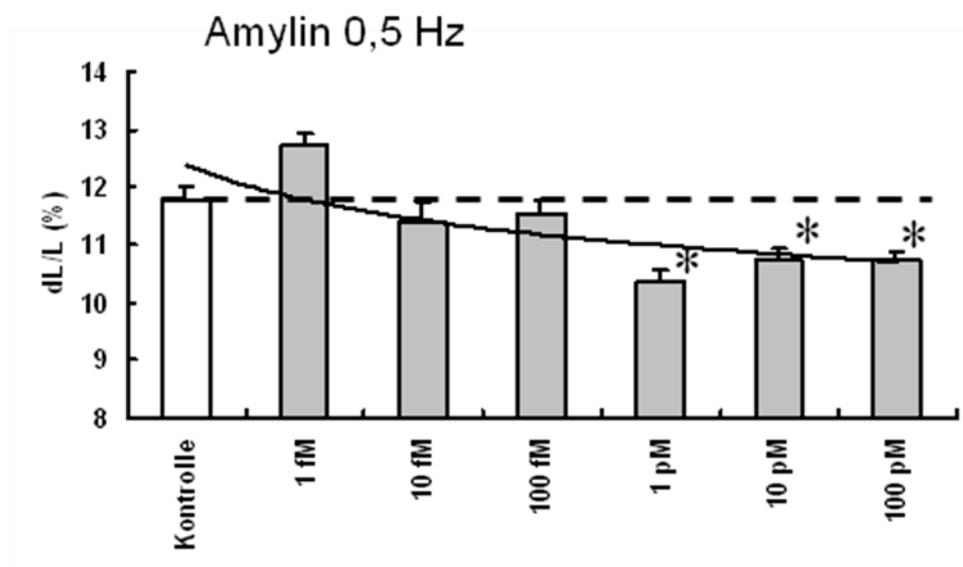


Abb. 4.19.1: Einfluss unterschiedlicher Amylin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

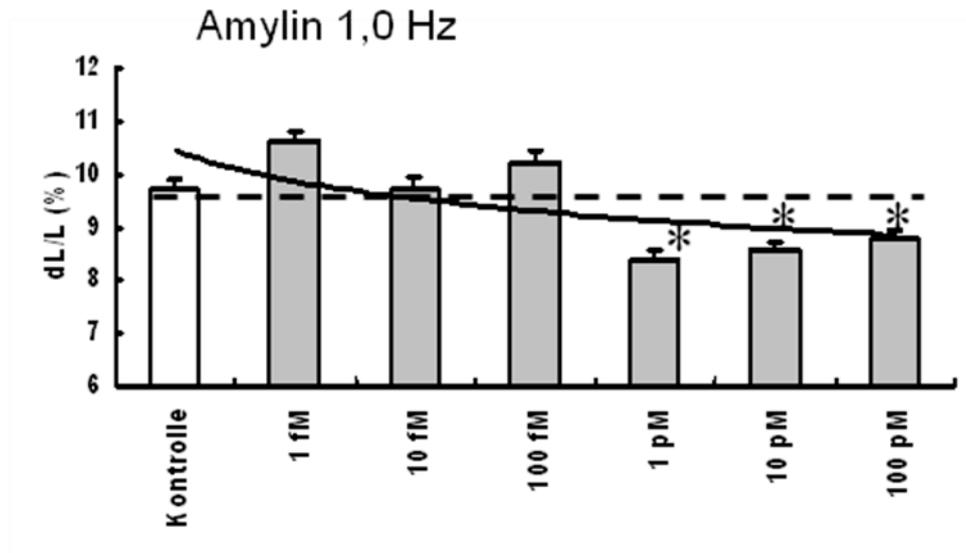


Abb. 4.19.2: Einfluss unterschiedlicher Amylin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

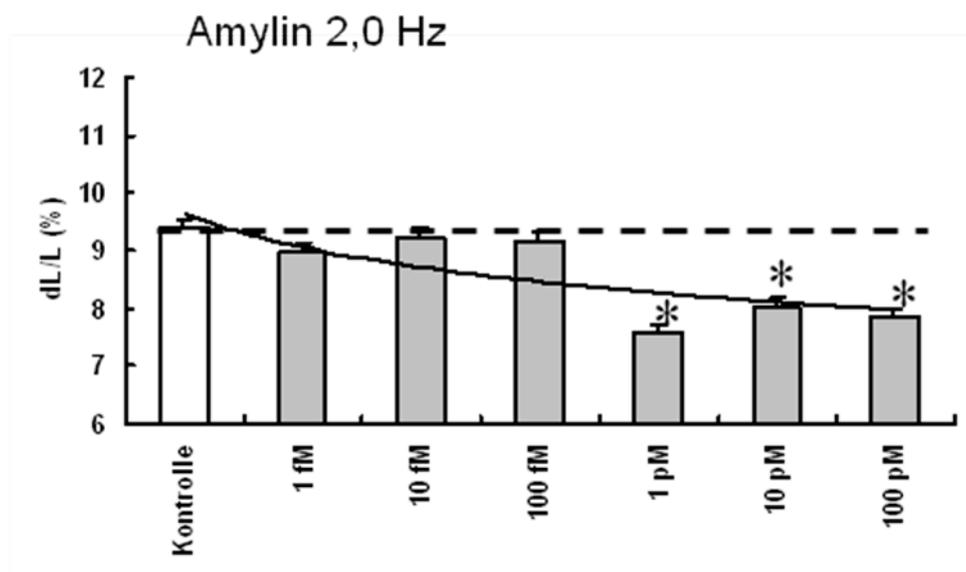


Abb. 4.19.3: Einfluss unterschiedlicher Amylin Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.20 Akutwirkung von Amylin(8-37) auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten

Die nächsten Versuchsreihen wurden mit Amylin(8-37) durchgeführt. Dieses Peptid, welchem die ersten 7 Aminosäuren fehlen, stammt ebenfalls aus der Reihe der CGRP Familie.

4.20.1 Stimulation mit 0,5 Hz und 1,0 Hz

Amylin(8-37) konnte unter der Stimulation mit 0,5 Hz und 1,0 Hz keine signifikanten Änderungen der Kontraktionsverkürzung im Vergleich zur Kontrolle erzielen. Bei 0,5 Hz wurden zwar im Gegensatz zu 1,0 Hz einige positive Effekte aufgezeichnet, doch diese waren nicht erhoben genug um signifikant zu werden (Abb. 4.20.1.1 u. 4.20.1.2).

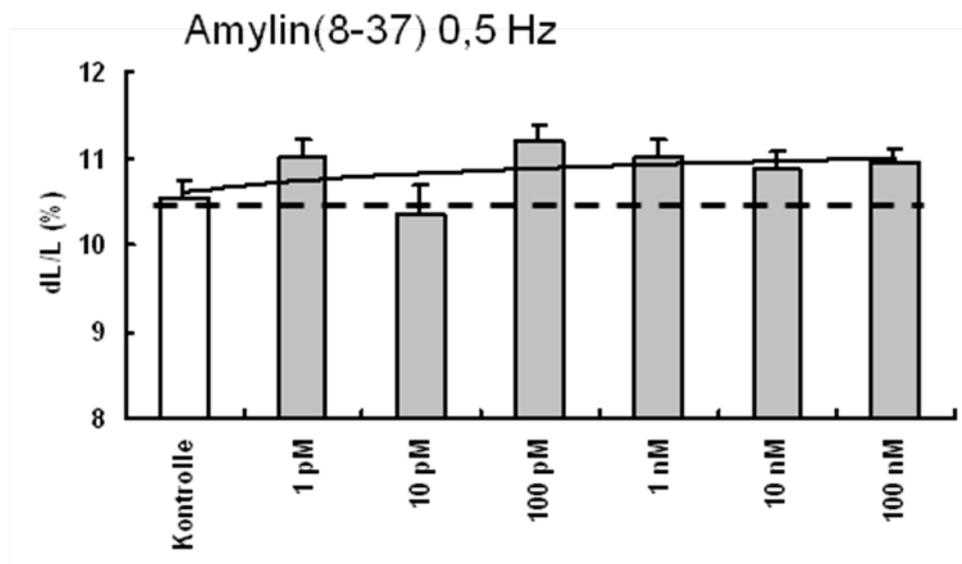


Abb. 4.20.1.1: Einfluss unterschiedlicher Amylin(8-37) Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. n = 36 Zellen.

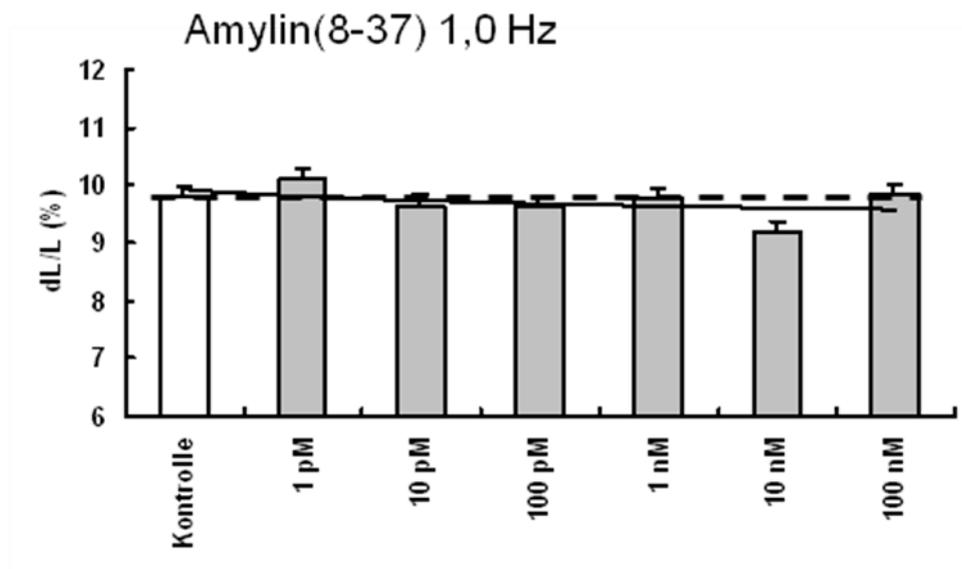


Abb. 4.20.1.2: Einfluss unterschiedlicher Amylin(8-37) Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 1,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. n = 36 Zellen.

4.20.2 Stimulation mit 2,0 Hz

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturschalen zeigten die behandelten Kulturen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Verkürzung. Bei Konzentrationen von 10 pM bis 100 nM Amylin(8-37) wurden signifikante Daten im Vergleich zum Ausgangswert aufgezeichnet.

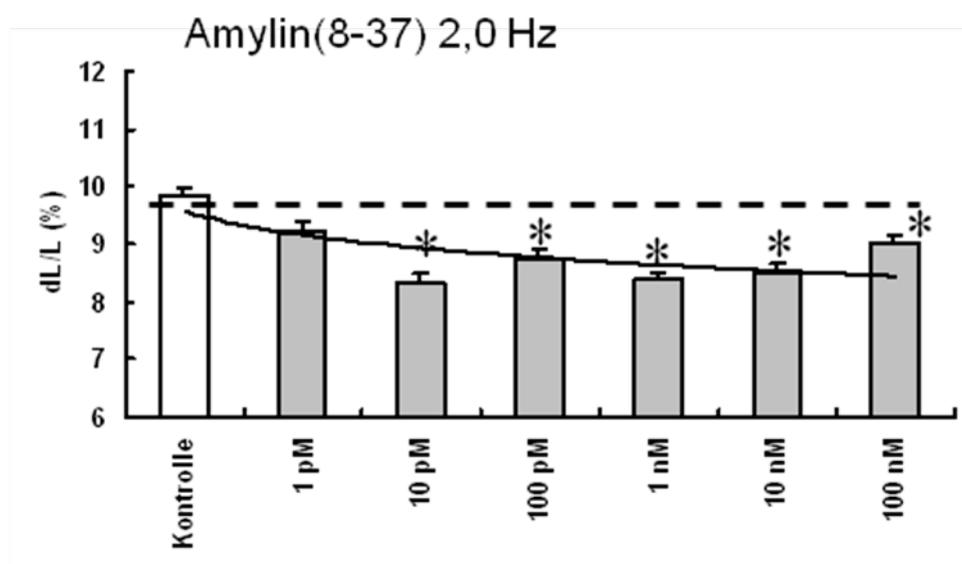


Abb. 4.20.2: Einfluss unterschiedlicher Amylin(8-37) Konzentrationen auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und

Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.21 Akutwirkung von Amylin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten unter dem Einfluss von L-NA

Unter Hemmung der NO-Synthase durch L-NA in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$, ließen sich keine Veränderungen bei Amylin $0,1 \text{ nM}$ im Vergleich zum Kontrollversuch ohne L-NA bei $0,5 \text{ Hz}$, $1,0 \text{ Hz}$ und $2,0 \text{ Hz}$ zeigen. Es blieb bei der signifikant negativen Kontraktionsverkürzung (Abb. 4.21.1).

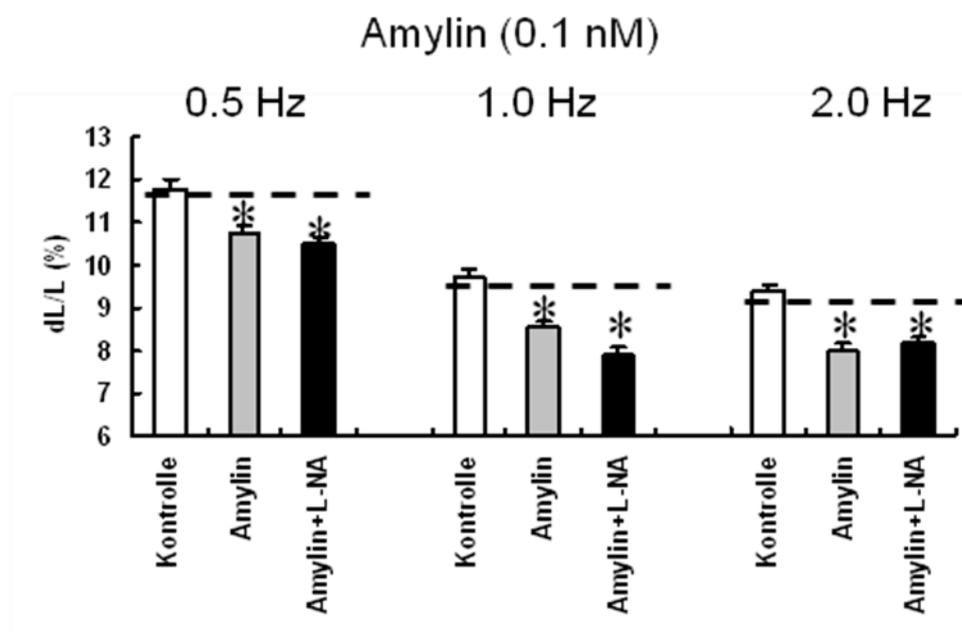


Abb. 4.21.1: Einfluss von Amylin $0,1 \text{ nM}$ in Anwesenheit von L-NA $10 \mu\text{M}$ auf die relative Zellverkürzung bei einer Frequenz von $0,5 - 2,0 \text{ Hz}$. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.22 Die Akutwirkung von Amylin auf Herzmuskelzellen von Wistar Ratten im Langendorff-System

4.22.1 Einfluss auf den linksventrikulären Druckanstieg und das Frequenz-Druck Produkt

Unter Amylin, mit einer Konzentration von 0,1 nM, ließ sich ein Anstieg des linksventrikulären Druckes aufzeichnen. Dieser signifikante Effekt verschwand nach 3 Minuten Perfusion wieder und der LVDP näherte sich wieder dem Ausgangswert (Abb. 4.22.1.1).

Entsprechend des LVDP zeigte sich beim Frequenz-Druck Produkt ebenfalls ein signifikanter Anstieg bei 2 und 3 Minute Perfusion, welcher danach wieder abfiel (Abb. 4.22.1.2).

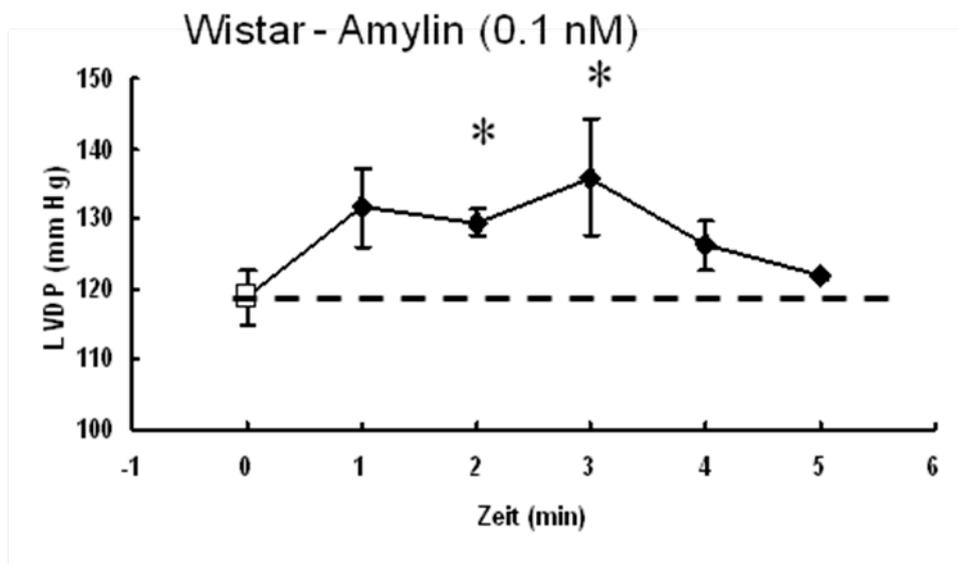


Abb. 4.22.1.1: Einfluss von Amylin 0,1 nM auf den LVDP von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

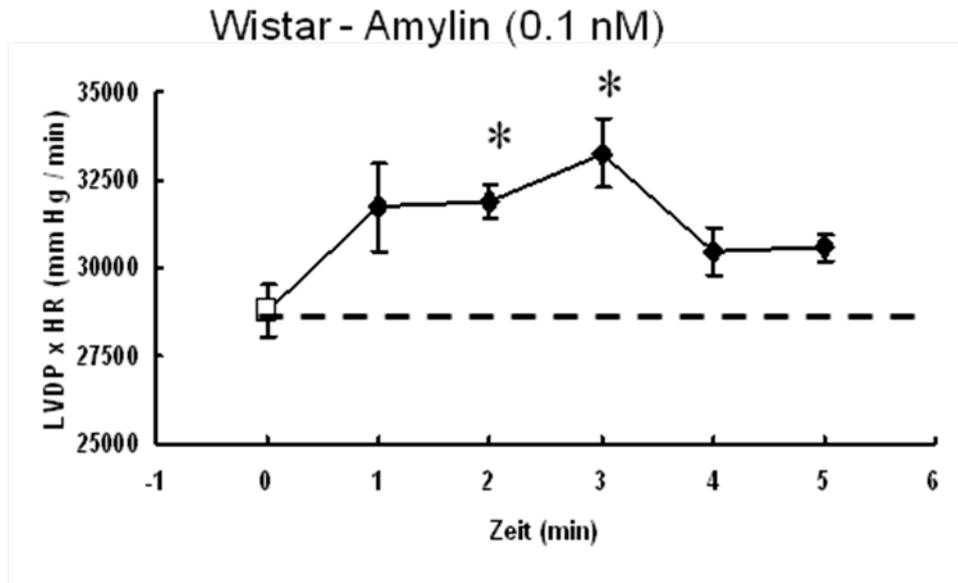


Abb. 4.22.1.2: Einfluss von Amylin 0,1 nM das LVDP x HR von Wistar Ratten.
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale
Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. * = $p < 0,05$ vs. t_0 ,
 $n = 5$ Herzen.

4.22.2 Einfluss auf die Herzfrequenz und den Perfusionsdruck

Unter Amylin ließen sich große Schwankungen der Herzfrequenz unter Zugabe von Amylin 0,1 nM im Langendorff-System messen. Aufgrund der großen Standardabweichung konnte kein signifikanter Effekt erreicht werden, obwohl nach 5 Minuten Perfusion eine deutliche Zunahme der Herzfrequenz zu verzeichnen war (Abb. 4.22.2.1).

Beim messen des Perfusionsdruckes zeigte sich zwar nach 2 Minuten eine leichte Zunahme des Wertes, aber im Ganzen waren die gemessenen Drücke niedriger als der Ausgangswert. Amylin 0,1 nM führte demnach zu keinem signifikanten Effekt auf den Perfusionsdruck von Wistar Ratten (Abb. 4.22.2.2).

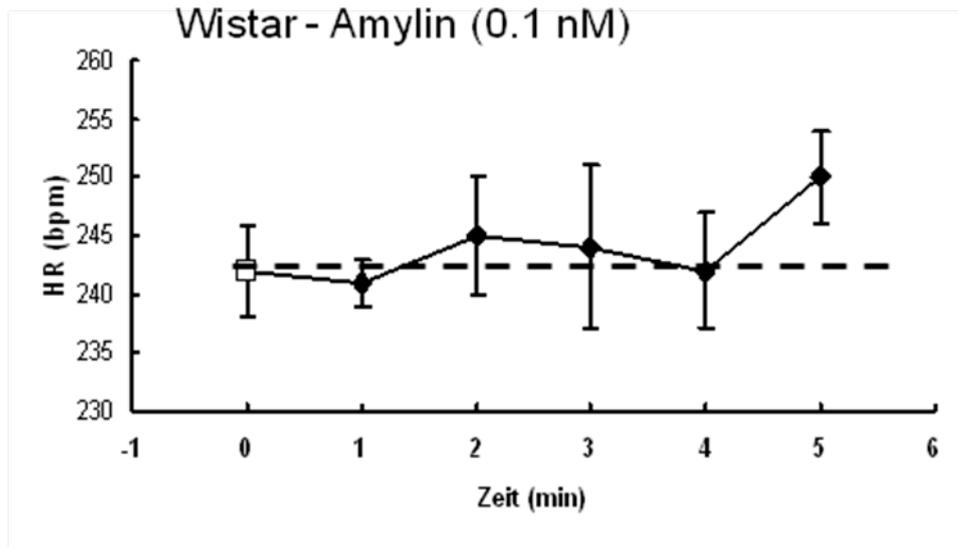


Abb. 4.22.2.1: Einfluss von Amylin 0,1 nM auf die HR von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Frequenzveränderung normiert auf die Herzfrequenz. n = 5 Herzen.

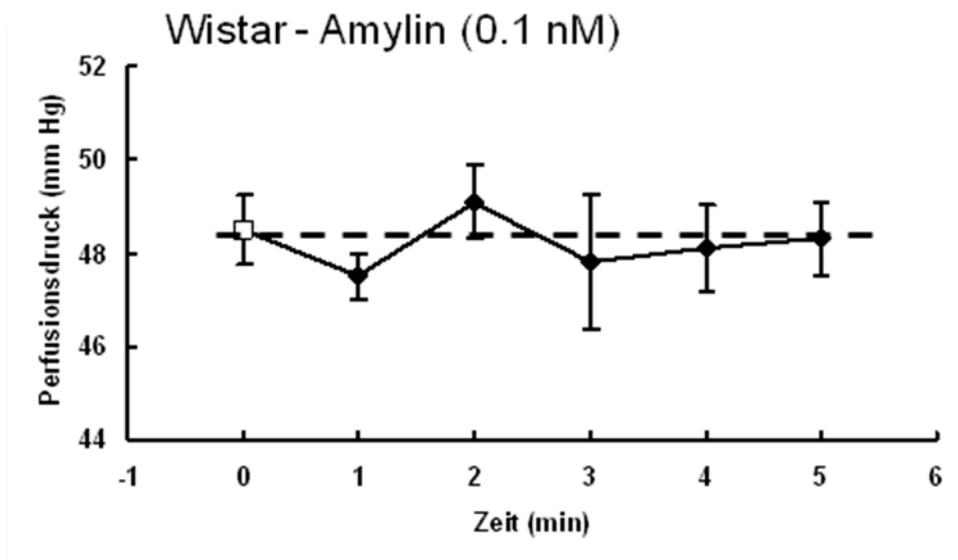


Abb. 4.22.2.2: Einfluss von Amylin 0,1 nM auf den Perfusionsdruck von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. n = 5 Herzen.

4.23 Die Akutwirkung von Amylin und Isoprenalin auf den linksventrikulären Druckanstieg von Wistar Ratten im Langendorff-System unter Blockierung mit Atenolol

4.23.1 Änderung des LVDP bei Amylin und Atenolol

Durch Zugabe des β_1 Rezeptorenblocker Atenolol in der Konzentration von $10 \mu\text{M}$ konnte die Zunahme des linksventrikulären Druckanstieges unter $0,1 \text{ nM}$ Amylin geblockt werden. Nach 5 Minuten Perfusion wurde sogar ein signifikant negativer Wert, im Vergleich zum Ausgang, gemessen.

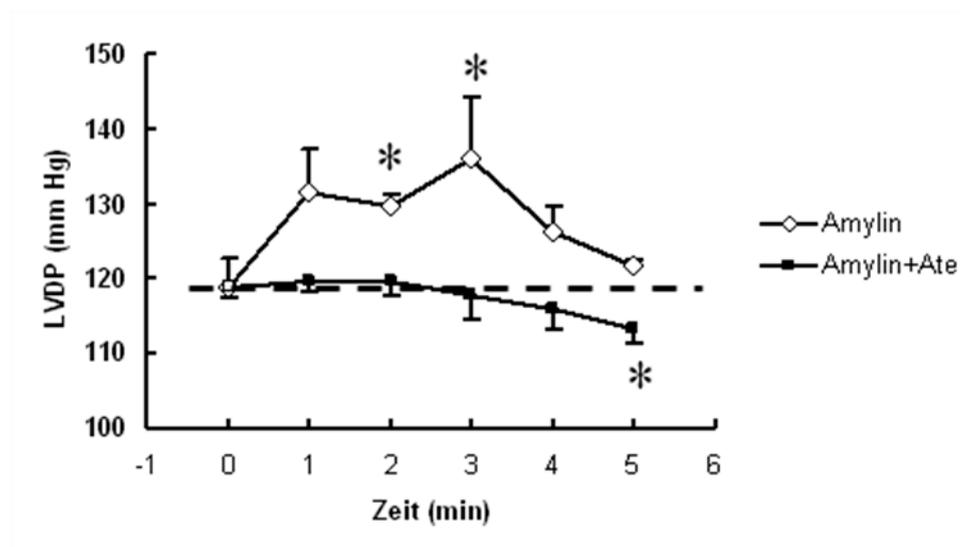


Abb. 4.23.1: Einfluss von Amylin $0,1 \text{ nM}$ und Atenolol auf den LVDP von Wistar Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.23.2 Änderung des LVDP bei Isoprenalin und Atenolol

Zum Vergleich wurde die hemmende Wirkung von Atenolol auf Isoprenalin 10 nM untersucht. Die signifikante Zunahme des LVDP durch Isoprenalin nach 3 Minuten Perfusion, ließ sich durch Zugabe von Atenolol $10 \mu\text{M}$ komplett aufheben.

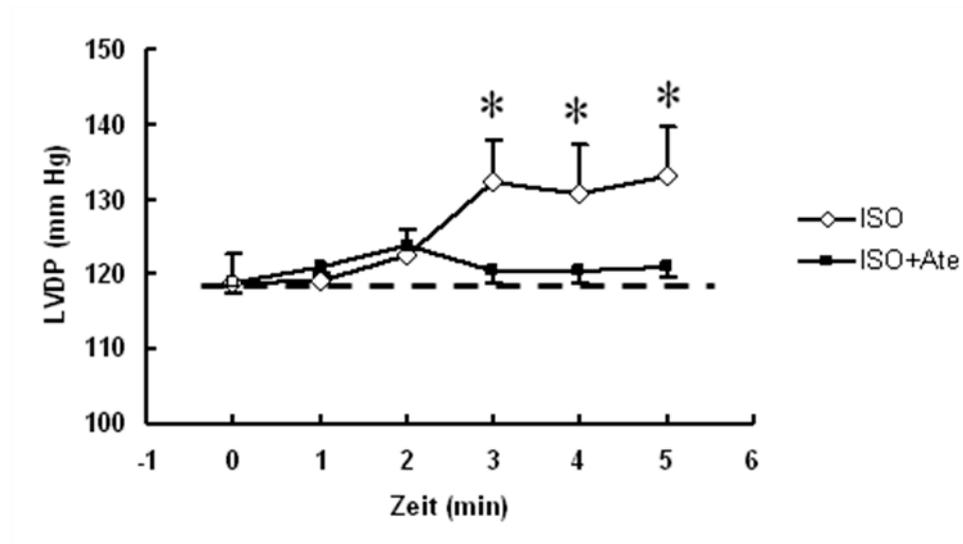


Abb. 4.23.2: Einfluss von Isoprenalin und Atenolol auf den LVDP von Wistar Ratten.
 Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.24 Wirkung von Angiotensin II auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von Wistar Ratten unter Amylin

Bei der Untersuchung des Kontraktionsverhaltens von Wistar Herzmuskelzellen, konnte man in diesem Versuch keine Unterschiede erkennen. Amylin hatte keinen Einfluss auf die Zellverkürzung in Angiotensin II vorinkubierten Zellen, sodass die gleiche relative Zellverkürzung, wie unter Angiotensin II alleine zu messen war.

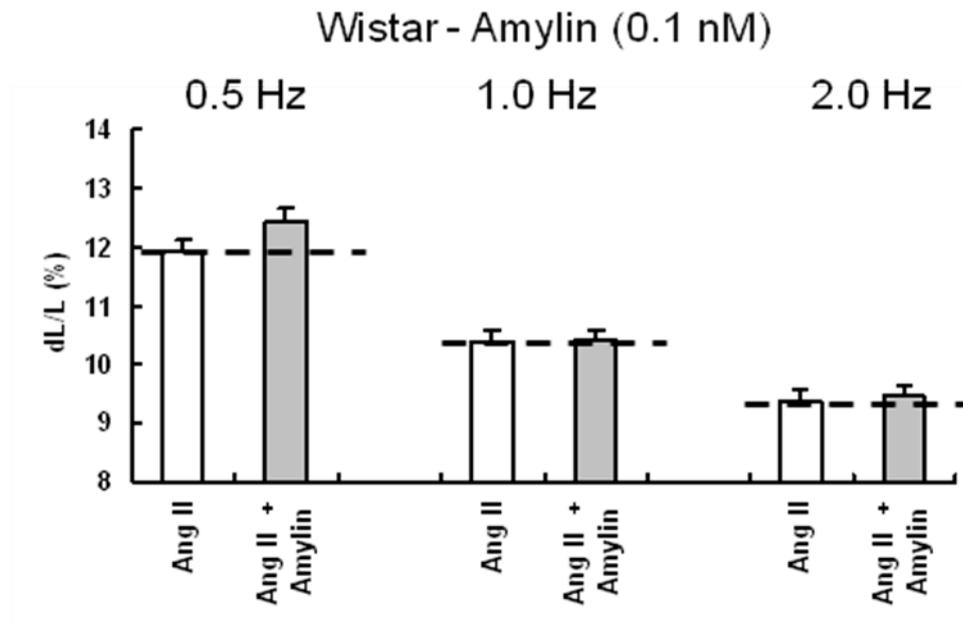


Abb. 4.24.1: Einfluss von Angiotensin II und Amylin auf die relative Zellverkürzung, von Wistar Tieren, bei einer Frequenz von 0,5 – 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. n = 36 Zellen.

4.25 Akutwirkung von Angiotensin II unter Zugabe von Amylin, auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von SHR

Dieser Versuch steht im Vergleich zum Vorherigen (4.24). Anstelle von Wistar wurden SHR genommen. Im Gegensatz zu den Herzmuskelzellen aus normotensiven Ratten steigerte Amylin in niedrigen Frequenzen die Zellverkürzung. Dieser Effekt war nach Inkubation mit Angiotensin II aufgehoben.

Der in Herzmuskelzellen aus normotensiven Herzen beobachtete, negativ kontraktile Effekt von Amylin, war weniger deutlich und durch Angiotensin II nicht signifikant beeinflusst.

Es konnten auch hier keine signifikanten Effekte von Angiotensin II im Zusammenhang mit Amylin auf SHR nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von Amylin nach vorheriger 24h Inkubation mit Angiotensin II, wurden kleinere Kontraktionsverkürzungen gemessen, als mit Angiotensin II alleine.

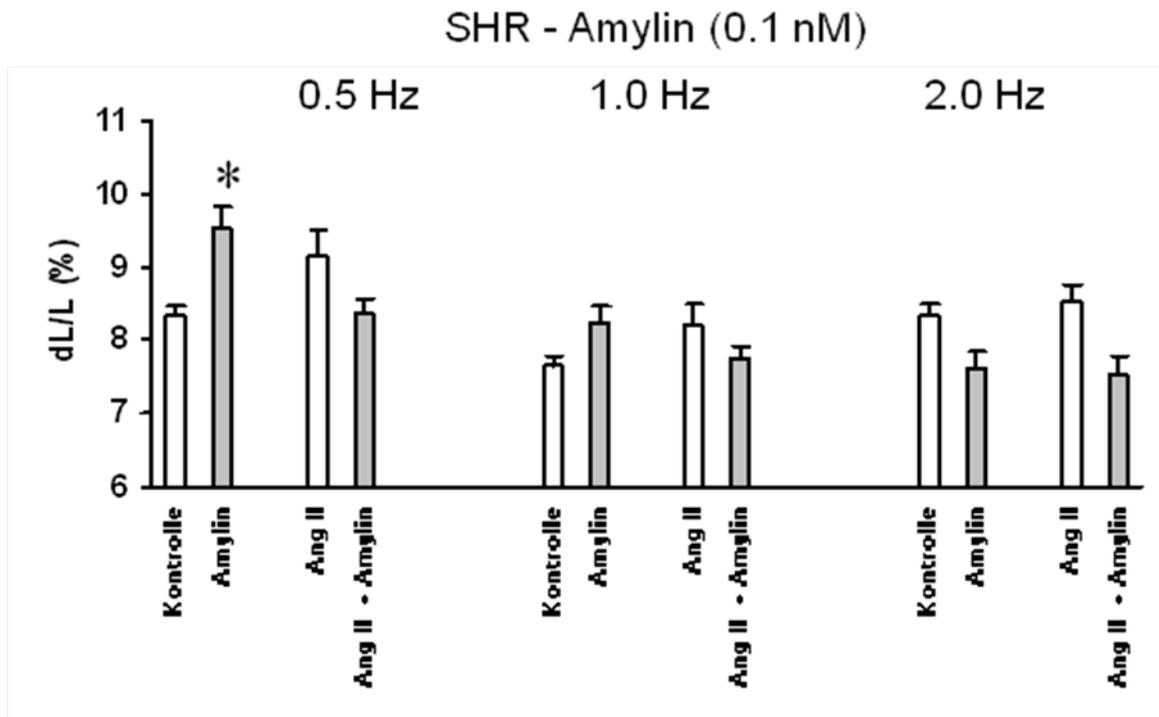


Abb. 4.25.1: Einfluss von Angiotensin II und Amylin auf die relative Zellverkürzung von SHR bei einer Frequenz von 0,5 – 2,0 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Zellverkürzung normiert auf die diastolische Zelllänge. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 36$ Zellen.

4.26 Die Akutwirkung von Amylin auf Kardiomyozyten von SHR im Langendorff-System

4.26.1 Einfluss auf den linksventrikulären Druckanstieg und das Frequenz-Druck Produkt

In diesem Versuch wurden SHR untersucht, welche im Langendorff-System mit Amylin der Konzentration 0,1 nM perfundiert wurden. Der Versuch ist mit dem 4.22 von Wistar Tieren zu vergleichen.

Beim LVDP und Frequenz-Druck Produkt zeigte sich ein signifikant positiver Effekt bei 2 und 3 Minuten Perfusion, welcher danach wieder abfiel (Abb. 4.26.1.1 u. 4.26.1.2). Diese Ergebnisse wurden auch schon bei den Wistar Tieren gemessen (Abb. 4.22.1.1 u. 4.22.1.2).

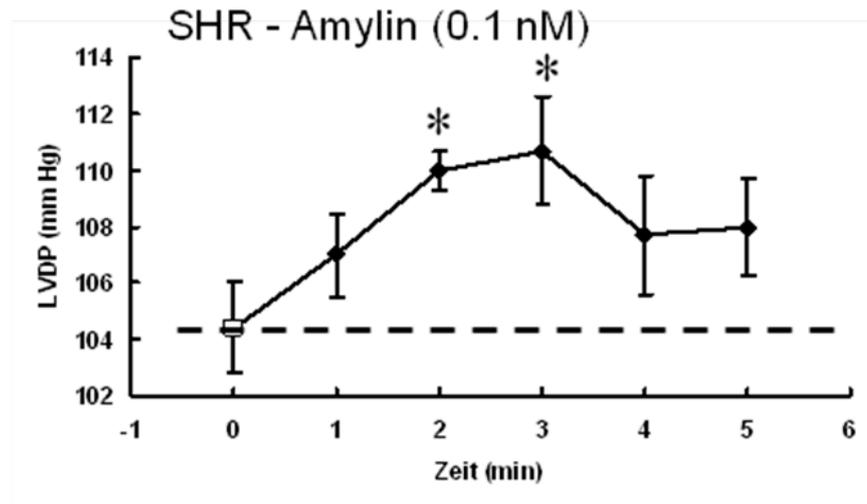


Abb. 4.26.1.1: Einfluss von Amylin 0,1 nM auf den LVDP von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung normiert auf den linksventrikulären Druckanstieg. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

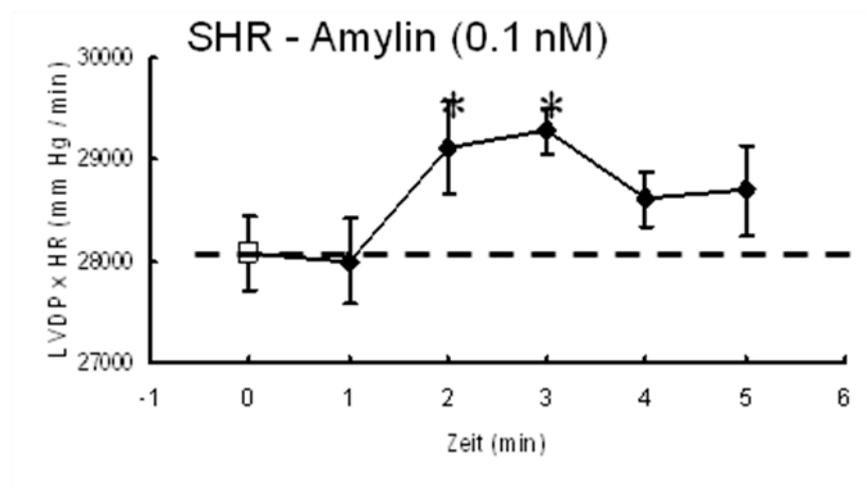


Abb. 4.26.1.2: Einfluss von Amylin 0,1 nM das LVDP x HR von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.26.2 Einfluss auf die Herzfrequenz

Im Vergleich zum Versuch mit den Wistar Tieren, wo es große Standardabweichungen gab, ließen sich diesmal signifikante Effekte aufzeichnen. Bei der Herzfrequenz kam es zu einer deutlichen Zunahme der Werte nach 2 Minuten Perfusion mit Amylin. Diese Steigerung der HF fiel nach einem Spitzenwert nach 3 Minuten wieder ab.

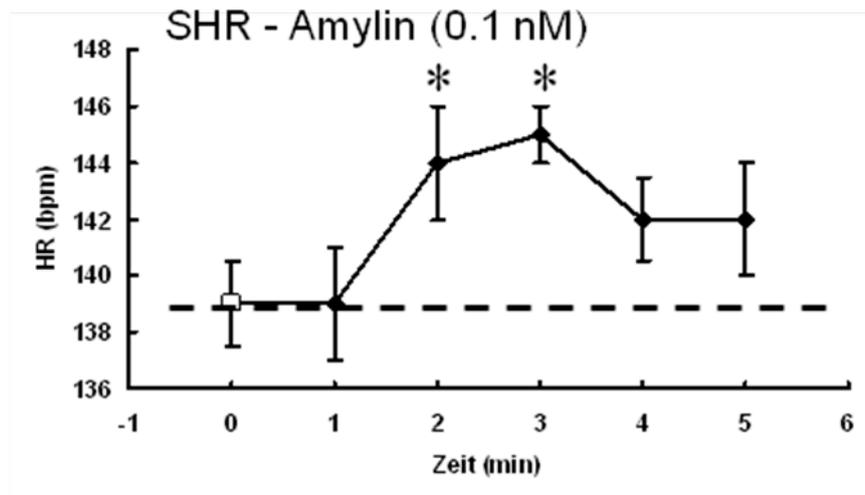


Abb. 4.26.2: Einfluss von Amylin 0,1 nM auf die HR von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Frequenzveränderung normiert auf die Herzfrequenz. * = $p < 0,05$ vs. t_0 , $n = 5$ Herzen.

4.26.3 Einfluss auf den Perfusionsdruck

Bei der Aufzeichnung des Perfusionsdruckes zeigte sich eine Druckerhöhung nach Zugabe von 0,1 nM Amylin. Diese war zwar nicht signifikant gegenüber dem Ausgangswert, wies aber deutlich höhere Werte über die gesamte Messdauer auf.

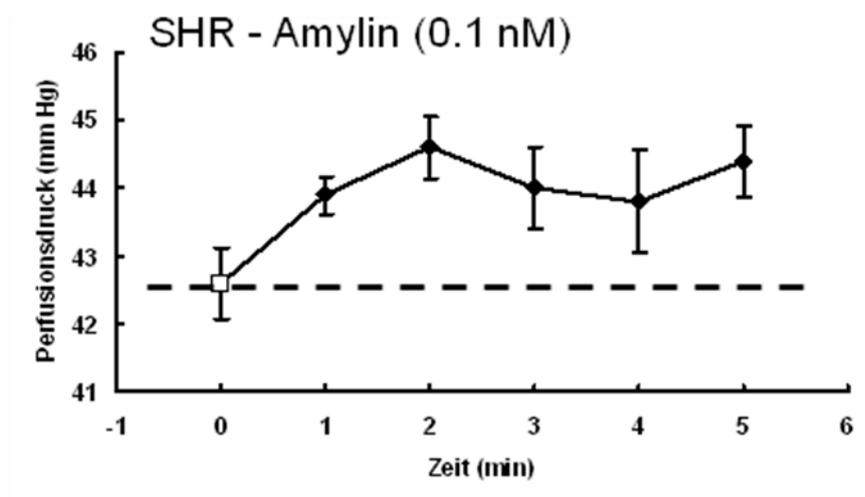


Abb. 4.26.3: Einfluss von Amylin 0,1 nM auf den Perfusionsdruck von SHR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen als prozentuale Druckveränderung/Zeit normiert auf das Frequenz-Druck Produkt. $n = 5$ Herzen.

4.27 Zusammenfassender Vergleich der Untersuchungen an den Peptiden aus der CGRP Familie

In den beiden folgenden Tabellen soll ein zusammenfassender Vergleich der Substanzen aus der CGRP Familie gegeben werden. Es sind jeweils die positiven und negativen Effekte einzeln dargestellt.

Positive Kontraktile Effekte bei 0,5 Hz

Agonist	Konzentrationsbereich	EC ₅₀	max. Antwort	Konzentration max. Antwort
CGRP α	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	2,1 ± 0,5 × 10 ⁻⁸ M	25,4 ± 3,3 %	10 ⁻⁷ M
CGRP β	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	1,1 ± 2,6 × 10 ⁻¹⁰ M	37,4 ± 2,4 %	10 ⁻⁸ M
CGRP α(8-37)	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	9,6 ± 0,3 × 10 ⁻¹⁰ M	30,1 ± 2,2 %	10 ⁻⁸ M
Intermedin	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻⁷ M	2,7 ± 0,8 × 10 ⁻¹⁴ M	44,3 ± 2,9 %	10 ⁻⁹ M
Adrenomedullin	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻⁷ M	1,8 ± 0,1 × 10 ⁻¹⁵ M	21,0 ± 1,5 %	10 ⁻¹⁰ M
Amylin	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	n.d.	n.d.	n.d.
Amylin (8-37)	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	n.d.	n.d.	n.d.

Negative Kontraktile Effekte bei 2,0 Hz

Agonist	Konzentrationsbereich	EC ₅₀	max. Antwort	Konzentration max. Antwort
CGRP α	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	2,6 ± 0,9 × 10 ⁻¹³ M	-32,4 ± 3,3 %	10 ⁻¹⁰ M
CGRP β	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	1,3 ± 3,5 × 10 ⁻¹³ M	-31,0 ± 2,8 %	10 ⁻¹¹ M
CGRP α(8-37)	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	3,5 ± 0,8 × 10 ⁻¹³ M	-36,4 ± 2,2 %	10 ⁻¹⁰ M
Intermedin	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻⁷ M	n.d.	n.d.	n.d.
Adrenomedullin	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻⁷ M	1,8 ± 0,2 × 10 ⁻⁹ M	-9,1 ± 2,1 %	10 ⁻⁷ M
Amylin	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻¹⁰ M	1,4 ± 0,2 × 10 ⁻¹² M	-16,5 ± 1,0 %	10 ⁻¹⁰ M
Amylin (8-37)	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷ M	8,7 ± 1,4 × 10 ⁻¹¹ M	-14,8 ± 1,0 %	10 ⁻⁹ M

Abb. 4.27.1: Einfluss der CGRP Familie auf das kontraktile Verhalten von adulten Ratten Kardiomyozyten.

5. Diskussion

5.1 Hauptbefunde

Das Ziel der Arbeit war die Auswirkungen der Calcitonin gene-related Peptide Familie auf das Kontraktionsverhalten des Herzens zu ermitteln. Hierzu wurden einerseits Akuteffekte mittels Messung der Kardiomyozytenkontraktionen an isolierten Zellen durchgeführt und andererseits die Dynamik am schlagenden Herzen mit einem Langendorff – System gemessen. Die gleichen Untersuchungen wurden mit spontan hypertensiven Ratten (SHR) unternommen, welche zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Herzmuskelzellen aus hypertrophen Herzen dienen sollten. Diese Ratten weisen in vivo eine druckinduzierte Myokardhypertrophie auf, welche wahrscheinlich auf einer Aktivierung des Sympathikus als auch des Renin-Angiotensin-Systems beruht (Bagby et al., 1979).

Die Signaltransduktionswege wurden anhand eines Zellkulturmodells isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten untersucht, damit die komplexen systemischen und hämodynamischen Interaktionen umgangen werden konnten. Diese isolierten Kardiomyozyten waren von einer definierten Konzentration von Wirkstoffen umgeben und mechanisch inaktiv. Mittels dieser Anordnung konnte der Einfluss der CGRP Familie, unabhängig von anderen humoralen und mechanischen Einflüssen, auf die untersuchten Enzymkaskaden durchgeführt werden.

Entscheidende neue Erkenntnisse dieser Studie sind:

1. Hohe Konzentrationen von CGRP führen zu einem positiv kontraktilem Effekt.
2. Niedrige Konzentrationen von CGRP verursachen gegenteilig einen negativ kontraktilem Effekt.
3. Hemmung von Proteinkinase A durch H89 dämpft die positive kontraktile Wirkung und Hemmung der NO Synthase Aktivität durch L - NA wandelt die negative kontraktile Wirkung in einem positiven kontraktilem Effekt um.

4. CGRP verursacht in allen Konzentrationen einen positiven kontraktile Effekt in Herzmuskelzellen von SHR.
5. Eine vorherige Exposition der Kardiomyozyten mit Angiotensin II führt zu einem völligen Verlust der Reaktionsfähigkeit zu CGRP in den Herzmuskelzellen von normotonen und hypertonen Ratten.
6. Basierend auf den Daten des Rate-Pressure-Produktes können die CGRP Ergebnisse von den isolierten Kardiomyozyten auf das komplette Herzmodell übertragen werden.

5.2 Die Rolle von CGRP auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten

Die CGRP Agonisten und Antagonisten sind Substanzen, die derzeit noch nicht in der Therapie oder Prophylaxe von Erkrankungen eingesetzt werden. Man spricht den Agonisten einen vasorelaxierenden Effekt und Einfluss auf die Inotropie am Herzen zu (Katori et al., 2004). Da in der Literatur die Wirkungen unterschiedlich beschrieben wurden, sollten in dieser Arbeit die Akuteffekte näher erforscht werden. Es stellte sich heraus, dass CGRP- α und CGRP- β , je nach Konzentration, unterschiedliche Effekte auf die Kardiomyozyten hatten. Aufgrund der Tatsache, dass die Versuche mit der Substanz CGRP- α im Vergleich zu CGRP- β ähnliche Ergebnisse lieferte, welche jedoch bei CGRP- α signifikanter und homogener waren, wurden die Versuche zum Mechanismus auf CGRP- α beschränkt.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass CGRP- α , in Abhängigkeit der Konzentration, Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit von Herzmuskelzellen von Ratten nimmt. Stimulierte man die Kardiomyozyten der Wistar Ratten mit 0,5 Hz – 1,0 Hz, nach vorheriger Inkubation mit CGRP- α 10nM, so konnte eine signifikant stärkere Zellverkürzung gemessen werden. Diese Aufzeichnungen entsprechen anderen Studien, in denen die positive Wirkung von CGRP auf die Inotropie der Herzen beschrieben wird (Katori et al., 2005). Was in der Arbeit neu festgestellt wurde, ist eine negative Verkürzungs-Konzentration-Beziehung von CGRP- α bei niedrigen Konzentrationen von 0,01nM. Während bei den Wistar Tieren hohe Konzentrationen von CGRP- α zu positiven und niedrige Konzentrationen zu negativen kontraktile Effekten führt, konnten bei den SHR nur positive Wirkungen festgestellt werden.

Die positiven sowie negativen Effekte bei den Wistar Tieren ließen sich durch Zugabe von Angiotensin II, der aktiven Komponente des Renin-Angiotensin-Systems, komplett aufheben. Zum Vergleich wurden die Versuche an spontan hypertensiven Ratten (SHR) durchgeführt. Auch hier konnte festgestellt werden, dass Angiotensin II die Effekte aufhebt. CGRP- α hatte mit hohen und niedrigen Konzentrationen bei 0,5 Hz – 1 Hz Stimulation eine stärkere Kontraktion als die Kontrolle. Inkubierte man nun diese Zellen zusätzlich mit Angiotensin II, so konnte man keinen Unterschied zur Kontrolle feststellen. Bei der für die Herzmuskelzelle der Ratte dem physiologischen Bereich näher liegenden Frequenz von 2 Hz konnte CGRP- α alleine keine Änderung der Zellverkürzung bewirken. Erst nach Zugabe von Angiotensin II wurde eine negative Verkürzungs-Konzentration-Beziehung bei 0,01nM und 10nM CGRP- α festgestellt.

Mit dem Antagonisten CGRP- α (8-37) ließen sich die positiven Effekte aufheben, wodurch bestätigt werden konnte, dass CGRP- α (8-37) eine antagonistische Wirkung zu CGRP- α hat (Verheggen et al., 2005). Im Versuch mit niedrigen Konzentrationen CGRP- α und Zugabe von CGRP- α (8-37) 100nM ließen sich die negativen Verkürzungen noch verstärken. Um diese Wirkmechanismen von CGRP- α näher verstehen zu können, wurden in weiteren Versuchen diverse Botenstoffantagonisten eingesetzt um einzelne Signaltransduktionswege auszuschalten. Es wurden hierbei die Stoffe H89, L-NA und Indomethacin eingesetzt.

Bei Verwendung des Proteinkinase A Inhibitors H89 ließen sich die positiven kontraktile Effekte von 100nM CGRP- α aufheben. Aufgrund der Tatsache, dass der CGRP 1 Rezeptor eine hohe Affinität zu CGRP hat und es in gemeinsamer Anwesenheit mit RAMP 1 zu einem erhöhten cAMP-Spiegel kommt (Cueille et al., 2002), könnten die Effekte über diesen Signaltransduktionsweg laufen, da sie durch H89 aufgehoben werden können. Blockierte man die NO-Synthase mit L-NA, unter Zugabe von 0,01nM CGRP- α , entwickelten die Kardiomyozyten einen signifikant positiven kontraktile Effekt, welcher bei CGRP- α 0,01nM ohne vorheriger Inkubation mit H89 negativ war. Dieses Ergebnis passt zu dem positiv kontraktile Effekt von CGRP- α in den SHR Herzen, welcher möglicherweise in Verbindung mit dem zuvor beobachteten Verlust von eNOS Expression und Aktivität in solchen Herzmuskelzellen steht.

5.3 Adrenomedullin und seine Wirkung auf adulte Kardiomyozyten

In der Literatur sind die verschiedensten Effekte von Adrenomedullin beschrieben. Perret et al. führten 1993 erste Untersuchungen von Adrenomedullin am isolierten Herzen der Ratte durch. Sie stellten dabei eine signifikante Abnahme des systolischen Spitzendrucks fest und schlossen dabei auf eine negativ inotrope Wirkung von Adrenomedullin. Ein negativer inotroper Effekt wurde ebenfalls von Ikenouchi et al. 2007 festgestellt. Sie konnten eine Abnahme der Zellverkürzung, durch eine Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} , von isolierten Kardiomyozyten unter Zugabe von Adrenomedullin messen. Diese Wirkung erklärte man über eine NO induzierte Zunahme der intrazellulären cGMP Konzentration. In einer weiteren Arbeit am isoliert perfundierten Herzen im Langendorff – System, wurde durch die Applikation von Adrenomedullin ein Abfall des Perfusionsdruckes gemessen. Während dieses vasodilatativen Effektes wurde weiterhin eine Abnahme der kontraktile Parameter aufgezeichnet (Dijkman et al., 1995). In unseren Versuchen im Langendorff – System konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Wir benutzten Wistar Ratten und perfundierten die Herzen unter Zugabe von Adrenomedullin. Nach ca. 4 Minuten Zirkulationszeit konnte als einziger Effekt die signifikante Abnahme des Perfusionsdruckes aufgezeichnet werden. Es ließ sich also die von Dijkman et al. beschriebene Wirkung auf den Perfusionsdruck bestätigen. Im Gegensatz dazu konnten keine sonstigen Änderungen, wie die HF oder der LVDP, gemessen werden. Zum Vergleich führten wir den Versuch mit spontan hypertensiven Ratten durch. Hierbei konnte keine signifikante Wirkung von Adrenomedullin gezeigt werden. Wenn man davon ausgeht bzw. vermutet, dass Adrenomedullin seinen im Langendorff – System gemessen Effekt auf Wistar Tiere über eine NO Produktion vermittelt (Shimekake et al., 1995), könnte man die fehlende Wirkung bei den SHR mit dem beschriebenen Verlust von eNOS Expression in deren Zellen erklären.

Ein im Vergleich zur Kontrolle konzentrationsabhängiger Anstieg der maximalen Kraftentwicklung, konnte von Ihara et al. 2000 an isolierten Papillarmuskelpräparaten von Ratten festgestellt werden. Diese Wirkung war durch CGRP- $\alpha(8-37)$ inhibierbar und ging mit einer Erhöhung der zytosolischen cAMP-Konzentration einher. Man entschloss sich daher diesen positiv inotropen Effekt von Adrenomedullin als cAMP-vermittelt zu bezeichnen. Auch Szokodi et al. beschrieben 1997 eine positiv inotrope Wirkung, welche jedoch im Gegensatz zu Ihara et al. über einen cAMP unabhängigen Mechanismus vermittelt erschien. Bei den Versuchen von Mitra et al. 2004, konnten zunächst positiv und nach längerer Inkubationsdauer von über einer Stunde negativ inotrope Effekte festgestellt werden. Wie man anhand der verschiedenen Ergebnisse der zuvor beschriebenen Arbeiten sehen kann, sind

der Wirkmechanismus und die Wirkung von Adrenomedullin auf Kardiomyozyten bisher nicht eindeutig belegt. Im Versuch mit isolierten Kardiomyozyten von Wistar Ratten stellten wir in unserer Arbeit fest, dass es frequenzabhängige Verkürzungseffekte gibt. Während die Zellen eine signifikant bessere Kontraktion unter 0,5 Hz Stimulation und Zugabe von Adrenomedullin im Bereich von 1 pM bis 100 nM zeigten, konnte bei 1,0 Hz Stimulation keine Veränderung zur Kontrolle festgestellt werden. Es ließ sich auch ein negativ kontraktiler Effekt aufzeichnen, wenn man die Kardiomyozyten mit 2,0 Hz stimulierte. Zum Vergleich führten wir den Versuchsablauf mit SHR durch und beobachteten dabei, dass Adrenomedullin auch hier die gleichen frequenzabhängigen Verkürzungseffekte aufzeigen konnte. Weiterhin untersuchten wir die Akutwirkung von Adrenomedullin unter vorheriger Inkubation mit Angiotensin II. In der Arbeit von Mishima et al., 2003 wurden die Kardiomyozyten über 24 Stunden mit Angiotensin II inkubiert und danach die Genexpression der Adrenomedullin Rezeptor Komponenten von Calcitoninreceptor-like receptor und Receptor activity modifying protein angeschaut. Man stellte fest, dass Angiotensin II die Genexpression der Adrenomedullin Rezeptor Komponenten über AT1 Rezeptor moduliert, was man über eine Änderung der Adrenomedullin-Aktionen durch Angiotensin II in den kultivierten Ratten Kardiomyozyten begründete. In unseren Versuchen konnten wir einen Effekt von Angiotensin II bei Wistar Ratten unter der Gabe von Adrenomedullin feststellen. Die frequenzabhängigen Verkürzungseffekte, ob positiv oder negativ unter Adrenomedullin alleine, konnten durch die Zugabe von Angiotensin II in jeweils signifikant positive Kontraktionsverkürzungen im Vergleich zur Kontrolle umgewandelt werden. Es mussten jedoch Einschränkungen im Bezug auf Angiotensin II Inhibitoren und ihren kardioprotektiven Effekt gemacht werden, da es bei dem gleichen Versuch mit spontan hypertensiven Ratten zu einem signifikant negativen Verkürzungseffekt kam.

5.4 Auswirkungen von Intermedin auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten

Intermedin (IDM), bzw. Adrenomedullin 2 (AM-2) genannt, als viertes Peptid der CGRP Familie wurde 2004 von Roh et al. entdeckt. Man spricht diesem Peptid einen gefäßerweiternden (Roh et al., 2004) Effekt und eine schützende Funktion gegen myokardiale Ischämie und Reperfusionsschäden zu (Chun-Shui et al., 2005). In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Intermedin zu einer signifikanten Zunahme der Zellverkürzung von Kardiomyozyten führt. Die gleiche Wirkung stellten Dong et al. 2006 in ihrer Arbeit fest. Bei

ihnen ließen sich die Effekte von Intermedin durch Blockierung der Proteinkinase C oder Proteinkinase A aufheben. Sie schlugen daher vor, dass Intermedin seine kardialen Wirkungen über einen Proteinkinase A oder C abhängigen Mechanismus entwickelt. In unseren Versuchen inhibierten wir die Proteinkinase A mittels H89 in der gleichen Konzentration von 1 μ M. Wie in Abbildung 4.13.1 - 4.13.3 zu sehen, konnten diese Ergebnisse von Dong et al. 2006 nicht bestätigt werden, da die positiven Verkürzungseffekte von Intermedin unter H89 bestehen blieben. Intermedin müsste demnach über einen anderen Signaltransduktionsweg als Proteinkinase A seine Wirkung auf die Kardiomyozyten entfalten. Um den beschriebenen kardioprotektiven Effekt näher zu untersuchen, perfundierten wir die Herzen mittels eines Langendorff-Systems. Am schlagenden Herzen verglichen wir die Wirkung von Intermedin 1 nM und Isoprenalin 10 nM. Während es unter Zugabe von Isoprenalin zu einem Anstieg der Herzfrequenz und des LVDP kam, konnte Intermedin keinen signifikanten Einfluss auf das perfundierte Wistar Herz nehmen. Nach vier Minuten Perfusion wurde eine leichte Zunahme des Perfusionsdruckes aufgezeichnet, die jedoch nicht signifikant war, während Isoprenalin zu einer deutlichen Abnahme des Perfusionsdruckes führte. Diesen Messwerten zufolge hat Intermedin keinen signifikanten Effekt auf das schlagende Herz von Wistar Ratten. In einem weiteren Versuch wurden anstatt Wistar spontan hypertensive Ratten (SHR) verwendet. Hierbei wurden zunächst ähnliche Werte wie bei den Wistar Ratten in Bezug auf HF und LVDP gemessen. Eine unterschiedliche Wirkung von Intermedin konnte beim Perfusionsdruck aufgezeichnet werden. Während Intermedin beim Versuch mit Wistar Ratten keinen Effekt zeigte, wurde der Perfusionsdruck bei den spontan hypertensiven Ratten signifikant gesenkt.

Desweiteren wurde die Akutwirkung von Intermedin, unter Angiotensin II, auf das Kontraktionsverhalten untersucht. Die positiven Zellverkürzungseffekte konnten im kompletten Stimulationsbereich von 0,5 Hz bis 2,0 Hz durch die Zugabe von Angiotensin II aufgehoben werden. Zum Vergleich wurden die Versuche an spontan hypertensiven Ratten (SHR) durchgeführt, auch hier konnte Angiotensin II die Effekte aufheben. Aufgrund der Tatsache, dass Angiotensin II nicht nur im gesunden Herzen, sondern auch im chronisch druckbelasteten Herzen von SHR, welche zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Herzmuskelzellen aus hypertrophen Herzen dienen, die Wirkung von Intermedin aufhebt, lässt sich ein schützender oder auch therapeutischer Effekt von Angiotensin II Antagonisten vermuten.

5.5 Die kontraktilen Effekte durch Amylin

Amylin oder auch Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) genannt, gehört ebenfalls zu der Familie der Calcitonin gene-related Peptide. In den meisten wissenschaftlichen Arbeiten ist die Wirkung von Amylin auf den Kohlenhydratstoffwechsel untersucht worden, nur wenige untersuchten die Effekte auf Kardiomyozyten. Hasbak et al. beschrieben 2001, dass Amylin wie CGRP- α , CGRP- β und Adrenomedullin, über die Interaktion mit dem CGRP Rezeptor, zu einer Vasodilatation führt. Auch Leuthäuser et al., 2000 schlugen vor, die biologischen Effekte über einen CGRP Rezeptor zu erklären. Sie konnten zeigen, dass sich die vasodilatatorische Wirkung von Amylin durch CGRP- α (8-37) aufheben ließ, jedoch nicht durch Amylin (8-37). In weiteren Arbeiten stellte sich heraus, dass sich die Affinität des CGRP Rezeptors zu Amylin verändern lässt. Diese Aufgabe übernehmen die RAMPs, welche einen modulierenden Charakter auf den Calcitonin Rezeptor haben. Je nach Spleißvariante des Calcitonin Rezeptors und Kombination mit dem jeweiligen RAMP, lassen sich demnach mindestens sechs verschiedene humane Amylin Rezeptoren herstellen (Poyner et al., 2002, Sexton et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Akutwirkung von Amylin auf das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten von Ratten untersucht. Es konnte dabei festgestellt werden, dass unter Amylin die Kontraktion der Kardiomyozyten signifikant schlechter als bei der Kontrolle war. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde unter Hemmung der NO-Synthase durch L-NA der Versuch erneut durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass die vorherige Inkubation mit L-NA keinen Einfluss auf die negative Verkürzungsfraction hatte, kann man davon ausgehen, dass Amylin seine Wirkung über einen anderen Signaltransduktionsweg ausgeübt hat. Mit einem Langendorff – System wurde die Wirkung von Amylin auf das schlagende perfundierte Rattenherz untersucht. Nach einer Perfusionszeit von 3 Minuten konnte ein signifikanter Anstieg des LVDP aufgezeichnet werden. Die anderen gemessenen Parameter, wie Perfusionsdruck und HF, zeigten keinen Unterschied nach der Gabe von Amylin. Um die Ursache der Änderung des LVDP näher zu untersuchen, verwendeten wir Atenolol, einen Betarezeptorenblocker. Es lag die Vermutung nahe, dass Amylin den Effekt nicht über einen spezifischen Amylin Rezeptor ausübte, sondern über einen sympathoadrenergen Weg. Diese These konnte im Versuch bestätigt werden, da Atenolol den Anstieg des LVDP durch Amylin ebenso blockte wie er auch unter der Gabe von Isoprenalin zu sehen war. Zum Vergleich wurden im Langendorff – System spontan hypertensive Ratten mit Amylin perfundiert. Auch bei diesen Tieren konnte ein signifikanter Anstieg des LVDP nach ca. 3 Minuten beobachtet werden. Im Unterschied zu den Wistar Tieren reagierten die SHR gleichzeitig mit einem Anstieg der Herzfrequenz. Wie

auch bei den anderen Peptiden der CGRP Familie untersuchten wir die Wirkung unter vorheriger Inkubation mit Angiotensin II. Amylin hatte keinen Einfluss auf die Zellverkürzung in Angiotensin II vorinkubierten Zellen, sodass die gleichen relativen Zellverkürzungen, wie unter Angiotensin II alleine, zu messen waren. Im vergleichenden Versuch zum Vorherigen wurden Anstelle von Wistar SHR Tiere genommen. Im Gegensatz zu den Herzmuskelzellen aus normotensiven Ratten steigerte Amylin in niedrigen Frequenzen die Zellverkürzung. Dieser Effekt war nach Inkubation mit Angiotensin II aufgehoben. Die in Herzmuskelzellen aus normotensiven Herzen beobachtete negative kontraktile Wirkung von Amylin war weniger deutlich und durch Angiotensin II nicht signifikant beeinflusst. Es konnten deshalb auch hier keine Effekte von Angiotensin II im Zusammenhang mit Amylin auf SHR nachgewiesen werden. Amylin übt nach den erhaltenen Messwerten seine Wirkung über einen Rezeptor aus, welcher weder durch L-NA noch Angiotensin II aufgehoben werden kann.

5.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CGRP Familie ihre Wirkungen auf die Kardiomyozyten über verschiedene Rezeptoren und Modulationen dieser Rezeptoren durch RAMPs bewirkt. Es lässt sich abschließend zeigen, dass CGRP einen hoch sensiblen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Kardiomyozyten ausübt. Die Versuche zeigten, dass hohe Konzentrationen von CGRP zu einem positiv kontraktilem Effekt und niedrige Konzentrationen gegenteilig einen negativ kontraktilem Effekt bei Wistar Ratten verursachen. Da es bei allen Konzentrationen einen positiven kontraktilem Effekt in Herzmuskelzellen von spontan hypertensiven Ratten gab, lässt sich schlussfolgern, dass es in diesen Zellen zu einer Modulation oder Verminderung der entsprechenden Rezeptoren kommt. Die Veränderungen stehen möglicherweise in Verbindung mit dem zuvor beobachteten Verlust von eNOS Expression und Aktivität in solchen Herzmuskelzellen. Eine Inkubation von Angiotensin II dämpft vollständig die Reaktion von CGRP. Diese Aussage ist nur eingeschränkt gültig, da es bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) divergente Ergebnisse gab. Lediglich bei CGRP- α kam es zu einem Verlust der Reaktionsfähigkeit in den Herzmuskelzellen von normotonen und hypertonen Ratten, während bei den anderen Peptiden der Familie die Wirkung nicht durch Angiotensin II aufgehoben werden konnte. Dennoch lässt sich eine weitere, noch nicht erwähnte schützende Wirkung von Angiotensin Rezeptor Antagonisten auf das Herz erahnen. Es bleibt nun die Frage offen wie Angiotensin II seine Wirkung auf die Kardiomyozyten

ausübt. Entweder es reagiert direkt mit dem jeweiligen Rezeptor des Peptides der CGRP Familie oder es wirkt über die Receptor activity modifying protein (RAMP), welche eine modulierende Eigenschaft auf die Rezeptoren haben. Wenn man von der RAMP Theorie ausgeht, wäre es interessant zu wissen welche RAMP in den SHR hoch bzw. runter reguliert sind, wodurch man die unterschiedlichen Effekte zwischen Wistar und SHR vielleicht erklären könnte. Vorbereitende Versuche, die zusammen mit Herrn Dr. Pfeil aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof Dr. Kummer durchgeführt wurden, zeigen eine Angiotensin II abhängige Herabregulierung der CGRP - like receptor und von RAMP-2, was die funktionellen Befunde dieser Arbeit bestätigen würde.

6. Zusammenfassung

In der Arbeit wurden zum einen Versuche an isolierten adulten Herzmuskelzellen durchgeführt, die eine detaillierte Analyse der maximalen Zellkontraktion und der Verkürzungsfraction ermöglichten, desweiteren wurde mittels eines Langendorff – Systems die Dynamik am schlagendem Herzen gemessen. Die zu untersuchenden Zellen wurden dazu je nach Protokoll entweder über Nacht (Ang II) oder für 2 Minuten mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Zur Übertragbarkeit der Befunde auf Herzmuskelzellen aus hypertrophierten Herzen wurden Kardiomyozyten aus spontan hypertensiven Ratten isoliert. Diese Ratten weisen eine druckinduzierte Myokardhypertrophie auf, welche wahrscheinlich auf einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, als auch des Renin-Angiotensin-Systems beruht. Die chronische Exposition mit Angiotensin II gilt als Teil der Dekompensation der Herzmuskelfunktion im Verlauf einer druckinduzierten Myokardhypertrophie. Anhand von Versuchen mit Angiotensin-Rezeptoren-Blockern oder Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) an SHR konnte eine lebensverlängernde Wirkung festgestellt werden.

Diese Arbeit erbrachte neue Erkenntnisse über die Wirkung von CGRP. Es wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Kardiomyozyten gemessen, wobei hohe Konzentrationen von CGRP zu einem positiv kontraktilem Effekt und niedrige zu einem negativ kontraktilem Effekt führten. Die anderen Peptide der Familie zeigten abweichende Ergebnisse. Während unter Amylin eine signifikant schlechtere Kontraktion gemessen wurde, führte Intermedin zu einer Zunahme der Zellverkürzung. Beim Inkubieren der Zellen mit Adrenomedullin ließen sich keine einheitlichen Effekte messen. Während sich eine signifikant bessere Kontraktion unter 0,5 Hz Stimulation und Zugabe von Adrenomedullin im Bereich von 1 pM bis 100 nM zeigte, konnte bei 1,0 Hz Stimulation keine Veränderung zur Kontrolle festgestellt werden. Es ließ sich auch ein negativ kontraktilem Effekt aufzeichnen, wenn man die Kardiomyozyten mit 2,0 Hz stimulierte. Bei den Versuchen mit SHR verursachte CGRP in allen Konzentrationen einen positiven kontraktilem Effekt in den Kardiomyozyten. Während bei Intermedin und Adrenomedullin sich nichts im Vergleich zu den Wistar Tieren änderte, wurden bei Amylin die negativen Effekte aufgehoben.

Die Signaltransduktionswege der einzelnen Peptide wurden durch spezifische pharmakologische Hemmung untersucht. Es wurde daher Amylin mit L-NA und Intermedin mit H89 inkubiert, wobei sich keine Änderung der Effekte zeigte. Neue Erkenntnisse zeigten sich bei den Versuchen mit CGRP. Die Hemmung von Proteinkinase A durch H89 dämpfte

die positiv kontraktile Wirkung und die Hemmung der NO Synthase Aktivität durch L - NA wandelte die negativ kontraktile Wirkung in einem positiv kontraktilem Effekt um. Interessante Ergebnisse brachten die Versuche mit Angiotensin II. Inkubierte man die Kardiomyozyten von Wistar und SHR mit Angiotensin II und gab dann Intermedin dazu, so wurden die Effekte von Intermedin aufgehoben. Bei dem gleichen Versuch mit Amylin konnte Angiotensin II keinen Einfluss auf die kontraktilem Effekte nehmen. Die frequenzabhängigen Verkürzungseffekte, ob positiv oder negativ unter Adrenomedullin alleine, konnten durch die Zugabe von Angiotensin II in jeweils signifikant positive Kontraktionsverkürzungen im Vergleich zur Kontrolle umgewandelt werden. Bei dem gleichen Versuch mit spontan hypertensiven Ratten kam es jedoch zu einem signifikant negativen Verkürzungseffekt. Verwendete man als Stimulans das Peptid CGRP, so führte eine vorherige Exposition der Kardiomyozyten mit Angiotensin II zu einem völligen Verlust der Reaktionsfähigkeit zu CGRP in den Herzmuskelzellen von normotonen und hypertonen Ratten. Diese Ergebnisse der Arbeit lassen eine weitere noch nicht erwähnte schützende Wirkung von Angiotensin Rezeptor Antagonisten auf das Herz erahnen. Es bleibt nun die Frage offen wie Angiotensin II seine Wirkung auf die Kardiomyozyten ausübt.

7. Summary

Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-a is expressed in heart ventricles in sensory nerves and cardiomyocytes. It modifies inotropism and induces ischemic preconditioning. This study investigated the effect of CGRP-a on the contractile responsiveness of isolated adult ventricular rat cardiomyocytes and the effect of angiotensin II (Ang II) or chronic hypertension on these effects. Cardiomyocytes were isolated and paced at 0.5 to 2.0 Hz. Cell shortening was recorded via a line camera with a reading frame of 500 Hz. CGRP-a exerted a dual effect on cardiomyocytes with a positive contractile effect at 10 nM and a negative contractile effect at 10 pM. CGRP-a(8-37), a CGRP receptor-1 antagonist, attenuated the positive contractile effect. H89, a PKA antagonist, converted the positive contractile effect into a negative contractile effect. The negative contractile effect was converted again back to a positive contractile effect in the presence of L-nitro arginine. Ang II caused a down-regulation of the receptor mRNA and attenuated both effects. In cardiomyocytes isolated from spontaneously hypertensive rats (SHR) the receptor binding protein RAMP2 was down-regulated on mRNA level and cells responded with a pure positive contractile response. In

Langendorff preparations CGRP-a slightly reduced the rate pressure product in hearts from normotensive rats but it caused an increase in SHR. In conclusion this study shows that CGRP-a exerts dual effects on cardiomyocytes favouring the negative contractile effect at very low concentrations. Ang II attenuates CGRP-responsiveness and down-regulates the corresponding receptor. This effect is compensated in chronic pressure overloaded hearts and converted into a positive inotropism.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Autelitano, D., & Ridings, R. (2001)
Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression.
Peptides 22 , S. 1851–1857
- 2 Bagby, S., McDonald, W., & Mass, R. (1979)
Serial renin-angiotensin studies in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. Transition from normal- to high-renin status during the established phase of spontaneous hypertension.
Hypertension, 1, S. 347-354
- 3 Bourassa, M., Guri, O., & Bangdiwala, S. (1992)
Natural history and patterns of current practice in.
J. Am. Coll. Cardiol. 22 , S. 14A-19A
- 4 Chidsey, C., Harrison, D., & Braunwald, E. (1962)
Augmentation of the plasma norepinephrine response to exercise in patients with congestive heart failure.
N. Engl. J. Med. 267 , S. 650-654
- 5 Christopoulos, G., Perry, K., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N., et al. (1999)
Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product.
Mol. Pharmacol. 56 , S. 235-242
- 6 Chun-Shui, P., Jing-Hui, Y., Da-Yong, C., Jing, Z., Helen, G., Jun, Y., et al. (2005)
Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin.
Peptides 26 , S. 1640-1646
- 7 Cowie, M., Wood, D., Coats, A., Thompson, S., Poole-Wilson, P., & Suresh, V. (1999)
Incidence and aetiology of heart failure. A population based study.
Eur. Heart J. 20 , S. 421-428
- 8 Cueille, C., Pidoux, E., Vernejoul, M., Ventura-Clapier, R., & Garel, J. (2002)
Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure.
Biochem. Biophys. Res. Communi. 294 , S. 340-346
- 9 Dijkman, M., Heslinga, J., Sipkema, P., & Westerhof, N. (1995)
Perfusion-induced changes in cardiac O₂ consumption and contractility are based on different mechanisms.
Am J Physiol 271 , S. H984-H989
- 10 Dong, F., Meghan, M., Taylor, Samson, W., & Ren, J. (2006)

- 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. 3, S. 778-784
- 11 Döring, H., & Dehnert, H. (1985)
Das isolierte perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff.
Bioesstechnick Verlag , S. 1-120
- 12 Dzau, V., Colucci, W., Hollenberg, N., & GH, W. (1981)
Relation of the renin-angiotensinaldosterone system to clinical state in congestive heart failure.
Circulation 63 , S. 645-651
- 13 Edwards, R., Trizna, W., Stack, E., & Aiyar, N. (1996)
Effects of adrenomedullin on cAMP levels along the nephron: comparison with CGRP.
Am. J. Physiol. 271 , S. H895-H899
- 14 Edwarts, B., & Morley, J. (1992)
Amylin.
Life Sciences 51 , S. 1899-1912
- 15 Eguchi, S., Hirata, Y., Kano, H., Sato, K., Watanabe, Y., Watanabe, T., et al. (1994)
Specific receptors for adrenomedullin in rat vascular smooth muscle cells.
FEBS Lett. 340 , S. 226-230
- 16 Foord, S., & Marshall, F. (1999)
RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors.
Trends Pharmacol. Sci. 20 , S. 184-187
- 17 Goebell, H., & Wagner, J. (1992)
Innere Medizin.
de Gruyter, Berlin, New York , S. 38-43
- 18 Hasbak, P., Sams, A., Schifter, S., Longmore, J., & Edvinsson, L. (2001)
CGRP receptors mediating CGRP-, adrenomedullin- and amylin-induced relaxation in porcine coronary arteries. Characterization with 'Compound 1' (WO98/11128), a non-peptide antagonist.
Br. J. Pharmacol. 133 , S. 1405-1413
- 19 Hay, D., Christopoulos, G., Christopoulos, A., & Sexton, P. (2004)
Amylin receptors: molecular composition and pharmacology.
Biochem. Soc. Trans. 32 , S. 865-870
- 20 Hinson, J., Kapas, S., & Smith, D. (2000)
Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide.
Endocr. Rev. 21 , S. 138-167
- 21 Ihara, T., Ikeda, U., Tate, Y., Ishibashi, S., & Shimada, K. (2000)
Positive inotropic effects of adrenomedullin on rat papillary muscle.
Eur. J. Pharmacol. 390 , S. 167-172

- 22 Ikenouchi, H., Kangawa, K., Matsuo, H., & Hirata, Y. (1997)
Negative inotropic effect of adrenomedullin in isolated adult rabbit cardiac ventricular myocytes.
Circulation 95 , S. 2318-2324
- 23 Ishimitsu, T., Kojima, M., Kangawa, K., & Hino, J. (1994)
Genomic structure of the Adrenomedullin Gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 203 , S. 631-639
- 24 Jing-Hui, Y., Yong-Fen, Q., Yue-Xia, J., Chun-Shui, P., Jing, Z., Jun, Y., et al. (2005)
Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 327 , S. 713-719
- 25 Katori, T., Hoover, D., Ardell, J., Helm, R., Belardi, D., Tocchetti, C., et al. (2005)
Calcitonin Gene-Related Peptide In Vivo Positive Inotropy Is Attributable to Regional Sympatho-Stimulation and Is Blunted in Congestive Heart Failure.
Circ. Res. 96 , S. 234-243
- 26 Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H., et al. (1993)
Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 , S. 553-560
- 27 Kojima, M. (1966)
The role of antidiuretic hormone in congestive heart failure.
Jpn. Circ. J. 30 , S. 525-538
- 28 Koller, D. (2004)
Short N-Terminal Regions of the Calcitonin-Like Receptor Define Ligand Specificity.
ETH Zürich
- 29 Leuthauser, K., Gujer, R., Aldecoa, A., McKinney, R., Muff, R., Fischer, J., et al. (2000)
Receptor-activity-modifying protein 1 forms heterodimers with two G-protein-coupled receptors to define ligand recognition.
Biochem. J. 351 , S. 347-351
- 30 Levy, D., Garrison, R., Savage, D., Kannel, W., & Castelli, W. (1990)
Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.
N. Engl. J. Med. 322 , S. 1561-1566
- 31 Lip, G., Gibbs, C., & Beevers, D. (2000)
ABC of heart failure.
Aetiology. Br. Med. J. 320 , S. 104-107
- 32 McLatchie, L. (1998)
RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin receptor-like receptor.
Nature (Lond) 393 , S. 333-339

- 33 Mishima, K., Kato, J., Kuwasako, K., Imamura, T., Kitamura, K., & Eto, T. (2003) Angiotensin II modulates gene expression of adrenomedullin receptor components in rat cardiomyocytes.
Life Sci. , S. 1629-1635
- 34 Mitra, S., Hyvelin, J. M., Shan, Q., Tang, F., & Bourreau, J. P. (2004) Role of cyclooxygenase in ventricular effects of adrenomedullin: is adrenomedullin a doubleedged sword in sepsis?
Am. J. Physiol. 286 , S. H1034-H1042
- 35 Mukherjee, R., Multani, M., Sample, J., & Spinale, F. (2002) Effects of adrenomedullin on human myocyte contractile function and beta-adrenergic response.
J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 4 , S. 235-240
- 36 Mulder, H., Leckstrom, A., Uddman, R., Ekblad, E., Westermark, P., & Sundler, F. (1995) Islet amyloid polypeptide (amylin) is expressed in sensory neurons.
J. Neurosci. 15 , S. 7625-7632
- 37 Nuki, C., Kawasaki, H., Kitamura, K., Takenaga, M., & Kangawa, K. (1993) Vasodilator Effects of Adrenomedullin and Calcitonin gene related peptide receptors in rat mesenteric vascular beds.
Biochem Biophys Res Commun 196 , S. 245-251
- 38 O'Brien, T. W., & Johnsons, K. (1991) Islet amyloid polypeptide and insulin secretion from isolated perfused pancreas of fed, fasted, glucose-treated and dexamethason-treated rats.
Diabetes 40 , S. 1701-1706
- 39 Oliver, K., Wainwright, A., Heavens, R., & others. (1998) Distribution of novel CGRP1 receptor and adrenomedullin receptor mRNAs in the rat central nervous system.
Brain. Res. Mol. Brain. Res. 57 , S. 149-154
- 40 Owji, A., Smith, D., Coppock, H., Morgan, D., Bhogal, R., Ghatei, M., et al. (1995) An abundant and specific binding site for the novel vasodialator adrenomedullin in the rat.
Endocrinology 136 , S. 2127-2134
- 41 Perret, M., Broussard, H., LeGros, T., Burns, A., & Lipton, H. (1993) The effect of adrenomedullin on the isolated heart.
Life Sci. 53 , S. 377-379
- 42 Pieber, T., Roitelman, J., Lee, Y., Luskey, K., & Stein, D. (1994) Direct Plasma radioimmunoassay for rat amylin (1-37): concentrations with acquired and genetic obesity.
Am. J. Physiol. 267 , S. E156-E164
- 43 Piper, H., Probst, I., Schwartz, P., Hutter, J., & Spieckermann, P. (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.

- J. Mol. Cell. Cardiol.* 14 , S. 397-412
- 44 Poyner, D., Sexton, P., Marshall, I., Smith, D., Quirion, R., Born, W., et al. (2002)
The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors.
Pharmacol. Rev. 54 , S. 233-246
- 45 Rickenbacher, P. (2001)
Herzinsuffizienz: Epidemiologie, Pathophysiologie.
Swiss Medical Forum Nr. ½, S. 4-9
- 46 Roh, J., Chang, C., Bhalla, A., Klein, C., & Hsu, S. (2004)
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. 279 , S. 7264–7274
- 47 Sakata, J., Shimokubo, T., Kitamura, K., Nishizono, M., Iehiki, Y., Kangawa, K., et al. (1994)
Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma.
FEBS Lett. 352 , S. 105-108
- 48 Schlier, A., Schreckenber, R., & Schlüter, K.-D. (2007)
Inotropic responsiveness of the rat heart to calcitonin gene-related peptide (CGRP).
European heart Journal 28:(Abstract Supplement): 304, ESC Congress Wien
- 49 Sexton, P., Albiston, A., Morfis, M., & Tilakaratne, N. (2001)
Receptor activity modifying proteins.
Cell Signal. 13 , S. 73-83
- 50 Shimekake, Y., Nagata, K., Ohta, S., Kambayashi, Y., Teraoka, H., Kitamura, K., et al. (1995)
Adrenomedullin stimulates two Signal Transduction Pathways, cAMP Accumulation and Ca²⁺ Mobilization, in bovine aortic Endothelial Cells.
J. Biol. Chem. 270 , S. 4412-4417
- 51 Destatis, Statistisches Bundesamt, D. (2005)
Todesursachen in Deutschland.
destatis Fachserie 12 Reihe 4
- 52 Stewart, D., Cernacek, P., Costello, K., & Rouleau, J. (1992)
Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change.
Circulation 85 , S. 510-517
- 53 Strödter. (2000)
Therapie der Herzinsuffizienz.
UNI.MED Verlag
- 54 Szokodi, I., Kinnunen, P., Tavi, P., Weckström, M., & Ruskoaho, H. (1997)
Evidence for cAMP independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide.

Circulation 97 , S. 1062-1070

- 55 Verheggen, R., Wojtas, K., Webel, M., Hoffmann, S., & Kaufmann, A. (2005)
BIBN4096BS and CGRP8-37 antagonize the relaxant effects of α -CGRP more than
those of β -CGRP in human extracranial arteries.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 371 , S. 383-392
- 56 Yoshimoto, R., Mitsui-Saito, M., Ozaki, H., & Karaki, H. (1998)
Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the
rat aorta and porcine coronary artery.
Br. J. Pharmacol. 123 , S. 1645-1654

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

Postervortrag

Schlier, A., Schreckenberger, R., & Schlüter, K-D. (2007).
Inotropic responsiveness of the rat heart to calcitonin gene-related peptide (CGRP).
European heart Journal 28:(Abstract Supplement): 304
ESC Congress Wien.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Bereitstellung des Themas. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und trug durch seine Geduld und Freundlichkeit viel zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Desweiteren danke ich den Medizinisch-Technischen-Assistenten Frau Daniela Schreiber und Herrn Sergej Kechter für die Präparation der Herzmuskelzellen und die fachliche Unterstützung. Für die technischen Hilfestellungen, vor allem in Bezug auf das Langendorff – System, danke ich dem Technischen-Assistenten Herrn Peter Volk.

Für die Korrektur meiner Promotionsarbeit danke ich Désirée Schlier, Anika Seipp und Daniela Schreiber.

Den anderen Mitarbeitern und vor allem meinen Mitdoktoranden, danke ich für den Spaß und die moralische Unterstützung.

Zum Schluss einen herzlichen Dank an meine Freundin Julia Seipp, die mir den Rücken gestärkt hat und mir nicht böse war über die vielen im Labor verbrachten Stunden.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Alexander Schlier
Wohnort: Steinstr. 7
35415 Pohlheim
Geburtsdatum/-ort: 20. Oktober 1980 in Giessen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1987 – 1991 Grundschole Hausen, Pohlheim
1991 – 1993 Ludwig - Uhland Schule, Gießen
1993 – 2000 Justus-Liebig-Gymnasium, Gießen
-Abitur

Zivildienst

2000 – 2001 Johanniter Unfallhilfe RV Gießen, Gießen

Ausbildung

2001 – 2002 Rettungssanitäter
Johanniter Unfallhilfe RV Gießen, Gießen

Studium

seit April 2002 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
März 2004 Ärztliche Vorprüfung
02/2007 – 06/2007 PJ Chirurgie, Asklepios Klinik Lich GmbH
06/2007 – 10/2007 PJ Anästhesie, Asklepios Klinik Lich GmbH
10/2007 – 01/2008 PJ Innere Medizin, Asklepios Klinik Lich GmbH
08. Mai 2008 Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

seit 06.2008 Assistenzarzt, Asklepios Klinik Lich GmbH
-Abteilung Anästhesie und Perioperative Medizin

Nebentätigkeiten

seit 2000 Beschäftigung im Rettungsdienst bei der
Johanniter Unfallhilfe RV Gießen

Erklärung

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



Alexander Schlier