

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuss)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Hemmung der p38-MAP-Kinase und der Produktion von
Superoxidradikalen erhöht die dehnungs-induzierte myokardiale
Kraftentwicklung**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Thuy-Trang Nguyen

aus
Göttingen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Pieske

II. Berichterstatter / in: Prof. Dr. med. D. M. Katschinski

III. Berichterstatter / in: Priv.-Doz. Dr. med. M. Sigler

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Januar 2012

Abkürzungsverzeichnis

ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	ionisiertes Barium
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bcl	Protein der B-cell-lymphoma-Familie
BDM	2,3-Butan-Dion-Monoxim
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺ , [Ca ²⁺] _i	ionisiertes Kalzium, intrazelluläre Kalzium-Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
ET	Endothelin
et al.	und andere
FAK	fokale Adhäsionskinase
g	Gramm
G	Gauge
GATA	GATA bindender Transkriptionsfaktor
GDP	Guanosin-Diphosphat
G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
H ⁺	ionisierter Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
I.E.	internationale Einheiten

ICER	inducible cAMP early repressor
IP3	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K ⁺	ionisiertes Kalium
l	Liter
Lmax	Länge der maximalen Kraftentwicklung
Lx	x% der Länge von Lmax
M	Mol
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	myocyte-specific enhancer-binding nuclear factor
min	Minute
MKK	MAP-Kinase-Kinase
MKKK	MAPK-Kinase-Kinase
mm	Millimeter
mN	Millinewton
mPTP	mitochondriale Permeabilitätsübergangspore
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
n	Anzahl der Experimente
Na ⁺	ionisiertes Natrium
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NO	Stickstoffmonoxid
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der molaren [H ⁺] einer Lösung
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
ROS	Reactive Oxygen Species
RyR	Ryanodin-Rezeptor
RZ50	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation
s	Sekunde
SAC	dehnungsaktivierte Kanäle

SAPK	stressaktivierte Proteinkinase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SFR	slow force response
Tmax	Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kraft
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
$\Delta\Psi$	Potential der inneren mitochondrialen Membran

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	7
I.1. Determinanten der Myokardfunktion	7
I.2. Dehnung.....	8
I.2.1 Akute dehnungsinduzierte Effekte.....	8
I.2.2. Chronische dehnungsinduzierte Effekte.....	9
I.3. Ziele dieser Arbeit.....	15
II. Material und Methoden	16
II.1. Untersuchtes Gewebe	16
II.2. Lösungen und Substanzen	16
II.2.1. Tyrodelösung	16
II.2.2. Kardioplegie für Transport und Präparation	17
II.2.3. Pharmakologische Substanzen	17
II.3. Präparation der Herzmuskelstreifen.....	18
II.3.1. Materialien	18
II.3.2. Isolation und Präparation des Kaninchenherzens.....	19
II.4. Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen	20
II.4.1. Verwendete Geräte.....	20
II.4.2. Versuchsaufbau	21
II.4.3. Versuchsvorbereitung.....	23
II.5. Messprotokoll	23
II.6. Auswertung	24
II.6.1. Computergestützte Datenerhebung	24
II.6.2. Statistische Auswertung	24
III. Ergebnisse.....	25
III.1. Charakterisierung der durch physiologische und suprphysiologische Dehnung induzierten Effekte.....	25
III.1.1. Dehnungsinduzierte Kraftentwicklung isolierter rechtsventrikulärer Muskelstreifen	25
III.1.2. Kinetik der Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der Dehnung.....	34
III.2. Bedeutung der p38-MAP-Kinase für die dehnungsabhängige Kraftentwicklung.....	36
III.2.1. Dehnungsinduzierte funktionelle Änderungen bei Hemmung der p38-MAPK	36
III.2.2. Dehnungsabhängige Änderungen der Kinetik bei Hemmung der p38-MAPK	40
III.2.3. Das Antioxidans Tiron hemmt den progressiven dehnungsinduzierten Kraftabfall.....	42
IV. Diskussion.....	46
IV.1. Funktionelle Effekte von physiologischer und suprphysiologischer Dehnung.....	46
IV.2. Die Rolle von ROS und der p38-MAPK beim dehnungsinduzierten Kraftabfall	48
IV.2.1. Dehnungsinduzierte Aktivierung der p38-MAPK.....	48
IV.2.2. Funktionelle Effekte von ROS	50
IV.3. Pathophysiologische Relevanz	51
V. Zusammenfassung.....	53
VI. Literaturverzeichnis	55

I. Einleitung

I.1. Determinanten der Myokardfunktion

Kardiomyozyten sind durch Zonulae adhaerentes, Desmosomen und Gap Junctions mechanisch und elektrisch gekoppelt. Das Myokard wird deshalb als funktionelles Synzytium bezeichnet. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur kann die entwickelte Kraft nicht durch Rekrutierung zusätzlicher Einheiten, Tetanie oder Summation erhöht werden. Die myokardiale Kraftentwicklung wird nach zwei Prinzipien reguliert. Es wird die intrazelluläre Kalzium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) oder die Ansprechbarkeit der kontraktilen Proteine auf Kalzium moduliert.

Die Determinanten der Myokardfunktion in vivo sind Frequenz, Vorlast, Nachlast, Inotropie und Lusitropie.

Frequenz

- 1) Ein gegebenes Schlagvolumen wird pro Zeiteinheit häufiger ausgeworfen.
- 2) Zusätzlich existiert in vitro der so genannte Bowditch-Effekt. Dieses Phänomen, das auch als Frequenzinotropie bezeichnet wird, beschreibt die Steigerung der Kraftamplitude durch Erhöhung der Frequenz. Bowditch beschrieb diesen Effekt am Froschherzen. Andere Arbeiten zeigen ein Korrelat der Frequenzinotropie auch am menschlichen Herzen (Hasenfuss et al. 1994; Mulieri et al. 1992; Pieske et al. 1995). Dem Mechanismus der Frequenzinotropie liegt in vitro ein erhöhter Kalziumtransient zu Grunde.

Vorlast

Die Vorlast ist das enddiastolische Volumen des Herzens, ihr entspricht auf zellulärer Ebene die enddiastolische Dehnung der Sarkomere. Mit erhöhter Vordehnung der Sarkomere steigt die während der Kontraktion entwickelte Kraft (Frank-Starling-Straub-Mechanismus); physiologischerweise arbeitet das Herz bereits nahe dem Optimum der Ruhedehnungskurve und kann durch Rekrutierung einer Vorlastreserve das Schlagvolumen zusätzlich steigern.

Nachlast

Die Nachlast ist das Integral der myokardialen Wandspannung über den Zeitraum der Systole. Sie steigt mit erhöhtem Ventrikeldurchmesser, erhöhtem intraventrikulärem Druck und verminderter Wanddicke.

Inotropie

Inotropie beschreibt die entwickelte Kontraktionskraft bei gegebener Vorlast und Frequenz. Sie wird im Wesentlichen über die Bindung von Katecholaminen an die myokardialen Adrenozeptoren, d.h. über die Sympathikusaktivität reguliert. Katecholamine erhöhen die Herzfrequenz, den intrazellulären Kalziumtransienten, die Umsatzgeschwindigkeit der Kreatinkinase und senken die myokardiale Kalziumsensitivität, wodurch eine positive Lusitropie vermittelt wird.

Lusitropie

Lusitropie ist die Fähigkeit des Myokards zu relaxieren. Sie ermöglicht die diastolische Füllung des Ventrikels auch bei erhöhter Herzfrequenz.

I.2. Dehnung

Die enddiastolische Dehnung von Sarkomeren entspricht wie oben erläutert der Vorlast bezogen auf das gesamte Organ. Die Vorlast bzw. Dehnung ist eine wichtige Determinante der myokardialen Funktion. Durch Dehnung werden akute und chronische Effekte induziert. Diese sind je nach Ausmaß und Dauer physiologisch oder pathophysiologisch.

I.2.1 Akute dehnungsinduzierte Effekte

Der Frank-Starling-Straub-Mechanismus beschreibt die Zunahme der Kontraktionskraft nach akuter Dehnung. Er ist bedingt durch die Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Proteine und durch die Änderung der Überlappung von Aktin und Myosin.

Das Herz ist so bei erhöhtem enddiastolischem Volumen, also einer akuten Volumenbelastung, in der Lage, eine höhere Spannung in der nachfolgenden Systole zu

entwickeln. Im Vergleich dazu nimmt das Schlagvolumen bei Druckbelastung zunächst in der ersten Herzaktion ab. Das endsystolisch verbliebene Ventrikelvolumen und das normale Füllvolumen addieren sich. Ähnlich wie bei Volumenbelastung kann nun durch Erhöhung der Kontraktionskraft das gleiche Schlagvolumen ausgetrieben werden.

Nach der Zunahme der Kontraktionskraft durch den Frank-Starling-Straub-Mechanismus kommt es zu einem langsamen zusätzlichen Kraftanstieg, der als 2. inotrope Phase oder auch als „slow force response“ (SFR) bezeichnet wird (Parmley und Chuck 1973). Das Maximum des SFR wird 5-10 min nach akuter Dehnung erreicht. Im Gegensatz zum Frank-Starling-Straub-Mechanismus beruht der SFR nicht auf Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität, sondern auf einer Zunahme des $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten. Durch die dehnungsinduzierte Stimulierung des Na^+/H^+ -Austauschers (NCX) kommt es zu einem transsarkolemmalen Na^+ -Einstrom (Alvarez et al. 1999; Luers et al. 2005; von Lewinski et al. 2004; von Lewinski et al. 2003). Dieser resultiert in einer Erhöhung der Aktivität des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers im „reverse mode“ (Na^+ -Efflux/ Ca^{2+} -Influx) (Alvarez et al. 1999; Luers et al. 2005). Durch diesen Na^+ -abhängigen Ca^{2+} -Einstrom kommt es zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum und somit zur Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten.

Unter pathologischen Bedingungen kann es zu einer supraphysiologischen Dehnung des Myokards kommen, so z.B. in der Randzone eines Myokardinfarktes, des gesamten linken Ventrikels bei akuter Mitralinsuffizienz nach Papillarmuskelruptur oder v.a. bei einer massiven Lungenembolie, da der dünnwandige rechte Ventrikel viel eher als der linke Ventrikel bei einer akuten Druckbelastung dilatiert. Eine akute supraphysiologische Dehnung ist bisher in vitro nicht untersucht worden.

I.2.2. Chronische dehnungsinduzierte Effekte

Im Gegensatz zu einer akuten Belastung stellen initial kompensierte pathologische Stimuli, wie z.B. nach Herzinfarkt, bei Hypertonie oder bei einem Klappenvitium, eine chronische Belastung dar, welche eine Maladaptation („remodeling“) induzieren. Dabei kommt es zu Umbauprozessen mit Reexpression embryonaler Gene und Proteine und zu Veränderungen der Ventrikelmorphologie mit myokardialer Hypertrophie. Nachfolgend

werden die wesentlichen Aspekte der Signaltransduktion erläutert, die eine dehnungsinduzierte kardiale Hypertrophie vermitteln.

Signaltransduktion der dehnungsinduzierten myokardialen Hypertrophie

Dehnung führt über multiple Signalkaskaden zur myokardialen Hypertrophie. Diese Signaltransduktion wird durch Mechanosensoren aktiviert. Diese wandeln einen mechanischen Stimulus in ein biochemisches Signal um. Es handelt sich hierbei vor allem um die Integrine und dehnungsaktivierte Kanäle (SAC).

Integrine sind heterotrimere Oberflächenproteine, die aus α - und β -Ketten bestehen. Meist besteht ein Molekül aus einer α -Kette und verschiedenen β -Ketten. Die Integrine haben eine große extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Region und einen meist kurzen intrazellulären Schwanz. Integrine verbinden so die extrazelluläre Matrix (ECM) mit dem zytoplasmatischen Zytoskelett. Die extrazelluläre Region fungiert als Rezeptor für Proteine der ECM. Bei Aktivierung kommt es zu einer Integrin-Cluster-Bildung und zur Aktivierung von Signalmolekülen wie α -Aktinin und fokalen Adhäsionskinasen (FAK) (Lewis und Schwartz 1995), die wiederum andere Signalmoleküle aktivieren. So kommt es zur Aktivierung von Signalkaskaden wie der Phospholipase C, D, und A2, Proteinkinase C und p21-MKK (Sadoshima und Izumo 1993; Yamazaki et al. 1993). Hypertrophe Effekte durch die Aktivierung der p38-MAPK werden durch die Aktivierung der Integrine über FAK, Kinasen der src-Familie und ras vermittelt (Aikawa et al. 2002).

Neben den Integrinen gehören auch die dehnungsaktivierten Kanäle (SAC) zu den Mechanosensoren. Aktivierung der dehnungsaktivierten Kanäle ist ein wichtiger Mechanismus in der Signaltransduktion vom mechanischen Stress zur Herzhypertrophie. Es gibt verschiedene Typen von SAC. Die Mehrzahl der SAC ist selektiv für monovalente Kationen und permeabel für divalente Kationen (z.B. Ca^{2+} und Ba^{2+}), andere sind nur K^{+} -selektiv (Hu und Sachs 1997).

Die SAC können über verschiedene Mechanismen Hypertrophie induzieren. Über eine Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt es über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinasen zu einer Änderung der Genexpression. Durch Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann es auch zu einer Änderung der Expression bestimmter Gene

durch Beeinflussung der Initiation der Transkription, mRNA-Stabilität und Translation kommen (Rosen et al. 1995).

Dehnung führt zudem über eine autokrine/parakrine Ausschüttung von Angiotensin II oder Endothelin 1 (ET-1) (Sadoshima und Izumo 1993), welche über Rezeptoren/G-Proteine Hypertrophie induzierende Signalkaskaden aktivieren (z.B. über die Aktivierung von p38-MAPK und JNK) (Sugden und Clerk 1998). Die G-Proteine sind an Membranrezeptoren gekoppelt (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) und werden durch diese aktiviert. Zu den G-Proteinen gehören die heterotrimeren G-Proteine und die kleinen G-Proteine (u.a. Ras, Rho, Rac). Das inaktive heterotrimere G-Protein besteht aus Rezeptor, α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit, wobei die α -Untereinheit mit GDP beladen ist. Die G-Proteine werden durch die Guaninnucleotid-releasing Proteine aktiviert. Die Aktivierung löst die Freisetzung von dem an der α -Untereinheit gebundenen GDP und die darauf folgende Bindung von GTP aus. Es erfolgt eine Dissoziation in aktivierten Rezeptor, GTP-G α und G $\beta\gamma$. GTP-G α und G $\beta\gamma$ können nun mit ihren Effektoren interagieren und so die Signaltransduktion fortführen. Die α -Untereinheit interagiert u.a. mit der Adenylatzyklase und der Phospholipase C (PLC). Es kommt zur Bildung von cAMP, DAG und IP₃. Diese aktivieren weitere Botenstoffe. So aktiviert DAG die PKC. Durch PKC kommt es zu Aktivierung von Ras und anderen kleinen G-Proteinen. Ras aktiviert Raf und andere upstream Kinasen, über die es u.a. zur Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen kommt (Löffler und Petrides 2003).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass G-Proteine an der Signaltransduktion von dehungsinduzierter Hypertrophie beteiligt sind. In neonatalen kardialen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Dehnung zu einer Aktivierung von G-Proteinen führt (Gudi et al. 1998). Die Arbeitsgruppe von Akhter konnte eine Verminderung einer druck-induzierten Herzhypertrophie im Mausmodell durch eine Inhibition einer bestimmter G-Protein-Untereinheit (G α_q) erzielen (Akhter et al. 1998).

Zusammenfassend kann Dehnung über verschiedene Mechanismen zu einer Aktivierung von Signalkaskaden führen, die eine myokardiale Hypertrophie zur Folge hat. Im Mittelpunkt dieser Kaskaden stehen die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), insbesondere die Subfamilie der p38-MAPK (Liao et al. 2001; Wang et al. 1998).

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

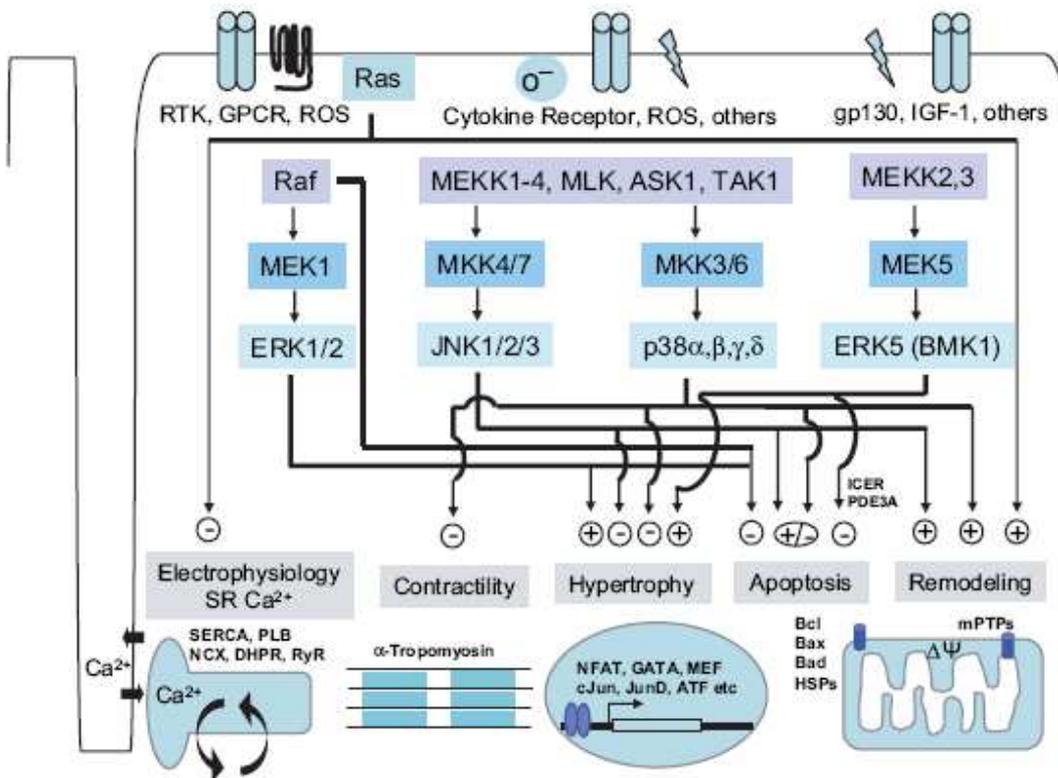


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des 3-Komponenten-Modells der MAPK. Unter anderem führt die Aktivierung von Thyrosinkinase-Rezeptoren (RTK), G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), Zytokin-Rezeptoren (z.B. gp130), Rezeptoren des Insulin-like growth factors 1 (IGF-1) und die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) über MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MEKK) (z.B. Raf, MEKK 1-4, mixed-lineage kinase (MLK), Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1), Transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1)) und über die MAP-Kinase-Kinasen (z.B. MEK1/5, MKK 3/4/6/7) zur Aktivierung von den MAPK (z.B. ERK $\frac{1}{2}$, JNK1-3, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, ERK 5). Dieses hat Einfluss auf die Elektrophysiologie, die Kontraktilität, auf Hypertrophieprozesse sowie auf Apoptose- und Remodeling-Prozesse (Wang 2007).

Die MAPK konvertieren extrazelluläre Stimuli in intrazelluläre Signale. Die MAPK-Signalkaskade wird durch Ischämie (Bogoyevitch et al. 1996), Druckbelastung (Takeishi et al. 2001), Dehnung (Aikawa et al. 2002; Takeishi et al. 2001), Sauerstoffradikale (Clerk et al. 1998a) und TNF α (Bellahcene et al. 2006; Li et al. 2005) aktiviert.

Die MAPK sind Teil eines Drei-Komponenten-Modells, das phylogenetisch von der Hefe bis zum Menschen konserviert wurde. Die MAPK-Kinase-Kinasen (MKKK) sind Serin-Threonin-Kinasen und werden durch Phosphorylierung oder wie oben beschrieben durch Interaktion mit kleinen G-Proteinen der Ras- oder Rho-Familie aktiviert. Diese aktivieren

die nächsten Kinasen im Modell, die MAPK-Kinasen (MKK). Die MKK wiederum aktivieren die MAPK durch Tyrosin/Threonin-Phosphorylierung (Abbildung 1.1).

Die MAPK sind das Endglied dieses 3-Kinase-Modells. Sie phosphorylieren Serin/Threonin-Reste ihrer Substrate. Es handelt sich hier am häufigsten um Transkriptionsfaktoren, aber auch um andere Proteinkinasen, Phospholipasen und Zytoskelett-assoziierte Proteine (Widmann et al. 1999).

Eine Untergruppe der MAPK sind die stressaktivierten Proteinkinasen (SAPK). Zu ihnen zählen die p38-MAPK und die der c-Jun N-terminale Kinasen (JNK). Sie werden durch zellulären Stress aktiviert, d.h. Sauerstoffradikale (Clerk et al. 1998a), Hypoxie (Seko et al. 1997), Dehnung (Aikawa et al. 2002; Takeishi et al. 2001) und pro-inflammatorische Zytokine (Bogoyevitch et al. 1996).

Die JNK werden auf 3 Genen codiert. Es gibt mindestens 10 Isoenzyme der JNK, die durch alternatives Splicing zu Stande kommen (Gupta et al. 1996). Die Molekülmassen sind 46 oder 54 kDa, abhängig von einer Verlängerung am C-Terminus. Es ist unbekannt, welches das vorherrschende Isoenzym im Myokard ist. Es gibt Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die JNK1 das vorherrschende Isoenzym ist (Clerk et al. 1998b).

Zur Zeit sind 4 Varianten der p38-MAPK identifiziert (p38 α 1/ α 2 (Lee et al. 1994), p38 β 1/ β 2 (Jiang et al. 1996; Kumar et al. 1997), p38 γ (Li et al. 1996; Mertens et al. 1996), p38 δ (Goedert et al. 1997; Jiang et al. 1996)).

Entsprechend ihrem phylogenetischen Alter können die MAPK nicht nur durch Signaltransduktionskaskaden, sondern auch durch unspezifisch physikalisch-chemische Reize aktiviert werden, wie z.B. Azidose, Ischämie, Ultraviolettstrahlung, osmotischer Druck und Änderungen des Redox-Status.

Ob die p38-MAPK neben dem Hypertrophie-induzierendem Effekt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt, ist zurzeit nicht eindeutig beschrieben. Tierexperimentelle Studien zeigen, dass die p38-MAPK einen negativ inotropen Effekt vermittelt (Chen et al. 2003; Kan et al. 2005; Wang et al. 2005). Kultivierte adulte Rattenkardiomyozyten wurden mit dem übergeordneten Aktivator der p38-MAPK, der MKK3 transfiziert. Die Hemmung der p38-MAPK mit SB 203580 erhöhte die Kontraktion der Kardiomyozyten ohne eine Veränderung des Kalziumtransienten, der Kalziumströme

oder der Troponin-I-Phosphorylierung. Dieses lässt auf eine Erhöhung der Ansprechbarkeit der Myofilamente auf Kalzium nach Hemmung der p38-MAPK schließen (Liao et al. 2002).

Daten von menschlichem insuffizienten Myokard zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Es wird sowohl von einer vermehrten als auch von einer erniedrigten Aktivität berichtet (Cook et al. 1999; Flesch et al. 2001; Haq et al. 2001; Lemke et al. 2001; Liao et al. 2002).

Reactive Oxygen Species (ROS) und die p38-MAPK

Die Aktivierung der p38-MAPK kann durch Sauerstoffradikale (*Reactive Oxygen Species*, ROS) induziert werden. Die ROS sind Moleküle, die durch ihre Reaktivität zelltoxisch wirken. Diese toxische Wirkung kann von zellulärer Dysfunktion bis hin zum Zelltod führen. Sie nehmen ein Elektron von anderen Molekülen, wie beispielsweise von Lipiden, Proteinen und DNA auf, um in einen chemisch stabileren Zustand zu gelangen. So kommt es durch die Lipidperoxidation zur Permeabilitätssteigerung von Membranen bzw. die Funktionsgruppe oder die Struktur von gesamten Proteinen kann verändert werden.

Zu der Gruppe der Reactive Oxygen Species gehören u.a. Superoxid ($O_2^{\cdot -}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffmonoxid (NO), Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot -}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}). Sie entstehen physiologischerweise beim mitochondrialen Elektronentransport in der Atmungskette. Die Reduktion von Sauerstoff ist hierbei nicht vollständig effizient. 1-2 % des Sauerstoffs wird hierbei unvollständig zu Superoxid reduziert. ROS entstehen aber auch durch die Enzyme Xanthinoxidase, NADPH-Oxidase, Lipoxyxygenase/Cyclooxygenase und der entkoppelten NO-Synthase oder durch Autooxidation von Katecholaminen.

ROS spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Hypertrophie (Higuchi et al. 2002; Li et al. 2002; Pimentel et al. 2001), aber auch bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen konnte eine Beteiligung von ROS festgestellt werden. Eine erhöhte ROS-Produktion wurde bei Ischämie und bei Reperfusion nach Ischämie festgestellt (Clerk et al. 1998b; Jennings und Reimer 1991; Solaini und Harris 2005). In verschiedenen Arbeiten wurde berichtet, dass die ROS-induzierten Effekte downstream u.a. durch die p38-MAPK vermittelt werden. In neonatalen Rattenkardiomyozyten und in perfundierten Rattenherzen konnte die Aktivierung p38-MAPK durch H_2O_2 nachgewiesen werden

(Aikawa et al. 1997; Clerk et al. 1998b; Clerk et al. 1998a). In isolierten Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass Malondialdehyd, ein Endprodukt der Lipidperoxidation, die Kontraktilität p38-MAPK-vermittelt reduziert (Folden et al. 2003).

I.3. Ziele dieser Arbeit

Aus der Literatur geht zusammenfassend hervor, dass die p38-MAPK einerseits in isolierten Zellen einen negativ inotropen Effekt vermittelt und andererseits durch Dehnung aktiviert wird. Wir überprüften daher die Hypothese, dass der durch eine akute myokardiale Dehnung induzierte Kraftzuwachs durch eine gleichzeitig erfolgende endogene Aktivierung der p38-MAPK limitiert wird. Dabei überprüften wir den Effekt der p38-MAPK-Hemmung sowohl während physiologischer als auch während supraphysiologischer Dehnung. Wir wählten dabei das multizelluläre Präparat des isolierten Trabekels, bei dem die Länge exakt definiert werden kann.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren somit:

- 1. Charakterisierung der Kraftentwicklung nach akuter physiologischer und supraphysiologischer Dehnung.**
- 2. Charakterisierung der Rolle der p38-MAPK bei akuter physiologischer und supraphysiologischer Dehnung.**
- 3. Charakterisierung der Rolle der ROS bei physiologischer und supraphysiologischer Dehnung.**

II. Material und Methoden

II.1. Untersuchtetes Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Muskelstreifenpräparate von weiblichen Kaninchen der Rasse New Zealand Bastard, geliefert im Alter von 6 Wochen, untersucht. Alle untersuchten Herzen stammten von Tieren, deren Alter zwischen 6 und 10 Wochen lag. Gehalten wurden diese Tiere in der zentralen Tierstalleinrichtung des Universitätsklinikums Göttingen, wobei alle Tiere einer Lieferung in gemeinsamer Bodenhaltung getrennt von anderen Tieren gehalten wurden.

Es wurden hauptsächlich die Trabeculae carneae des rechten Ventrikels untersucht. Falls die Querschnittsfläche der Papillarmuskeln des rechten Ventrikels $0,5 \text{ mm}^2$ nicht überschritt, wurden diese auch für Untersuchungen genutzt. Sämtliche Untersuchungen am Kaninchenherzen wurden von der Ethikkommission der Universität Göttingen und der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt.

II.2. Lösungen und Substanzen

II.2.1. Tyrodelösung

Die für alle Experimente genutzte Tyrodelösung ist eine modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung. Diese ist stets mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) begast um die Oxygenierung der Trabekel zu gewährleisten und den pH-Wert konstant auf 7,4 zu halten. Die Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung	
NaCl	127,0 mM
KCl	2,3 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
MgSO ₄	0,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,3 mM
CaCl ₂	0,2 mM
Glukose	11,2 mM
Altinsulin	5,0 I.E./l

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrodelösung

II.2.2. Kardioplegie für Transport und Präparation

Zur Kardioplegie wurde zur Tyrodelösung zusätzlich 3 g/l 2,3-Butan-Dion-Monoxim (30 mM BDM) hinzugegeben. Mit Carbogen begast, wurde diese Lösung zum Transport, zur Präparation und Lagerung des Gewebes genutzt. Mittels BDM, einer Phosphatase, wird eine Kardioprotektion durch die reversible Hemmung der Querbrückeninteraktion zwischen Aktin und Myosin (Blanchard et al. 1990; Mulieri und Alpert 1984) und die Herabsetzung der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Proteine erreicht (Mulieri et al. 1989). Weiterhin wird durch BDM in höheren Konzentrationen (<5 mM) der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transient reduziert, so dass keine Kontraktion mehr ausgelöst werden kann (Blanchard et al. 1990; Fryer et al. 1988). Die Ca^{2+} -Sensitivität von Troponin C (Gwathmey et al. 1991) und die Aufnahme von Ca^{2+} in das Sarkoplasmatische Retikulum (Phillips und Altschuld 1996) bleiben dabei unbeeinflusst. Auch auf den Verlauf von Membran- und Aktionspotentialen hat BDM keinen Einfluss (Fryer et al. 1988).

Bei der Präparation von Myokardgewebe kommt es zum Teil zu einem hohen Kalziumeinstrom in das Gewebe. BDM verhindert hier die Kontraktur (Mulieri et al. 1989), da es in der verwendeten Konzentration von 30 mM zu einer vollständigen Hemmung des Querbrückeninteraktion kommt (Perreault et al. 1992). Zusätzlich wird durch Hemmung des Querbrückenzyklus der ATP-Verbrauch durch Myosin reduziert. So kann eine kardioplege BDM-Lösung bereits in geringer Konzentration die Funktion der Muskelstreifenpräparate insbesondere bei zusätzlicher Kühlung schützen (Fagbemi et al. 2001). Da die Wirkung von BDM durch Auswaschen komplett reversibel ist (Fryer et al. 1988), ist BDM eine ideale kardioprotektive Substanz um Präparationsschäden zu verhindern.

II.2.3. Pharmakologische Substanzen

SB 203580

SB 203580 ($\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{OS}$; MW:377,44 g/mol) ist ein selektiver Inhibitor der p38-MAP-Kinase. Eine 10 mM-Stammlösung wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel angesetzt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Experimente wurden bei einer Konzentration von

10 μ M durchgeführt. SB 203580 wurde von der Firma Tocris (Ballwin, USA) bezogen. Zu allen Kontrollversuchen wurde DMSO (100 μ l) hinzugefügt.

SB202190

SB 202190 (C₂₀H₁₄N₂O₇F; MW 331,35 g/mol) ist ebenfalls ein selektiver Inhibitor der p38-MAP-Kinase. SB 202190 wurde von der Firma Tocris (Ballwin, USA) bezogen. Das Ansetzen der Stammlösung erfolgte wie bei SB 203580 mit DMSO.

Tiron

Tiron (C₆H₄Na₂O₈S₂; MW314.20 g/mol) ist ein membrangängiger Puffer von Superoxid (O₂⁻)-Radikalen. Eine 0,1 M-Stammlösung wurde mit Aqua destillata angesetzt und bei -20 °C gelagert. Die Experimente wurden bei einer Organkonzentration von 100 μ M und 1 mM durchgeführt. Tiron wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

II.3. Präparation der Herzmuskelstreifen

II.3.1. Materialien

Folgende Materialien wurden zur Präparation verwendet:

Schere	Verbandschere 145 mm spitz / stumpf
Pinzette	chirurgische Pinzette
Knochenschere	Fa. Aesculap, Typ AA632 R
Mikro-Schere	Fa. Storz Augeninstrumente, Typ 23140
Mikro-Pinzette	Fa. Storz Augeninstrumente, Typ 63150
Punktions-Nadel	Fa. B. Braum Melsungen, Venofix 25 G
Einwegpipette	Fa. Sarstedt AG, Transferpipette 5 ml
Einwegbecher	Fa. Sarstedt AG, Urinbecher 100 ml
Stereomikroskop	Fa. Zeiss AG, 10x Vergrößerung
Na ⁺ Heparinat	Fa. Roche, Liquemin ® N 25.000
Thiopental	Fa. Byk Gulden, Trapanal ®.

II.3.2. Isolation und Präparation des Kaninchenherzens

Die Ohrvene des Kaninchens wurde mit einer Butterfly-Nadel (25 G) punktiert. 0,15 g Thiopental sowie 2.500 I.E. Heparin, beides gelöst in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung und auf 37 °C Temperatur erwärmt, wurden injiziert. Nach Überprüfung des Kornealreflexes, des Muskeltonus und der Antwort auf einen kurzen Schmerzreiz an der Sohlenseite des Laufs, also nach sicherem Feststellen von Analgesie, Muskelrelaxation und Bewusstlosigkeit, wurde das Abdomen knapp unterhalb des Rippenbogens quer eröffnet. Der Thorax wurde eröffnet, indem das Zwerchfell lateral und ventral vom Rippenbogen gelöst wurde. Die Rippen wurden beidseits lateral in kaudo-kranialer Richtung durchtrennt. Der gesamte Thoraxsitus wurde durch Fassen des kaudalen Randes des Sternums mit einer chirurgischen Pinzette und Umschwenken nach kranial sichtbar. Das Perikard wurde vorsichtig eröffnet. Nach Darstellung der großen Gefäße wurden diese durchtrennt, dabei wurde mit der Aorta begonnen. Das Herz wurde entnommen und sofort nach Intubation der Aorta mit einem dünnen Plastikschauch mit BDM-haltiger und begaster Tyrodelösung perfundiert. Nach sichtbarer Entfärbung der Koronararterien und des Myokardes sowie dem Erlöschen jeglicher Kontraktionen wurde das Herz in einen Behälter mit begaster BDM-Lösung überführt und dort bis zur Präparation der Herzmuskelstreifenpräparate aufbewahrt.

Die weitere Präparation erfolgte in einer Präparierschale, die ebenfalls mit kardioplegischer Tyrode gefüllt und mit Carbogen durchperlt war.

Das Herz wurde zur Präparation mit dünnen Injektionsnadeln am Boden des Präparationsbeckens fixiert, so dass der rechte Ventrikel zur Oberfläche der kardioplegen Lösung ausgerichtet war. Unter Verwendung eines Stereomikroskops (VMT; Olympus) und einer Mikroschere wurde der rechte Ventrikel septumnah entlang des Sulcus interventricularis posterior eröffnet. Nach Eröffnung des Ausflusstraktes auf einer Länge von fünf Millimetern konnten die Cordae tendinae am klappennahen Ende der Papillarmuskeln durchtrennt werden. Durch die frühzeitige Durchtrennung der Papillarmuskeln wurde eine akzidentelle Dehnung der Muskeln bei Eröffnung des Herzens verhindert. Nach Eröffnung des gesamten Ventrikels wurden möglichst unverzweigte und freiliegende Trabeculae carneae mit parallelen Faserverlauf und einer maximalen Querschnittsfläche von 0,5 mm² durch Schnitte an beiden Seiten aus der

Ventrikelwand gelöst. Zur Erleichterung des atraumatischen Einspannens in der Anlage wurden an beiden Enden des Trabekels Myokardreste („Meatends“) belassen, an denen der Muskelstreifen dann in der Anlage fixiert wurde.

Bis zum Beginn der Experimente wurden die Muskelstreifenpräparate, gekühlt in einem sterilen Einwegbecher mit BDM-haltiger Tyrodelösung, gelagert.

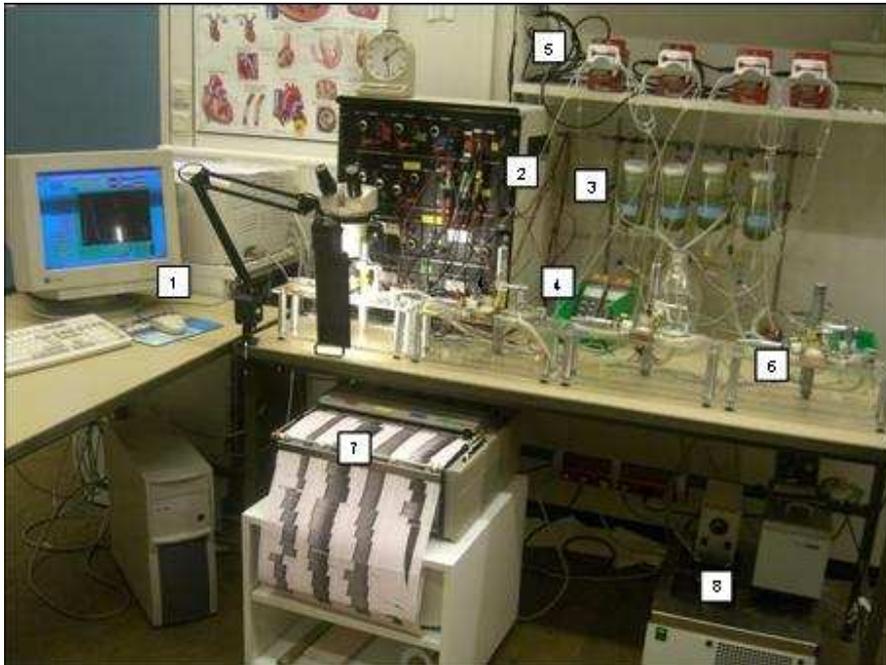
II.4. Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen

II.4.1. Verwendete Geräte

- 4-Kanal-Thermoschreiber Linearcorder WR 3320 (Graphtec; Vertrieb durch Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten)
- Mikrometerschraube (Mituyo, Japan)
- Peristaltische Rollenpumpe Ismatec MS-CA (Ismatec, Zürich, Schweiz)
- Kraftaufnehmer und Verstärker (Scientific Instruments, Heidelberg)
- Stimulationseinheit (Scientific Instruments, Heidelberg)
- Stereomikroskop SD 30 (Olympus, Taiwan)
- Thermometer Digi-Sense (Cole-Parmer, Vernon-Hills, USA)
- Umwälzthermostat Haake K 15 (Haake, Karlsruhe)
- Linearcorder WR 3320 (March-Hugstetten)
- Analog/Digital-Karte, Typ BNC-2081 (Fa. National Instruments)
- Personal Computer (Adam Soft, Windows 95).

II.4.2. Versuchsaufbau

Abb. 2.1 Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen



- (1) Computerkontrolleinheit
- (2) Stimulationseinheit
- (3) Reservoirgefäße
- (4) Thermometer
- (5) Rollenpumpen
- (6) Organbäder
- (7) Thermoschreiber
- (8) Heizung und Thermostat.

Die Anlage ermöglichte die gleichzeitige Messung der isometrischen Kontraktionskraft von vier Trabekeln („4er-Anlage“). Die Trabekel wurden hierbei durch verschiedene Kreisläufe gespeist, so dass unterschiedliche Interventionen zur selben Zeit möglich waren. Die Stimulation wurde auf alle Trabekel simultan übertragen. Bei Untersuchungen von Trabekeln aus einem Herzen und einem Ventrikel war eine optimale Vergleichsmöglichkeit geschaffen.

Das zentrale Element dieser Anlage stellte das Organbad dar. Es bestand aus einer Vertiefung (Länge x Breite x Höhe = 21 mm x 8 mm x 3 mm), die in das umgebende

Material glattrandig hineingefräst war. An den kurzen Enden wurde mittels Kanülen die Tyrodelösung von einem Vorratsgefäß, in dem die Lösung ständig mit Carbogen oxygeniert wurde, durch Silikonschläuche zu- und abgeleitet. Die Silikonschläuche und das Vorratsgefäß waren doppelumig. Durch das äußere Lumen wurde im Gegenstromprinzip erwärmtes H₂O gepumpt, so dass die Temperatur der Tyrodelösung im inneren Lumen 37 °C betrug. Der zulaufende Schenkel wurde durch ein seitliches Bohrloch geführt und am Boden des Organbades fixiert. Als Absaugung diente eine gebogene Kanüle, die am linken Ende von oben die Tyrodelösung aus dem Organbad entfernte. Der Kreislauf wurde über eine Rollpumpe betrieben. Die Förderleistung der Pumpen betrug 5,7 ml/min, so dass das Badvolumen ungefähr alle 5 s erneuert wurde.

Um den Wärmeverlust durch die Silikonschläuche auszugleichen, wurde das Organbad zusätzlich in ein Thermoelement eingelassen, über das die Temperatur der Tyrodelösung geregelt werden konnte. Die Temperatur wurde durch ein digitales Thermometer gemessen, dessen dünne Messsonde permanent im Organbad lag und so eine kontinuierliche Temperaturkontrolle ermöglichte.

An beiden Enden des Organbades wurden Aufhängevorrichtungen in das Organbad eingelassen. Diese bestanden beidseits aus spitzen Platinnadeln mit einem Durchmesser von 0,1 mm. Sie waren so gebogen, dass sie senkrecht nach oben wiesen. Es wurden nur die Meatends auf die Nadel gespießt, so dass die Gewebetraumatisierung minimiert wurde. Die rechte Nadel war direkt mit dem Kraftaufnehmer zur Registrierung der isometrischen Kontraktionen verbunden. Dieser Kraftaufnehmer war mit der Stimulationseinheit verbunden und diente also gleichzeitig mit der linken Aufhängung als Elektroden zur Stimulation der Trabekels. An der linken Aufhängenadel war eine Mikrometerschraube zur Vor- und Entdehnung befestigt.

Das Einhängen der Trabekel wurde durch ein Stereomikroskop mit zehnfacher Vergrößerung erleichtert, welches über ein Stativ direkt über das Organbad positioniert werden konnte.

Die Messsignale der vier Kanäle wurden verstärkt und simultan durch einen Vierkanal-Thermoschreiber aufgezeichnet. Zusätzlich erfolgte die digitale Speicherung der Daten mittels eines Moduls der Lab-View®-Software auf dem Messrechner.

II.4.3. Versuchsvorbereitung

Vor Positionierung der Gewebeproben in der Anlage wurde in jedem Organbad 100 ml Tyrodelösung auf 39 °C vorgewärmt und mit Carbogen oxygeniert, so dass die Temperatur der Tyrode nach Durchfluss durch die Tygonschläuche im Organbad 37 °C, der pH 7,4 betrug. Wenn die Temperatur konstant 37 °C betrug und die Schläuche entlüftet waren, konnten die Muskelstreifenpräparate mit Hilfe von zwei mikrochirurgischen Pinzetten und eines Stereomikroskops zwischen den beiden Nadelelektroden fixiert werden, indem die beiden Meatends jeweils auf eine Haltenadel aufgespießt wurden. Hierbei wurden die Aufhängenadeln nur so weit voneinander positioniert, dass die Trabekel spannungsfrei eingehängt werden konnten („slack length“). Die nun vom Muskel ausgehende Spannung wurde als diastolischer Nullpunkt definiert. Die Ca^{2+} -Konzentration der Tyrodelösung wurde in drei Schritten auf 2,5 mM erhöht, um eine Kontraktur des Muskels zu verhindern. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die mechanische Stabilisierung des Muskels abgewartet. Zum Zeitpunkt der ersten sichtbaren Kraftzunahme des Muskels als Folge einer Zugabe von Kalzium wurde die Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz eingeschaltet und deren Spannung erhöht, bis der Muskel deutlich kontrahierte (ca. 2-5 V). Nach Stabilisierung der Kontraktionskraft („steady state“) wurde mit dem schrittweisen Vordehnen des Muskels auf die Länge der maximalen Kraftentwicklung (L_{max}) begonnen. Dies nahm 30-40 Minuten in Anspruch. Trabekel, die bei L_{max} weniger Kraft entwickelten als 4 mN/mm^2 , wurden aus der Messung genommen.

II.5. Messprotokoll

Die Muskelstreifenpräparate wurden wie oben beschrieben bis L_{max} gedehnt und das „steady state“, also eine stabile Kontraktionskraft, abgewartet. Danach wurden sie auf 88 % dieser Länge (L_{88}) entdehnt. Nach 5 min wurde hier je nach Protokoll die pharmakologische Substanz hinzugegeben. Nach insgesamt 30 min Entdehnung wurden die Muskelstreifenpräparate je nach Experiment akut binnen 2-3 Sekunden auf 98 % (physiologische Dehnung) oder 108 % und 118 % (supraphysiologische Dehnung) der

Länge von L_{max} gedehnt (L98, L108, L118) oder als Kontrolleexperiment auf L88 belassen. Anders als bei der initialen graduellen Dehnung zu L_{max} wurden diese Dehnungen in nur einem schnellen Dehnungsvorgang durchgeführt. Der Messzeitraum der gedehnten Streifen wurde für alle Experimente mit 3 h festgelegt.

II.6. Auswertung

II.6.1. Computergestützte Datenerhebung

Jeder Versuch wurde mit einem Thermoschreiber (Fa. Graphtec) und auf einem selbstprogrammierten Modul der Software LabView® am PC aufgezeichnet. Folgende Daten wurden mit dem Modul der Software LabView® gemessen:

DT	Diastolische Kraft	[mN/mm ²]
ST	Systolische Kraft	[mN/mm ²]
F	Amplitude der Kontraktionskraft (entwickelte Kraft)	[mN/mm ²]
T _{max}	Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kraft	[ms]
RZ50	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation	[ms].

II.6.2. Statistische Auswertung

Alle Werte sind in Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Paarvergleiche wurden mit einem gepaarten oder ungepaarten t-Test durchgeführt (Sigma Stat 2.03, SPSS Inc.). Mehrere Mittelwerte wurden mit einer 1-Weg-ANOVA analysiert. Der Vergleich zweier Gruppen über die Zeit wurde mit einer 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen durchgeführt (Sigma Stat 2.03, SPSS Inc.). Bei Signifikanz in der ANOVA wurden einzelne Mittelwerte mit Tukey's post-hoc-Test verglichen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

III. Ergebnisse

III.1. Charakterisierung der durch physiologische und supraphysiologische Dehnung induzierten Effekte

III.1.1. Dehnungsinduzierte Kraftentwicklung isolierter rechtsventrikulärer Muskelstreifen

Um die Auswirkung akuter physiologischer und supraphysiologischer Dehnung auf isolierte rechtsventrikuläre Muskelstreifen zu untersuchen, wurden die Muskelstreifen im Organbad (37 °C, 1 Hz) mit 20-35 kleinen Dehnungsschritten auf L_{max} gebracht.

Alle Streifen wurden danach auf 88 % dieser Länge entdehnt (L_{88}). Vom ungedehnten Zustand (slack length) wurden sie akut auf 98 % (physiologisch), 108 % oder 118 % der optimalen Länge gedehnt und über drei Stunden beobachtet. Die Kontrollstreifen wurden auf L_{88} belassen.

Da die entwickelten Kräfte zwischen den einzelnen Streifen variierten, wurde zur besseren Vergleichbarkeit die entwickelte Kraft in einem Teil der Auswertungen als Prozentanteil von der bei L_{max} entwickelten Kraft ausgedrückt.

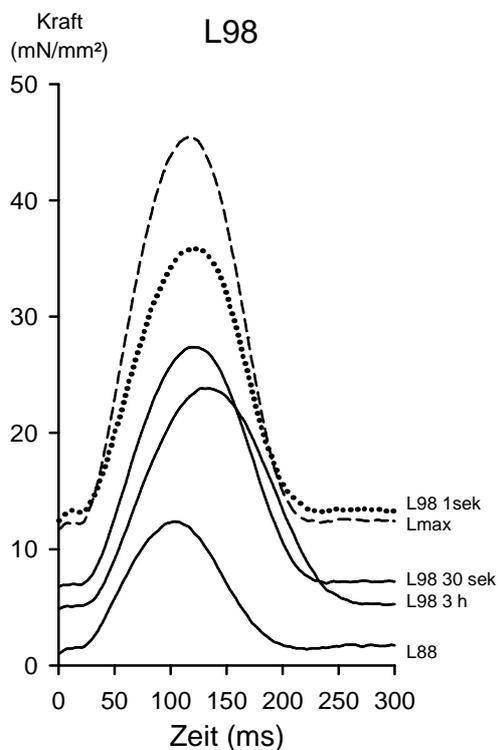


Abb. 3.1

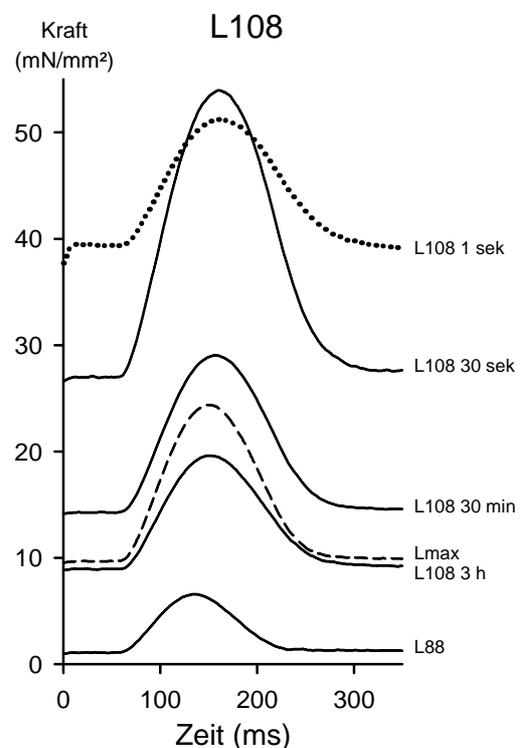


Abb. 3.2

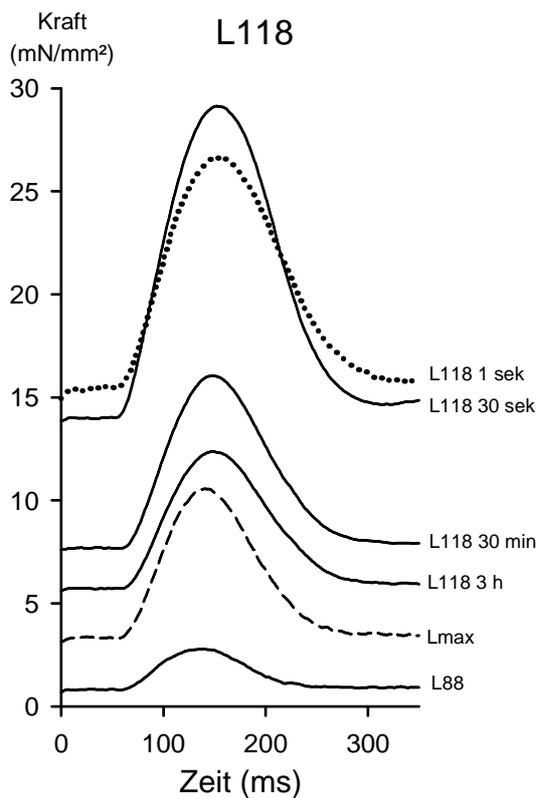


Abb. 3.3

Abb. 3.1-3.3 Originalregistrierungen isometrischer Einzelkontraktionen bei Dehnung auf L98, L108 und L118.

Abbildungen 3.1-3.3: Die einzelnen Kontraktionen zu den jeweiligen Messpunkten einer Originalregistrierung mit der Dehnungsstufe L98, L108 und L118 wurden hier dargestellt. Die Kontraktion bei Lmax ist hier gestrichelt dargestellt und dient als Referenzkontraktion. Bei allen drei Dehnungsstufen kam es nach Dehnung zu einem Anstieg der diastolischen und systolischen Kraft. Da der Anstieg der systolischen Kraft größer war als der Anstieg der diastolischen Kraft, kam es somit auch zum Anstieg der entwickelten Kraft. Im weiteren Verlauf sanken die diastolische und systolische Kraft wieder ab. Bei Dehnung auf L98 fielen nach 3 Stunden die diastolische und systolische Kraft unter das Niveau von Lmax. Bei Dehnung auf L108 stiegen die diastolische und systolische Kraft deutlich über das Niveau von Lmax an. Nach 3 Stunden entsprach die diastolische Kraft der von Lmax, die systolische war hingegen geringer. Nach Dehnung auf L118 lagen die diastolische und systolische Kraft durchweg höher als bei Lmax.

Weiterhin führte die Dehnung zur Verlängerung der Einzelzuckung, die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kraft (T_{max}) und die Zeit bis zur 50%igen Relaxation (RZ50) waren verlängert.

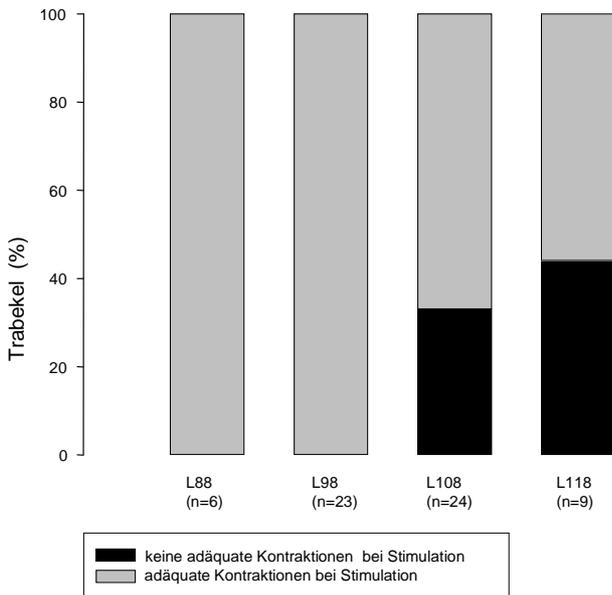


Abb. 3.4 % der Muskelstreifen, die akut nach Dehnung auf L98 (n=23), L108 (n=24) bzw. L118 (n=9) nicht mehr auf Stimulation reagierten und % der Muskelstreifen, die bei L88 (n=6) belassen worden sind und im Beobachtungszeitraum nicht mehr adäquat auf Stimulation reagierten und % der Muskelstreifen,

Abbildung 3.4: Nach suprphysiologischer Dehnung auf L108 und L118 reagierte ein Teil der Muskeln nicht mehr auf Stimulation. Bei jedem 3. Muskel in der L108-Gruppe wurden nach Dehnung keine adäquaten Kontraktionen mehr beobachtet. Bei Dehnung auf L118 trat dieses in 44 % der Fälle auf. Diese Muskelstreifen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

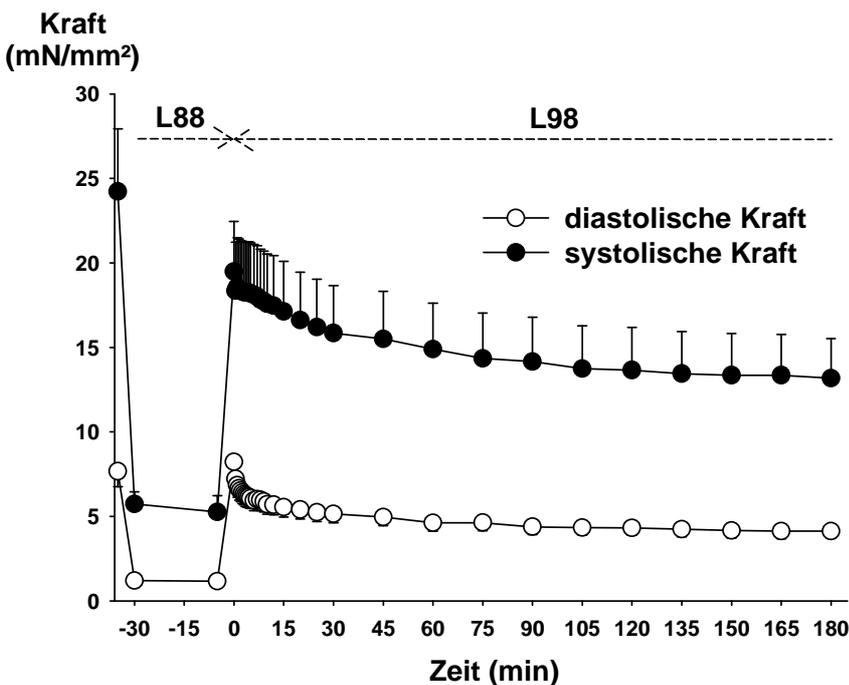


Abb. 3.5 Der zeitliche Verlauf der absoluten systolischen und diastolischen Kraft (mN/mm²) bei akuter Dehnung auf L98, n=23.

Zum besseren Vergleich der Verläufe der diastolischen und systolischen Kraft nach Dehnung wurden diese gesondert für jede Dehnungsstufe in den Abbildungen 3.5 bis 3.7 dargestellt.

Abb. 3.5: Bei Dehnung auf L98 kam es dehnungsinduziert zu einem Anstieg der diastolischen Kraft von 1 ± 0 mN/mm² auf 8 ± 1 mN/mm². Auch die systolische Kraft stieg von 6 ± 1 mN/mm² auf 19 ± 3 mN/mm² an. Danach kam es zum Absinken der diastolischen und systolischen Kraft. Da es in der ersten 15 min zum schnelleren Abfall der diastolischen Kraft kam, stieg hier die entwickelte Kraft an. Sowohl die diastolische als auch die systolische Kraft stabilisierten sich 60 min nach Dehnung bei 5 bzw. 15 mN/mm².

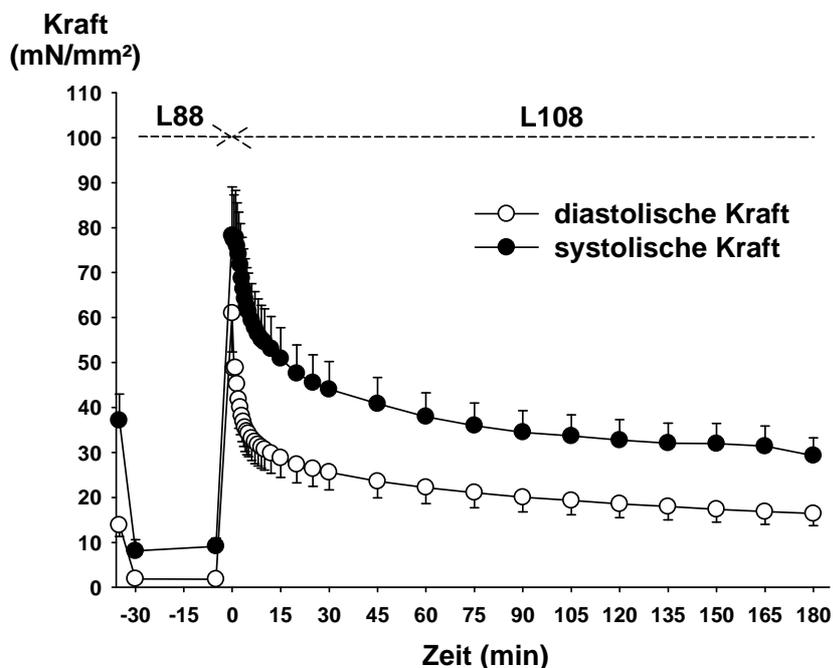


Abb. 3.6 Der zeitliche Verlauf der absoluten systolischen und diastolischen Kraft (mN/mm²) bei akuter Dehnung auf L108, n=13.

Abbildung 3.6.: Auch bei Dehnung auf L108 kam es zu einem Anstieg der diastolischen und systolischen Kraft. Die diastolische Kraft stieg auf 61 ± 9 mN/mm², die systolische Kraft stieg nach Dehnung auf 78 ± 11 mN/mm². Auch hier erfolgte keine Stabilisierung auf diesem hohen Kraftniveau. Es kam analog zur Dehnung auf L98 zu einem steilen Abfall der diastolischen Kraft. Die diastolische Kraft sank nach 15 min auf 29 ± 4 mN/mm². Im

Verlauf stabilisierte sich die diastolische Kraft bei 20 mN/mm^2 . Die systolische Kraft sank in den ersten 15 min auf $51 \pm 7 \text{ mN/mm}^2$. Sie stabilisierte sich im Verlauf bei 35 mN/mm^2 .

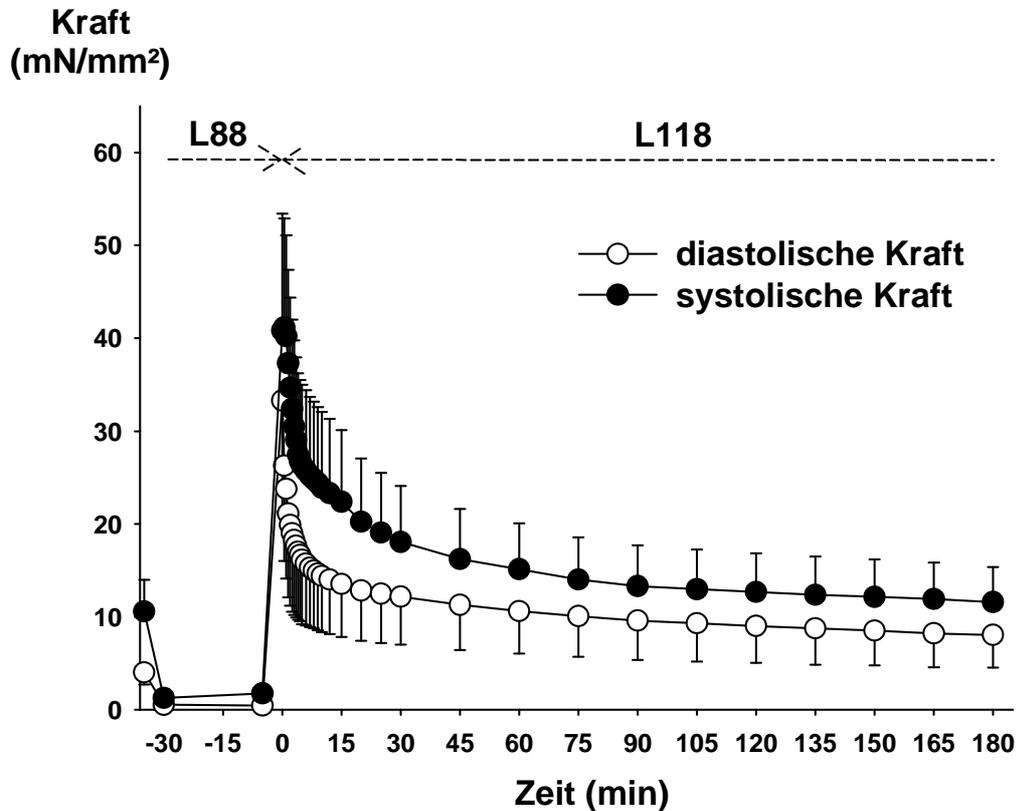


Abb. 3.7 Verlauf der diastolischen und systolischen Kraft (mN/mm^2) bei Dehnung von L88 auf L118, $n=4$.

Abbildung 3.7: Bei Dehnung auf L118 stieg die diastolische Kraft von annähernd 0 mN/mm^2 auf $33 \pm 12 \text{ mN/mm}^2$ und fiel auf $16 \pm 6 \text{ mN/mm}^2$ 6 min nach Dehnung. Die folgende Stabilisierung erfolgte bei einem diastolischen Kraftniveau von 10 mN/mm^2 . Die systolische Kraft stieg nach akuter Dehnung von $2 \pm 0 \text{ mN/mm}^2$ auf $41 \pm 13 \text{ mN/mm}^2$. Auch bei L118 erfolgte nach einem initialen Anstieg der systolischen Kraft ein Absinken der systolischen Kraft, das weniger steil war als das Absinken der diastolischen Kraft. Sie erreichte nach ca. 45 min ein stabiles Kraftniveau bei 16 mN/mm^2 .

entwickelte Kraft (% Lmax)

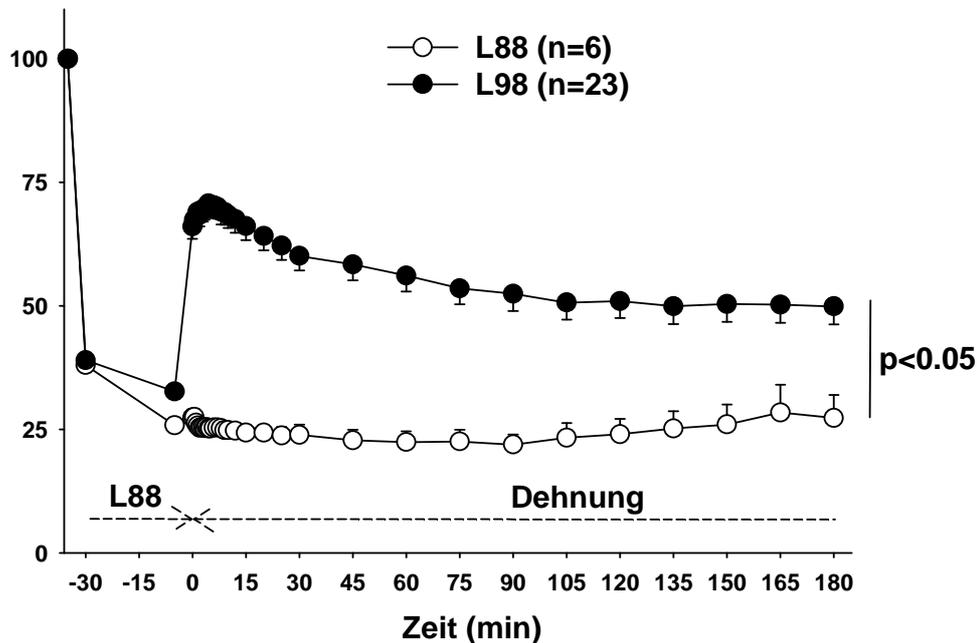


Abb. 3.8 Die entwickelte Kraft (%) bei akuter Dehnung von L88 auf L98 (n=23) im Vergleich zu Kontrollstreifen, die bei L88 (n=6) belassen wurden (Mittelwerte \pm SEM). 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.8: Nachfolgend untersuchten wir die entwickelte Kraft (in % von Lmax) von auf physiologische Länge gedehnten Streifen im Vergleich zu Kontrollstreifen, die die gesamte Zeit bei minimaler Dehnung (L88) stimuliert wurden.

Die entwickelte Kraft nach Entdehnung von Lmax auf L88 lag bei beiden Gruppen bei 30 %. Dehnung auf L98 induzierte einen charakteristischen dreiphasigen Kraftverlauf. Der erste unmittelbare schnelle Kraftanstieg entspricht dem Frank-Starling-Straub-Effekt. Innerhalb von 20 min nach akuter Dehnung folgte ein zweiter langsamer Kraftanstieg mit Maximum bei 71 ± 2 % bei 4,5 min nach Dehnung, die sog. 2. Phase (Slow Force Response). Die entwickelte Kraft sank dann im weiteren progressiv auf 52 ± 3 % ab (bei 75 min), es folgte eine Stabilisierung der entwickelten Kraft bei 50 %. Die entwickelte Kraft bei den auf L88 gedehnten Muskelstreifen im Zeitraum von 3 h war ohne nennenswerte Änderungen.

entwickelte Kraft
(% Lmax)

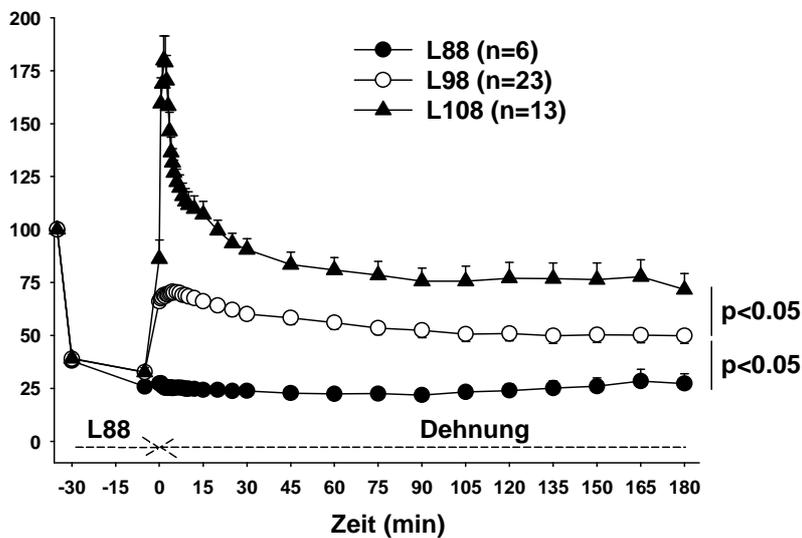


Abb. 3.9 Die entwickelte Kraft (%) bei akuter Dehnung von L88 auf L98 bzw. L108 im Vergleich zu ungedehnten Muskelstreifen (L88). 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.9: Eine supraphysiologische Dehnung auf L108 zeigte einen veränderten Kraftverlauf über 3 h. Unmittelbar nach Dehnung kam es zu einem signifikant höheren Kraftanstieg. Das Maximum dieses Kraftanstieges (180 ± 11 % bei 1,5 min nach Dehnung) wurde früher erreicht und war größer im Vergleich zur akuten Dehnung auf L98. Ohne abgrenzbare zweite Phase kam es bei supraphysiologischer Dehnung zum progredienten Kraftverlust. Ein stabiles Kraftniveau um 80 % wurde nach 1 h erreicht.

entwickelte Kraft
(% Lmax)

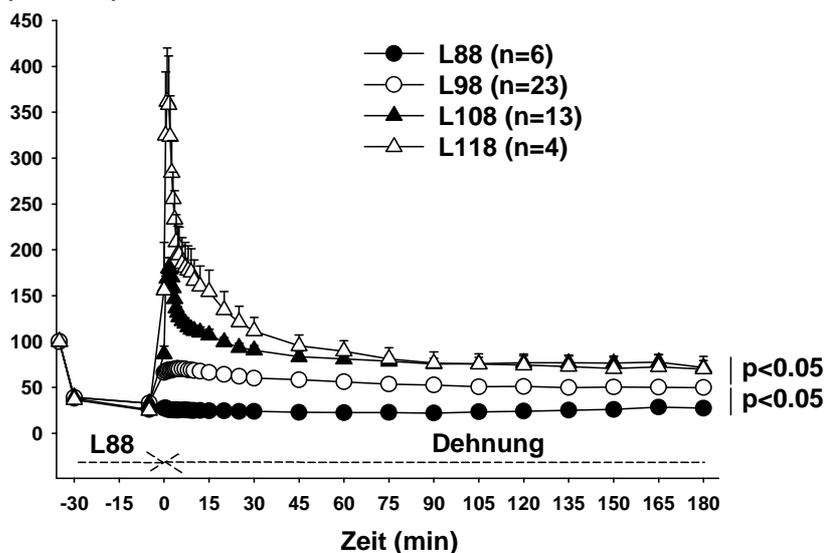


Abb. 3.10 Die entwickelte Kraft (%) bei akuter Dehnung von 98, L108 und L118 im Vergleich zu ungedehnten Kontrollstreifen. 2-Wege-RM-ANOVA.

Abb. 3.10: Trabekel, die supraphysiologisch auf L118 gedehnt wurden, zeigten ähnlich wie die Trabekel der L108-Gruppe keine Dreiphasigkeit des Kraftverlaufes. Es kam zu einem dehnungsinduzierten Kraftanstieg (361 ± 53 %), der um ein Vielfaches größer als bei Dehnung auf L98 und L108 war und auch hier wurde das Maximum eher erreicht (1 min nach Dehnung) als bei den auf L98 und L108 gedehnten Muskelstreifen.

Analog zur Dehnung auf L108 kam es nach dem akuten Anstieg der entwickelten Kraft zu keinem SFR, sondern es wurde ein progressiver Abfall der entwickelten Kraft beobachtet. Die entwickelte Kraft sank in der ersten Stunde nach Dehnung um fast 300 %. Sie blieb im zeitlichen Verlauf bei ca. 75 % annähernd stabil.

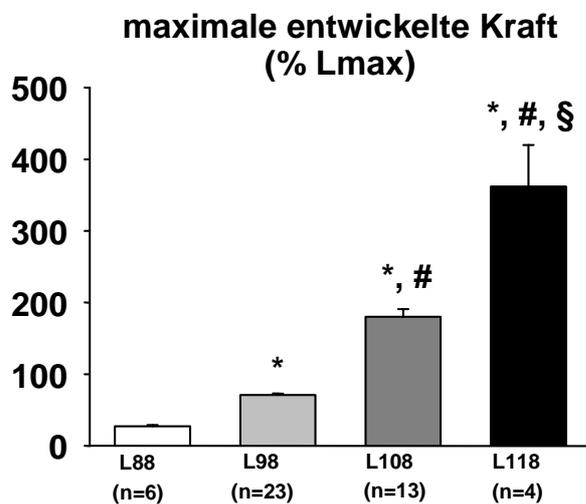


Abb. 3.11 Die maximal entwickelte Kraft (%Lmax) bei Dehnung auf L88 (n=6), L98 (n=23), L108 (n=13) und L118 (n=4). t-Test, *:p<0,05 vs. L88, #:p<0,05 vs. L98, §:p<0,05 vs. L108. 1-Weg-ANOVA + Tukey's post-hoc-Test.

Abbildung 3.11.: Je höher die Dehnungsstufe, desto höher war die maximal entwickelte Kraft. Bei der Dehnungsstufe L88 lag die maximal entwickelte Kraft bei 27 ± 2 % von Lmax, bei Dehnung auf L98 bei 71 ± 2 %, bei Dehnung auf L108 bei 180 ± 11 % und bei Dehnung auf L118 bei 362 ± 58 %.

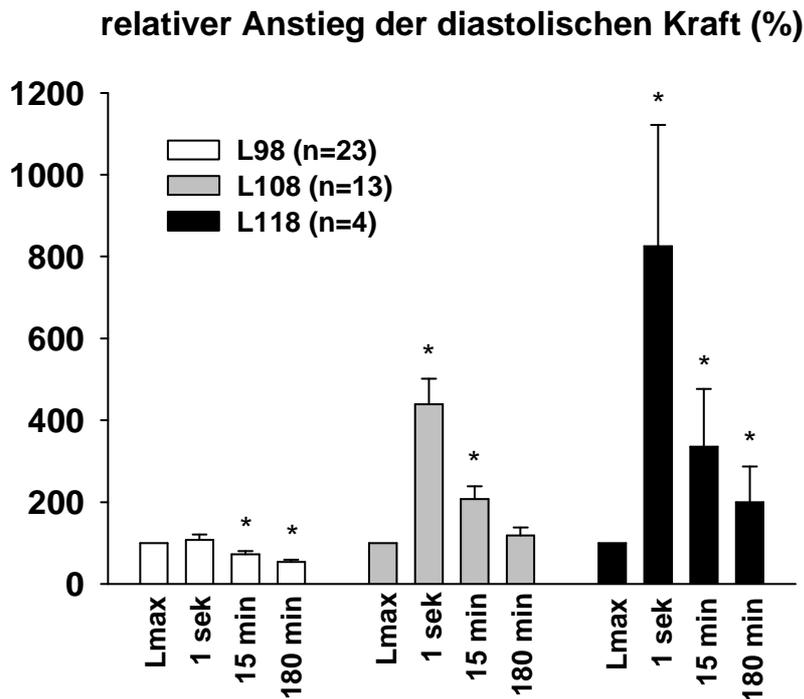


Abb. 3.12 Der relative Anstieg der diastolischen Kraft (%) bei Dehnung auf L98, L108 und L118. t-Test, *: $p < 0,05$ vs. jeweilige Lmax. 1-Weg-ANOVA + Tukey's post-hoc-Test.

Abbildung 3.12: Vergleicht man die relative diastolische Kraft (%) bei Dehnung auf L98, L108 und L118 zu den Messpunkten 1 Sekunde, 15 Minuten und 3 Stunden nach Dehnung, so findet man einen Anstieg der diastolischen Kraft. Dieser Kraftanstieg war umso höher, je stärker der Muskel gedehnt wurde (L98=107±14 %, L108=440±62 %, L118=835±297 %, $p < 0,05$ für Vergleich der Mittelwerte). Nach akuter Dehnung sank die diastolische Kraft im Verlauf progressiv ab. Nach 3 h stabilisierte sich die relative diastolische Kraft. Auch diese war höher, je höher die Dehnungsstufe war (L98=54±6 %, 108=118±20 %, L118= 200±87 %). Der enorme Anstieg der diastolischen Kraft bei L108 und L118, nicht aber bei L98 unterstreicht das supraphysiologische Ausmaß der stattgehabten Dehnung.

III.1.2. Kinetik der Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der Dehnung

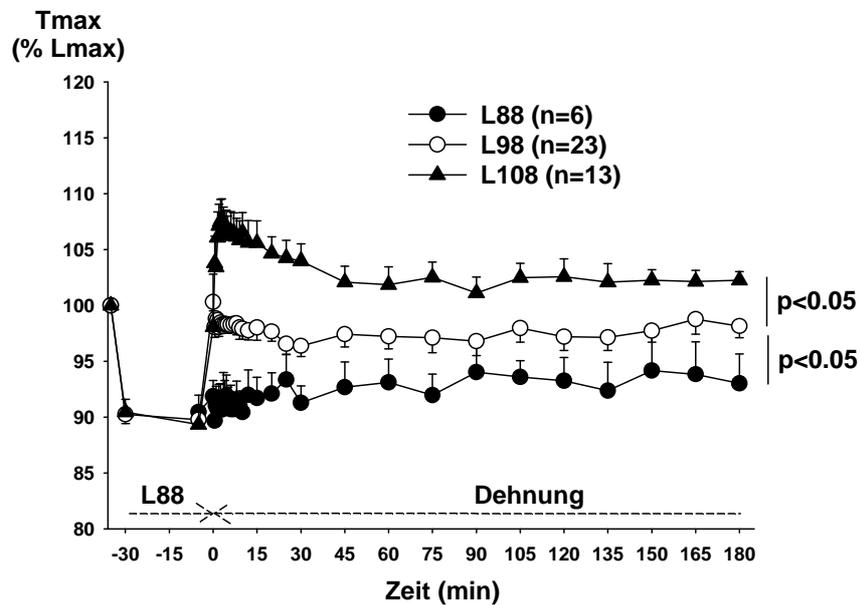


Abb. 3.13 Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kraft (Tmax) bei L88, L98 und L108 im Vergleich. 2-Wege-RM-ANOVA.

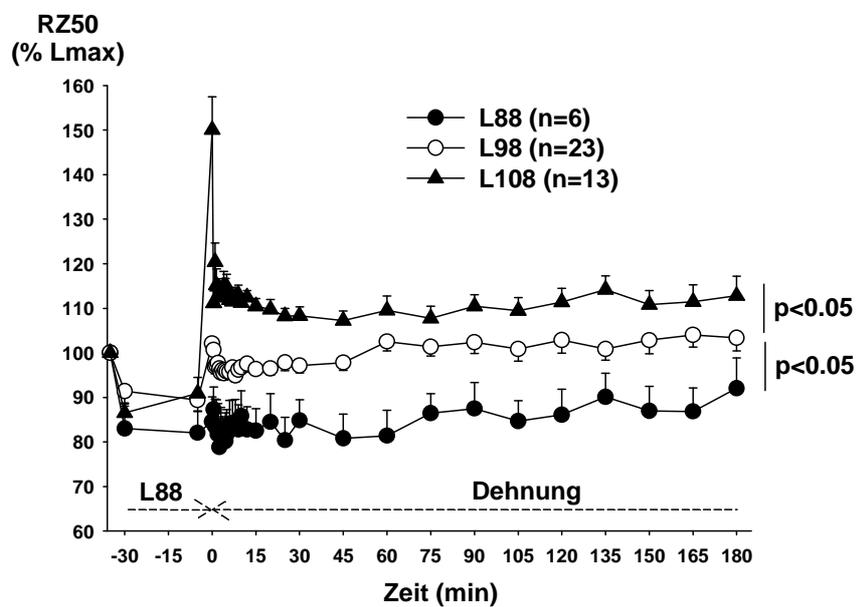


Abb. 3.14 Änderungen der Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50-prozentigen Relaxation (RZ50) nach Dehnung auf L98, L108. 2-Wege-RM-ANOVA.

Um den Verlauf der Kinetikparameter genauer auszuwerten, wurden diese in den Abbildungen 3.13 und 3.14 im zeitlichen Verlauf (in %) dargestellt.

Die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kraft (T_{max}) stieg bei Dehnung auf L98 um ca. 10 % an. Im Verlauf kam es zur Stabilisierung bei 98 %.

Der Verlauf der Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50-prozentigen Relaxation (RZ50) für rechtsventrikuläre Trabekel bei Dehnung auf L98 ist ähnlich wie bei T_{max} . Es kam zu einem dehnungsinduzierten Anstieg der RZ50. Bei Dehnung auf L98 gab es einen Anstieg von 89 ± 2 % auf 102 ± 3 %. 3 h nach Dehnung lag die RZ50 bei 103 % (Abbildung 3.14).

Im Vergleich zum Verlauf der Parameter T_{max} und RZ50 bei Dehnung auf L98 stiegen diese nach akuter Dehnung auf L108 stärker an. Es kam es zu einem Anstieg von T_{max} von über 20%. Parallel zu T_{max} bei Dehnung auf L98 kam es zum Absinken von T_{max} auf 99 ± 2 % bei 90 min. Die Stabilisierung erfolgte bei 103 % (Abbildung 3.13).

Die RZ50 stieg bei Dehnung auf L108 von 92 ± 4 % auf 150 ± 7 %. Die RZ50 sank dann innerhalb von 3 Stunden auf 114 ± 3 % (Abbildung 3.14).

Bei der L88-Gruppe blieb T_{max} über 3 h bei 90 % stabil. Ebenso blieb die RZ50 im Wesentlichen unverändert (Abbildung 3.13 und 3.14).

III.2. Bedeutung der p38-MAP-Kinase für die dehnungsabhängige Kraftentwicklung

Druckbelastung (Takeishi et al. 2001) und Dehnung (Aikawa et al. 2002; Takeishi et al. 2001) führen zur Aktivierung von MAPK. Speziell die p38-MAPK wird akut nach Dehnung aktiviert und hat in isolierten Kardiomyozyten einen negativ-inotropen Effekt (Aikawa et al. 2002; Chen et al. 2003; Kan et al. 2005; Takeishi et al. 2001; Wang et al. 2005). Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es dehnungsinduziert zu einem progressiven Kraftabfall kommt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob Hemmung der p38-MAPK die kontraktile Funktion in akut gedehnten rechtsventrikulären Kaninchentrabekeln erhält.

Der unselektive p38-MAPK-Hemmer SB 203580 wurde 5 min nach Entdehnung von Lmax auf L88 hinzugegeben und 25 min inkubiert. Die Muskelstreifen wurden dann analog zu den unbehandelten Trabekeln auf L88 belassen oder auf L98 bzw. L108 gedehnt. Den Kontrollstreifen wurde 10 μ M des Lösungsmittel DMSO hinzugegeben.

III.2.1. Dehnungsinduzierte funktionelle Änderungen bei Hemmung der p38-MAPK

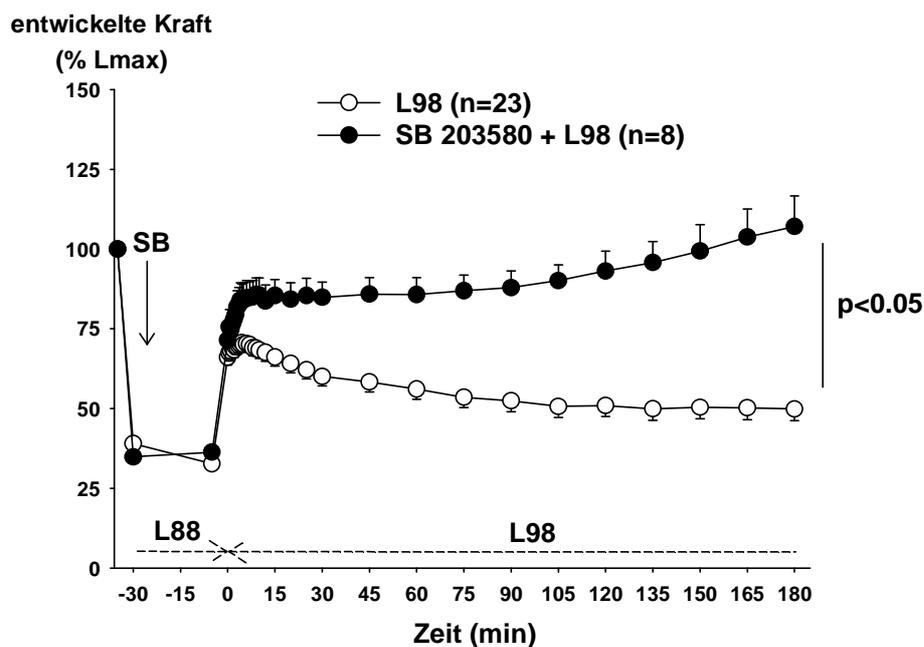


Abb. 3.15 Die entwickelte Kraft (%) bei akuter Dehnung auf L98 mit und ohne Hemmung der p38-MAPK mit SB 203580. 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.15: Die entwickelte Kraft der Kontrollstreifen zeigte den oben beschriebenen drei-phasigen Verlauf mit Frank-Starling-Straub-Mechanismus, SFR und anschließender Phase mit progredienten Kraftverlust.

Die entwickelte Kraft der mit SB 203580 behandelten und auf L98 gedehnten Trabekel nach akuter Dehnung zeigte einen veränderten Verlauf. Das Maximum (78 ± 5 % 2 min nach Dehnung) war über 10 % höher als bei den ungehandelten Streifen. Statt des in den Kontrollstreifen folgenden SFR und des darauf folgenden progressiven Kraftabfalles wurde ein allmählicher Kraftzuwachs bis auf 107 ± 10 % 180 min nach Dehnung festgestellt. Ähnliche Befunde konnten mit einem anderen Inhibitoren der p38-MAPK (SB 202190, 50 μ M) beobachtet werden. Behandlung mit SB 202190 induzierte einen positiv inotropen Effekt. Es kam bei Dehnung auf L98 zu einem maximalen Anstieg der entwickelten Kraft auf 94 ± 6 % ($n=6$) 2,5 min nach Dehnung ($p < 0.05$ vs. DMSO allein).

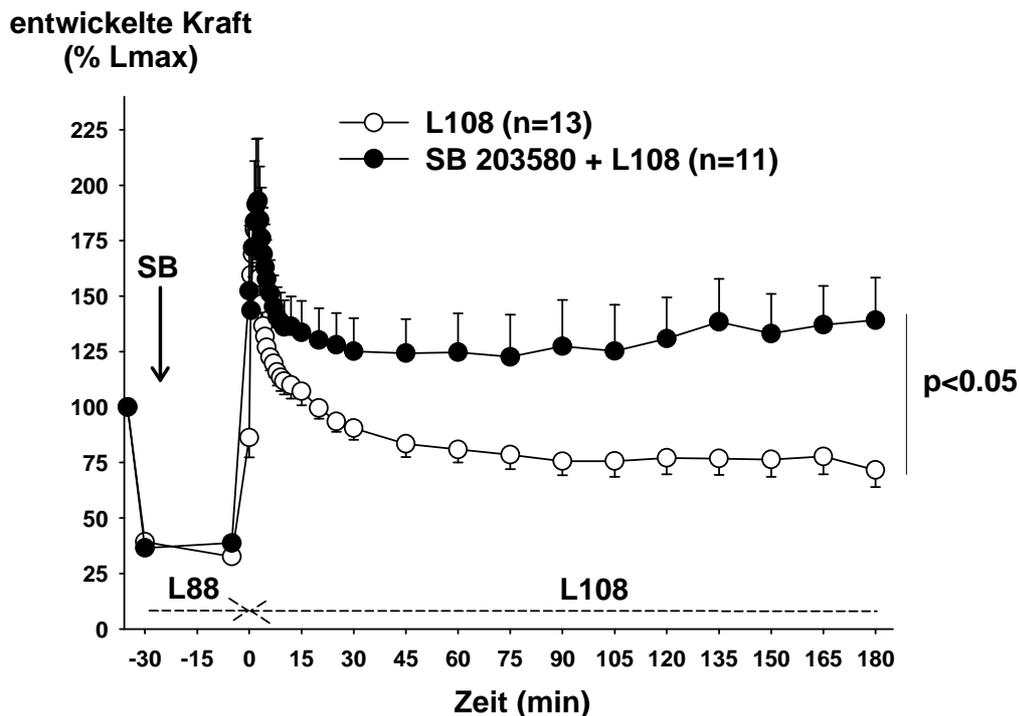


Abb. 3.16 Die entwickelte Kraft (%) bei akuter Dehnung L108 mit und ohne Hemmung der p38-MAPK mit SB 203580. 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.16: Bei Dehnung auf L108 mit Hemmung der p38-MAPK konnte ebenfalls ein positiv inotroper Effekt festgestellt werden. Das Maximum der entwickelten Kraft war mit 193 ± 28 % 2,5 min nach Dehnung nicht signifikant höher als bei unbehandelten Muskelstreifen. Der nachfolgende progressive Kraftverlust hingegen wurde durch SB 203580 abgeschwächt. Es kam zum Abfall der entwickelten Kraft auf 123 ± 19 % 75 min nach Dehnung. Danach kam es aber nicht zu einem weiteren Abfall der entwickelten Kraft, sondern sie stieg wieder stetig bis auf 139 ± 19 % bei 180 min.

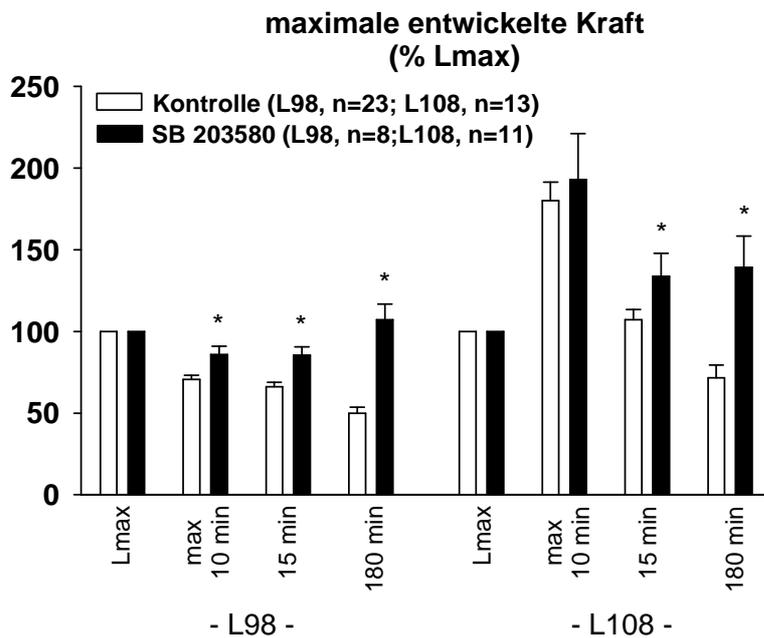


Abb. 3.17 Die maximal entwickelte Kraft (% Lmax) von Trabekeln bei Dehnung auf L98 und L108 mit Hemmung der p38-MAPK im Vergleich zu Kontrollstreifen. t-Test, *; $p < 0,05$ vs. Kontrollstreifen.

Abbildung 3.17: Die entwickelte Kraft (%) von auf L98 und L108 gedehnten Streifen, bei denen die p38-MAPK mit SB 203580 gehemmt worden war, lag im Zeitverlauf signifikant höher als bei Kontrollstreifen.

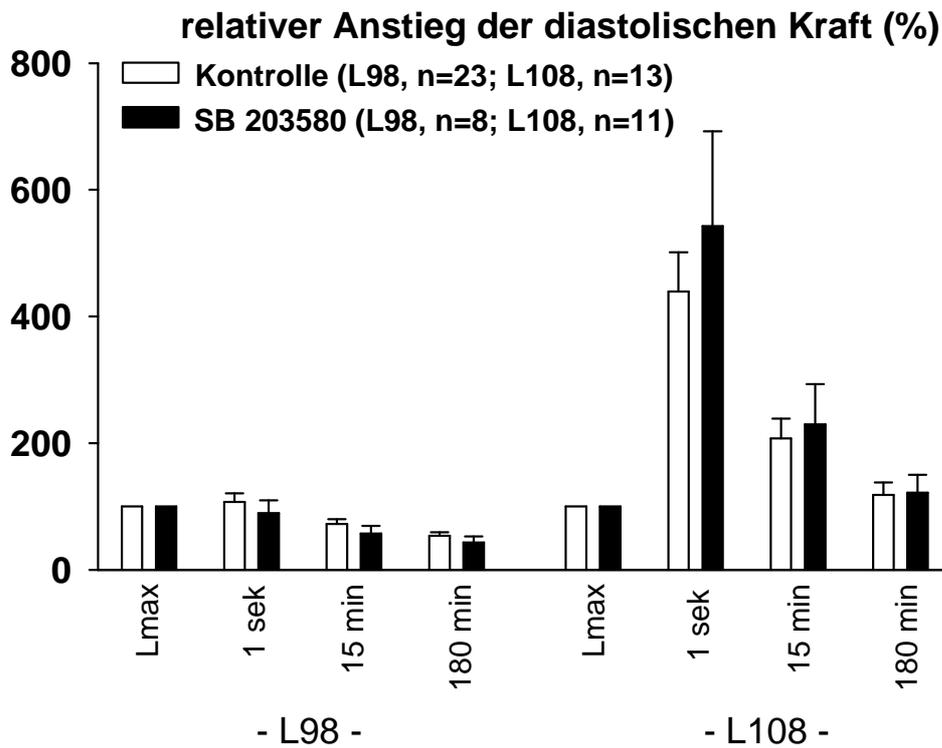


Abb. 3.18 Der relative Anstieg der diastolischen Kraft (%). Kontrollstreifen im Vergleich zu mit SB 203580 behandelten Streifen. Keine Signifikanz im t-Test beim Vergleich Kontrolle mit SB 203580.

Abbildung 3.18: Die diastolische Kraft bei Dehnung auf L98 und L108 von mit SB 203580 behandelten Streifen im Vergleich zu Kontrollstreifen war nicht signifikant verändert.

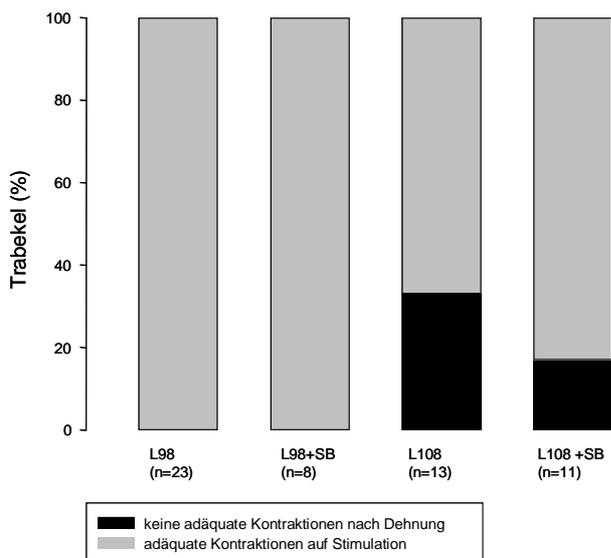


Abb. 3.19 % der Muskelstreifen, die akut nach Dehnung auf L98 und L108 und Inhibition der p38-MAPK keine Reaktion auf elektrische Stimulation zeigten.

Abbildung 3.19: Auch in der Gruppe der mit SB 203580 behandelten Streifen kam es bei einem Teil der Streifen akut nach Dehnung auf L108 zu keinen adäquaten Kontraktionen auf Stimulation, so dass diese aus der Auswertung genommen wurden. Insgesamt war der Unterschied zwischen unbehandelten und mit SB 203580 vorbehandelten Streifen bei Dehnung auf L108 aber nicht signifikant. Bei Dehnung auf physiologische Länge trat dieses Phänomen nicht auf.

III.2.2. Dehnungsabhängige Änderungen der Kinetik bei Hemmung der p38-MAPK

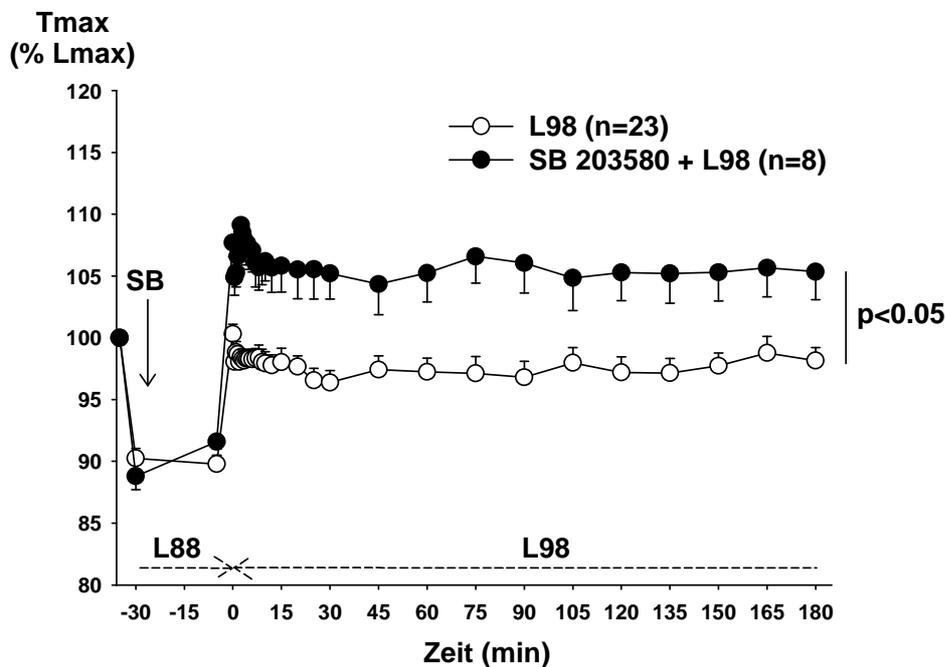


Abb. 3.20 Tmax bei mit SB 203580 behandelten Streifen mit der Dehnungsstufe L98 im Vergleich zu Kontrollstreifen. 2-Wege-RM-ANOVA.

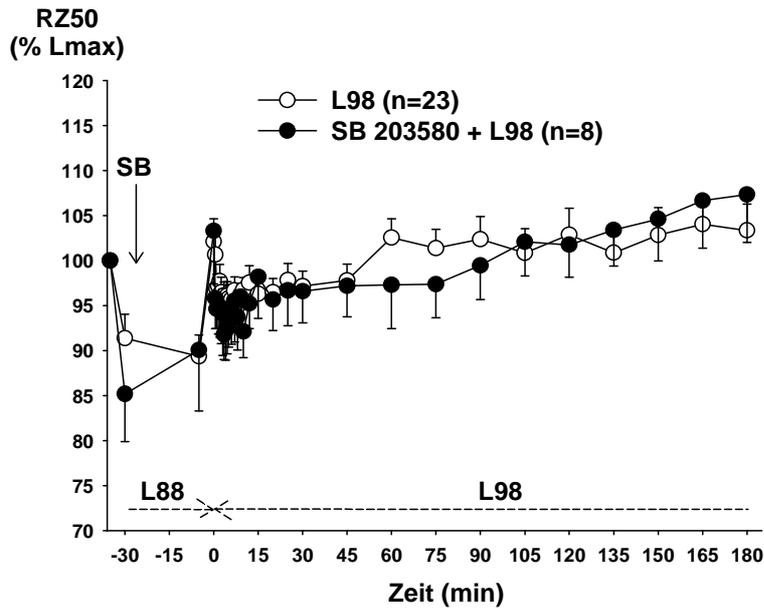


Abb. 3.21 Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50-prozentigen Relaxation (RZ50) mit und ohne Hemmung der p38-MAPK bei Dehnung auf L98. Keine Signifikanz in der 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.20 und 3.21: Bei Dehnung auf L98 verlängerte sich die relative Tmax unter Hemmung der p38-MAPK signifikant. Sie stabilisierte sich bei 105 %, während Tmax bei den Kontrollstreifen bei 98% lag. Im Vergleich dazu gab es keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der RZ50 bei behandelten und unbehandelten Trabekeln.

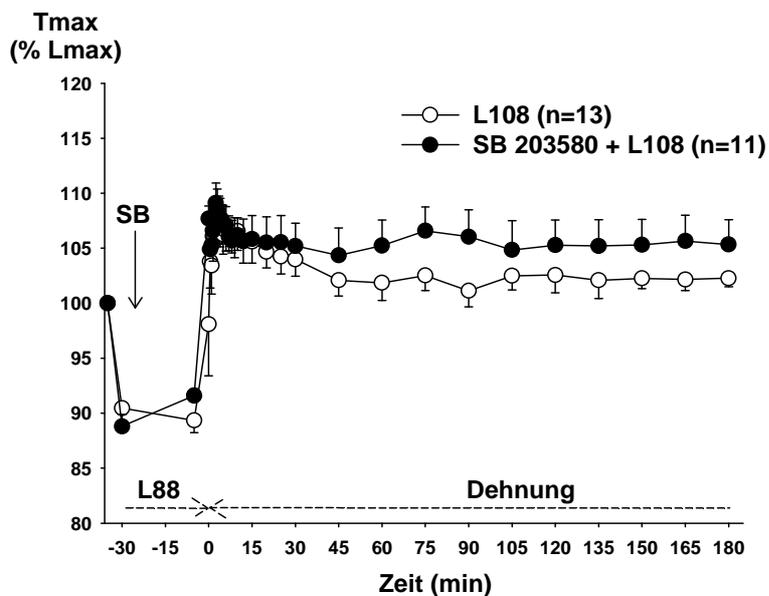


Abb. 3.22 Tmax bei Muskelstreifen mit Hemmung der p38-MAPK mit der Dehnungsstufe L108 im Vergleich zu Kontrollstreifen. Keine Signifikanz in der 2-Wege-RM-ANOVA.

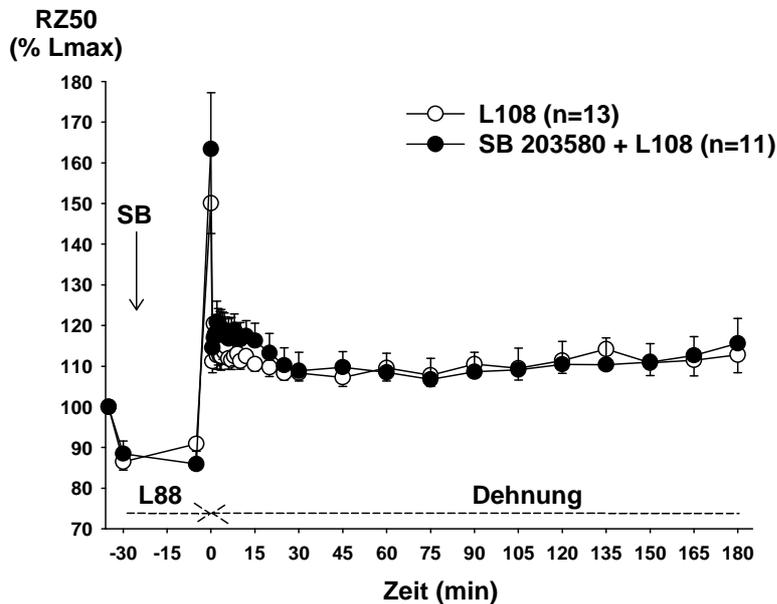


Abb. 3.23 Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50-prozentigen Relaxation (RZ50) mit und ohne Hemmung der p38-MAPK bei Dehnung auf L108. Keine Signifikanz in der 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.22 und 3.23: Der Verlauf der relativen Tmax und der relativen RZ50 bei Dehnung auf L108 wurde bereits oben dargestellt. Bei Hemmung der p38-MAPK konnten keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten Trabekeln festgestellt werden.

III.2.3. Das Antioxidans Tiron hemmt den progressiven dehnungsinduzierten Kraftabfall

Die p38-MAPK wird einerseits durch Sauerstoffradikale aktiviert und kann wiederum über die Induktion von Tumor Nekrose Faktor alpha die Bildung von Sauerstoffradikalen induzieren. Daher untersuchten wir, ob Tiron, ein membrangängiger Puffer von Superoxid (O_2^-)-Radikalen, dem dehnungsinduzierten Kraftabfall entgegenwirkt.

Tiron wurde zum gleichen Zeitpunkt wie SB 203580, also 5 min nach Entdehnung, zum Organbad hinzugegeben. Die Muskelstreifen wurden ebenfalls 25 min inkubiert, bevor sie auf L98 bzw. L108 gedehnt wurden. Die anfängliche Organbadkonzentration war 100 μ M. Um die Tiron-induzierten Effekte hervorzuheben, wurde diese Messreihe bei einer erhöhten Organbadkonzentration von 1 mM wiederholt.

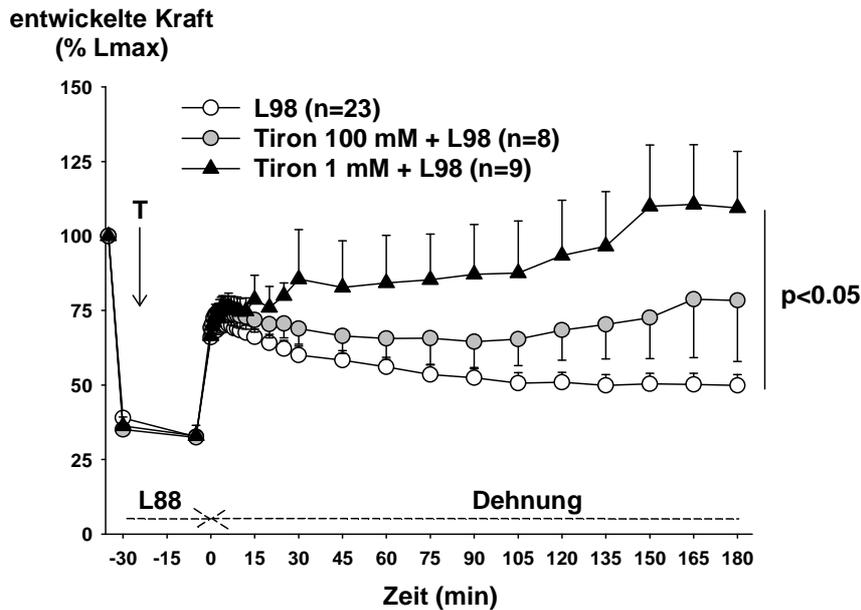


Abb. 3.24 Entwickelte Kraft (%) bei akuter Dehnung auf L98 mit Behandlung mit Tiron (T) (100 μ M und 1mM) im Vergleich zur Kontrollgruppe. 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.24: Die entwickelte Kraft der Trabekel, die mit 100 μ M und 1 mM Tiron behandelt und auf L98 gedehnt wurden, wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollstreifen untersucht. Bei Behandlung mit Tiron kam es nach akuter Dehnung auf L98 zu einem Kraftanstieg. Das Maximum lag wie bei den Kontrollstreifen bei beiden Tiron-Gruppen bei ca. 75 %. Bei Behandlung mit 100 μ M Tiron kam es zu einem abgeschwächten dehnungsinduzierten Kraftabfall auf 65 % nach 90 min. Nachfolgend erhöhte sich die entwickelte Kraft progressiv um 10 %. Mit 1 mM Tiron behandelte Streifen zeigten im Verlauf keinen typischen dehnungsinduzierten Kraftabfall, sondern es kam zu einer andauernden Erhöhung der Kraft bis 110 % 3 h nach Dehnung.

entwickelte Kraft
(% Lmax)

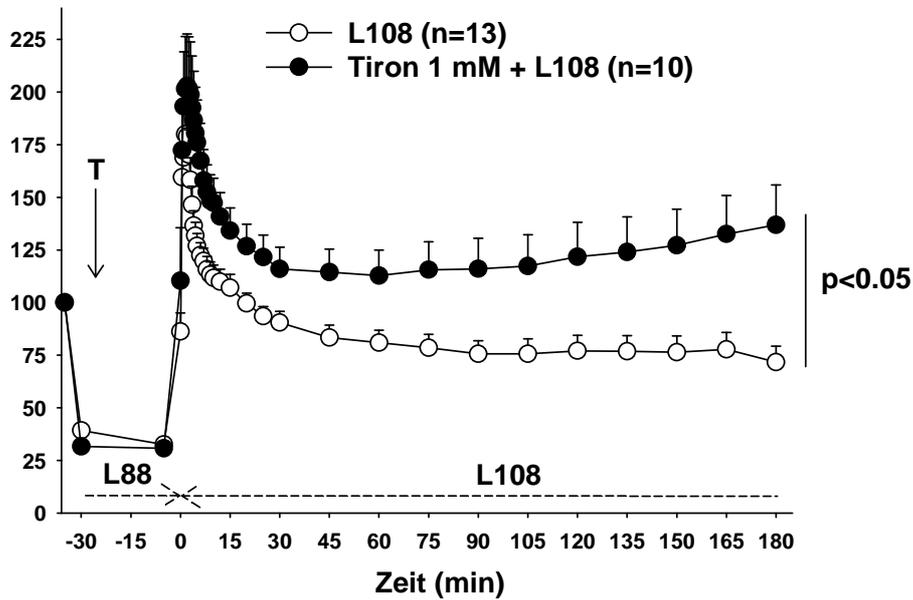


Abb. 3.25 Die entwickelte Kraft (%) bei Dehnung auf L108 mit und ohne Behandlung mit Tiron. 2-Wege-RM-ANOVA.

Abbildung 3.25: Bei Trabekeln mit Behandlung mit 1mM Tiron und Dehnung auf L108 kam es wie bei der Kontrollgruppe zu einem ersten Kraftanstieg mit Maximum wie bei der Kontrollgruppe bei 200 %. Der progressive Abfall der entwickelten Kraft erstreckte sich nicht über die gesamten 3 h wie bei der Kontrollgruppe, sondern war bei 60 min mit einem Absinken auf 112 % beendet. Die entwickelte Kraft stieg im restlichen Beobachtungsintervall progredient bis auf 137 % bei 180 min an.

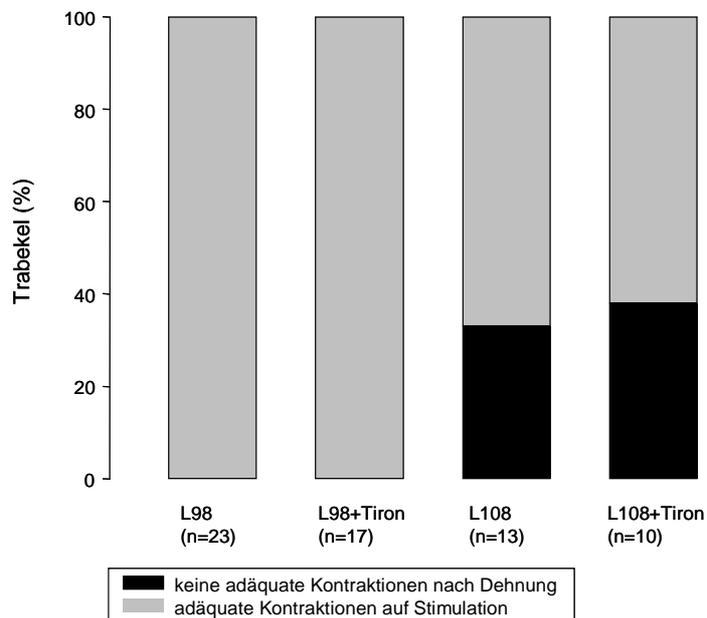


Abb. 3.26 Anteil der Trabekel [%], die nach Dehnung auf L98 und L108 und Behandlung mit Tiron Reaktion auf elektrische Stimulation zeigten.

Abbildung 3.26: Bei Dehnung auf L98 kam es bei beiden Konzentrationen (100 μ M und 1 mM) bei keinem Trabekel zu einem Funktionsverlust, d.h. sie kontrahierten auch nach Dehnung. Bei auf L108 gedehnten Muskelstreifen kam es in ca. 40 % zu einem dehnungsinduziertem Funktionsverlust. Es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Streifen.

IV. Diskussion

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit isolierten rechtsventrikulären Kaninchentrabekeln durchgeführt.

Diese Präparate bieten den Vorteil gegenüber in-vivo-Modellen, dass Untersuchungen von multizellulären Präparaten unter konstanten Bedingungen durchgeführt werden können, d.h. kontrollierte Stimulationsfrequenz, isometrische Kontraktion und Ausschluss neurohumeraler Einflüsse.

Die in der Einleitung angegebenen Ziele der Arbeit werden nachfolgend in entsprechender Reihenfolge diskutiert.

IV.1. Funktionelle Effekte von physiologischer und supraphysiologischer Dehnung

Dehnung ist eine wichtige Determinante der myokardialen Funktion und ein physiologischer Aktivator der p38-MAPK. Physiologisch führt Dehnung zu einem biphasischen Kraftanstieg. Der 1. schnelle Kraftanstieg entspricht dem Frank-Starling-Straub-Mechanismus und beruht auf einer Erhöhung der Kalziumsensitivität der Myofilamente (Pieske et al. 1997). Es folgt ein 2. langsamer Kraftanstieg, das SFR oder die 2. Phase. Dieser Mechanismus wird durch eine Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten hervorgerufen (Allen und Kurihara 1982). Auch in dieser Arbeit konnte nach Dehnung der Frank-Starling-Straub-Mechanismus und der 2. langsame Kraftanstieg reproduziert werden. Im Anschluss kommt es in unseren Untersuchungen zu einem progressiven Kraftverfall.

Es wurden zunächst Trabekel vom Kaninchen auf die physiologische und supraphysiologische Länge gedehnt und über 3 h beobachtet. Die Muskeln wurden dabei graduell gedehnt, bis keine Zunahme der entwickelten Kraft zu beobachten war. Diese entwickelte Kraft ist die maximal entwickelte Kraft des Muskels (L_{max}). Da das Herz physiologischerweise nahe der Vorlast-Reserve schlägt, dehnten wir die Muskeln nach 30 min Entdehnung von L_{88} auf L_{98} . Um die Effekte der supraphysiologischen Dehnung zu charakterisieren, wurden Muskeln auch auf L_{108} und L_{118} gedehnt.

Bei den auf physiologische Länge (L_{98}) gedehnten Muskeln kam es zum biphasischen Kraftanstieg. Entsprechend dem Frank-Starling-Straub-Mechanismus kam es zum 1.

schnellen Kraftzuwachs (1. inotrope Phase). Daraufhin folgte eine 2. verzögerte Kraftzunahme, die 2. inotrope Phase oder SFR (Calaghan und White 2004; von Lewinski et al. 2004; von Lewinski et al. 2003), die über ca. 10-15 min erhalten blieb. Nach der 2. inotropen Phase mit einem maximalen Kraftanstieg auf 71 ± 2 % kam es zu einem leichten Kraftabfall, der sich bei 50 % 75 min nach Dehnung stabilisierte.

Bei der supraphysiologischen Dehnung zeigte die entwickelte Kraft einen anderen Verlauf. Die Trabekel wurden auf 108 % der Länge gedehnt, bei der der Trabekel die maximale Kraft entwickelt hat. Im sphärischen Modell entspricht eine 8%-ige Vergrößerung des Umfangs einer ca. 2,5 % Vergrößerung des Durchmessers und einer ca. 25 % Vergrößerung des Volumens. Diese Parameter korrelieren gut mit den Dimensionen bei akuter Rechtbelastung. Nach dieser supraphysiologischen Dehnung zeigten ca. 26 % der Trabekel keine adäquate Reaktion auf elektrische Stimulation. Bei Dehnung auf physiologische Länge (L98) wurde dieser dehnungsinduzierte Effekt nicht beobachtet. Dieses verdeutlicht die pathologische Bedeutung dieser akuten supraphysiologischen Dehnung. In den weiterhin stimulierbaren Trabekeln zeigte sich eine Erhöhung der entwickelten Kraft auf das über 1,5-fache nach 2 min. Anschließend aber zeigte sich ein progressiver Kraftverlust bis zu Werten, die unter der entwickelten Kraft bei L_{max} lagen. Bei Dehnung auf L118 (dies entspricht im sphärischen Modell einer Volumenzunahme um 64 %) zeigte sich ein ähnliches Muster. Die entwickelte Kraft stieg auf das 3-fache. Der maximale Kraftanstieg war also deutlich höher als bei Dehnung auf L98 und L108. Auch hier kam es nach dem dehnungsinduzierten Kraftanstieg zu einem progressiven Kraftverlust. Die entwickelte Kraft stabilisierte sich im Verlauf auf ca. 65 %. Anders als bei der physiologischen Dehnung auf L98 stieg bei supraphysiologischer Dehnung auf L108 und L118 die diastolische Kraft stark an, und einige Muskeln verloren die Stimulierbarkeit; dies unterstreicht den pathologischen Charakter der Dehnung auf L108 und L118.

IV.2. Die Rolle von ROS und der p38-MAPK beim dehnungsinduzierten Kraftabfall

IV.2.1. Dehnungsinduzierte Aktivierung der p38-MAPK

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die dehnungsinduzierte myokardiale Kraftentwicklung negativ durch die Aktivierung der p38-MAPK beeinflusst wird.

Die p38-MAPK wird durch extrazellulären Stress aktiviert. In isolierten Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der p38-MAPK einen negativen Effekt hervorruft (Folden et al. 2003; Liao et al. 2002; Palomeque et al. 2006). Die p38-MAPK wurde in diesen Studien nicht durch Dehnung aktiviert.

Diese Arbeit untersuchte durch Hemmung der endogen aktivierten p38-MAPK durch den Inhibitor SB 203580, ob der oben beschriebene dehnungsinduzierte Kraftabfall durch die p38-MAPK vermittelt wird.

Nach Inhibition der p38-MAPK bei physiologischer Dehnung konnte eine progressive Krafterhöhung beobachtet werden. Auch bei supraphysiologischer Dehnung hatte die Hemmung der p38-MAPK einen positiv inotropen Effekt. Die entwickelte Kraft war nach Dehnung höher und der progressive Kraftabfall wurde signifikant abgeschwächt. Das Kraftniveau war hierbei im gesamten Beobachtungsintervall höher als bei optimaler Länge. Daraus lässt sich schließen, dass der dehnungsinduzierte Kraftabfall nicht durch Überdehnung der strukturellen Einheiten oder durch metabolische Unterversorgung hervorgerufen wird, sondern durch Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade, in der die p38-MAPK eine zentrale Rolle einnimmt. Insgesamt kann gefolgert werden, dass die p38-MAPK bereits bei physiologischer Dehnung aktiviert wird und den dehnungsinduzierten Kraftanstieg begrenzt. Dieser Effekt ist unter Bedingungen einer akuten pathologischen Dehnung potenziert.

Der negativ inotrope Effekt wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. Eine eindeutige Aussage zum Mechanismus kann zurzeit nicht getroffen werden. In Arbeiten mit isolierten Kardiomyozyten ging der negativ inotrope Effekt der p38-MAPK nicht mit einer Änderung des Kalzium-Transienten einher (Liao et al. 2002; Palomeque et al. 2006). Die Autoren schlussfolgerten, dass der negativ inotrope Effekt nicht durch eine Änderung des kardiomyozytären Kalziumgehaltes, sondern auf Ebene der Myofilamente durch Herabsetzung der Kalzium-Sensitivität oder eine verminderte Kalzium-aktivierte

Kraftentwicklung der Myofilamente hervorgerufen wurde. Kürzlich wurde demonstriert, dass der positiv inotrope Effekt von Endothelin-1 am isolierten Rattenherzen durch Hemmung der p38-MAPK verstärkt wurde. Dieses war jedoch mit einer verminderten Phosphorylierung von Phospholamban assoziiert, was auf eine verminderte Hemmung von SERCA und folglich einer gesteigerten Kalzium-Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum hindeutet (Szokodi et al. 2008). Die Gruppe von Solaro wiederum beschrieb bei p38-MAPK-Knockout-Mäusen eine gesteigerte durch Kalzium rekrutierbare Kraftentwicklung der Myofilamente (Vahebi et al. 2007). Ob jedoch diese Befunde bei chronischer Minderung der p38-MAPK-Aktivität im Knockout-Tier auf die hier angewandte akute Hemmung übertragbar sind, bleibt unklar.

Die Frage nach dem Mechanismus des p38-MAPK-induzierten Kraftverlustes kann in dieser Arbeit anhand der Daten ebenfalls nicht klar beantwortet werden. Die Analyse der Kontraktionskinetik zeigte im Vergleich zu unbehandelten Muskelstreifen eine Zunahme der Kontraktionsdauer nach Hemmung der p38-MAPK bei physiologischer, aber nicht mehr bei supraphysiologischer Dehnung, während die Relaxationsdauer unabhängig vom Grad der Dehnung nicht signifikant verändert war. Ebenso war der Anstieg der diastolischen Kraft nach Dehnung durch SB20350 nicht verändert. Die verlängerte oder unveränderte Kontraktionsdauer in den hier geschilderten Experimenten spricht gegen eine Erhöhung des Kalziumtransienten, da dies mit einer verkürzten Kontraktion einhergeht. Läge der Effekt der p38-MAPK-Hemmung in einer Erhöhung der myofilamentären Kalziumsensitivität, so wäre eine Verlängerung der Relaxationsdauer und eine Erhöhung der diastolischen Kraft zu erwarten, was in dieser Arbeit nicht der Fall gewesen ist. Allerdings ist auch denkbar, dass wie beim Kalzium-Sensitizer Levosimendan eine Erhöhung der Kalziumsensitivität nur bei hohen systolischen Kalziumkonzentrationen vorliegt, hierüber existieren in der Literatur zur p38-MAPK bislang keine Daten. Insgesamt ist noch unklar über welche Mechanismen die p38-MAPK auf die kardiomyozytäre Kraftentwicklung einwirkt.

IV.2.2. Funktionelle Effekte von ROS

Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen. Arbeiten zeigen eine Beteiligung von ROS bei Hypertrophie (Higuchi et al. 2002; Li et al. 2002; Pimentel et al. 2001) und Ischämie/Reperfusion (Clerk et al. 1998b; Jennings und Reimer 1991; Solaini und Harris 2005). In isolierten Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass Malondialdehyd, ein terminales Produkt der Lipid-Peroxidation, negativ inotrop über die Aktivierung der p38-MAPK wirkt (Folden et al. 2003).

Diese Arbeit untersuchte, ob die Bildung von Sauerstoffradikalen an der Signalkaskade der dehnungsinduzierten progressiven kardialen Dysfunktion beteiligt ist. Dafür wurden Kaninchentrabekel mit dem Sauerstoffradikalfänger Tiron behandelt und akut auf 98 % oder 108 % der Länge gedehnt, bei der der Muskel die maximale Kraft entwickelt hat (L_{max}). Die Hemmung der Sauerstoffradikale konnte die dehnungsinduzierte Dysfunktion signifikant abschwächen (Tiron 100 μ M) bzw. konnte den dehnungsinduzierten Kraftverfall vollständig verhindern (Tiron 1 mM), während die initiale Kraftentwicklung nicht durch Tiron beeinflusst wurde.

Es konnte somit gezeigt werden, dass Sauerstoffradikale in der kardialen dehnungsinduzierten Dysfunktion eine relevante Rolle spielen. Da die Hemmung der p38-MAPK, nicht aber Tiron die maximale Kraftentwicklung steigerte, kann gemutmaßt werden, dass bei Dehnung die Freisetzung von Sauerstoffradikalen später als die Aktivierung der p38-MAPK erfolgt, und dass die p38-MAPK möglicherweise die Freisetzung von Sauerstoffradikalen induziert. Insgesamt zeigen die Experimente mit den strukturell völlig unverwandten Substanzen SB 203580 und Tiron klar und konsistent, dass v.a. supraphysiologische Dehnung im Zeitverlauf eine negativ inotrope Signalkaskade aktiviert, bei der die p38-MAPK und Sauerstoffradikale eine zentrale Rolle spielen.

IV.3. Pathophysiologische Relevanz

Es ist umstritten, ob die p38-MAPK-Aktivität bei Herzinsuffizienz verändert ist und ob die p38-MAPK an der Pathogenese der Herzinsuffizienz wesentlich beteiligt ist. Einige Arbeiten zeigen, dass die p38-MAPK-Aktivität bei Herzinsuffizienz erhöht ist bzw., dass eine Hemmung der p38-MAPK die myokardiale Funktion verbessert. Die Arbeitsgruppe von Schulz konnte zeigen, dass die p38-MAPK-Aktivität bei der linksventrikulären Dilatation in Kaninchen mit Schrittmacher-induzierter Herzinsuffizienz erhöht ist (Schulz et al. 2003). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Hemmung der p38-MAPK an Herzen nach Ischämie/Reperfusion die myokardiale Funktion verbessert (Cain et al. 1999; Ma et al. 1999). Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass das myokardiale Remodeling nach Myokardinfarkt durch die Hemmung der p38-MAPK signifikant verringert werden kann (Yin et al. 2008).

Arbeiten mit humanen Biopsien zeigen unterschiedliche Ergebnisse. In humanen Biopsien aus terminal-insuffizienten Herzen wurde sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Aktivität festgestellt, möglicherweise bestimmt durch die Unterschiede bei ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie (Cook et al. 1999; Flesch et al. 2001; Haq et al. 2001; Lemke et al. 2001; Takeishi et al. 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen relevanten negativ inotropen Effekt der p38-MAPK bei akuter physiologischer und supraphysiologischer Dehnung. Die Aktivierung der p38-MAPK könnte, möglicherweise durch Sauerstoffradikale, ein Schlüsselereignis beim akuten und chronischen Herzversagen sein.

Klinisch entspricht unserem Versuchsaufbau das Szenario einer massiven Lungenembolie. Eine akute Verlegung der pulmonalen Strombahn führt durch eine plötzliche Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast zu Dilatation und Dysfunktion des dünnwandigen rechten Ventrikels, welches wiederum ein wichtiger Prädiktor der Mortalität bei einer Lungenembolie ist (Konstantinides 2005). Echokardiographisch findet man dabei eine rechtsventrikuläre Dilatation, Hypokinese der freien Wand, eine Ausweitung des Cavums nach links und paradoxe Septumbewegungen (Goldhaber 2004). Das Rechtsherzversagen wird im Allgemeinen mit einer rechtsventrikulären Myokardischämie infolge einer erhöhten Wandspannung und bei systemischer Hypotonie vermindertem koronarem Perfusionsdruck erklärt. Die vorliegenden Daten deuten daraufhin, dass die

akute Dehnung des rechten Ventrikels per se über eine Aktivierung der p38-MAPK ein Rechtsherzversagen befördert. Neben den akuten Effekten könnte die p38-MAPK möglicherweise auch längerfristig maladaptive Effekte induzieren, die über die Hypertrophie in die Herzinsuffizienz führen. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung der p38-MAPK das myokardiale Remodeling und die linksventrikuläre Funktion bei genetisch determinierter Kardiomyopathie verbessert (Kyoj et al. 2006).

Die pharmakologische Hemmung der p38-MAPK könnte somit ein therapeutisches Ziel bei der Therapie des Rechtsherzversagens bei akuter Lungenembolie oder bei der chronischen Linksherzinsuffizienz sein.

V. Zusammenfassung

Dehnung ist eine wichtige Determinante der Myokardfunktion. Die akute rechtsventrikuläre Dehnung bzw. Dilatation sind wichtige Prädiktoren des rechtsventrikulären Herzversagens bei massiver Lungenembolie. Innerhalb von Minuten aktiviert myokardiale Dehnung die p38-MAP-Kinase, welche in isolierten Kardiomyozyten einen negativ inotropen Effekt ohne Änderung des Kalziumtransienten ausübt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher überprüft, ob die Hemmung der p38-MAP-Kinase die kontraktile Funktion in akut gedehnten rechtsventrikulären Herzmuskelstreifen beeinflusst. Es ist bekannt, dass die p38-MAPK durch Sauerstoffradikale aktiviert wird. Wir prüften deshalb zusätzlich, ob Zugabe eines Antioxidans bei akuter Dehnung einen positiv inotropen Effekt hat.

Es wurden dafür isolierte rechtsventrikuläre Trabekel aus Kaninchenherzen in Tyrodelösung bei 37 °C und 2,5 mM Kalzium mit 1 Hz stimuliert und in ungedehntem Zustand für 30 min äquilibriert. Nachfolgend wurden die Trabekel graduell bis zum Erreichen der Länge, bei der sie ihre maximale Kraftentwicklung zeigten (L_{max}), gedehnt. Anschließend wurden sie für 30 min auf 88 % dieser Länge entdehnt. Der p38-MAPK-Hemmer SB 203580 (10 μ M) oder das Antioxidans Tiron (1 mM) wurden 5 min nach Entdehnung hinzugegeben. Zu den Kontrollstreifen wurde das Lösungsmittel DMSO hinzugegeben. Die rechtsventrikulären Trabekel wurden dann akut auf 98 % der Länge von L_{max} (L98) oder 108 % der Länge bei L_{max} (L108), also submaximale und supramaximale Länge gedehnt. Die isometrischen Kontraktionen wurden nun für 3 h gemessen.

Die Dehnung auf L98 erhöhte die entwickelte Kraft. Dieser dehnungsinduzierte Anstieg war bei Behandlung mit SB 203580 ausgeprägter. Dehnung auf L108 erhöhte die entwickelte Kraft kurzzeitig auf fast das Doppelte des Wertes bei L_{max} , dann folgte hingegen ein progressiver Abfall der entwickelten Kraft über das verbleibende Beobachtungsintervall. SB 203580 verminderte signifikant diesen Funktionsverlust. Auch Vorbehandlung mit einem weiteren p38-MAPK-Hemmer (SB 202190) oder dem Antioxidans Tiron zeigten ähnliche Ergebnisse.

Somit zeigt die vorliegende Arbeit, dass akute physiologische und supraphysiologische Dehnung im Zeitverlauf negativ inotrope Signalkaskaden aktivieren, in denen die p38-MAPK und Sauerstoffradikale eine zentrale Rolle spielen. Die Aktivierung der p38-MAPK könnte ein entscheidender Schritt beim akuten druck -und dehnungsinduzierten Rechtsherzversagen sein.

VI. Literaturverzeichnis

- Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y (1997): "Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats." *J Clin Invest* **100**(7): 1813-1821.
- Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I (2002): "Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation." *Hypertension* **39**(2): 233-238.
- Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998): "Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy." *Science* **280**(5363): 574-577.
- Allen DG, Kurihara S (1982): "The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle." *J Physiol* **327**: 79-94.
- Alvarez BV, Perez NG, Ennis IL, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE (1999): "Mechanisms underlying the increase in force and Ca(2+) transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect." *Circ Res* **85**(8): 716-722.
- Bellahcene M, Jaquet S, Cao XB, Tanno M, Haworth RS, Layland J, Kabir AM, Gaestel M, Davis RJ, Flavell RA, et al. (2006): "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the early cardiodepressant action of tumor necrosis factor." *J Am Coll Cardiol* **48**(3): 545-555.
- Blanchard EM, Smith GL, Allen DG, Alpert NR (1990): "The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles." *Pflugers Arch* **416**(1-2): 219-221.
- Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH (1996): "Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion." *Circ Res* **79**(2): 162-173.
- Cain BS, Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, Shames BD, Banerjee A, Harken AH (1999): "p38 MAPK inhibition decreases TNF-alpha production and enhances postischemic human myocardial function." *J Surg Res* **83**(1): 7-12.
- Calaghan S, White E (2004): "Activation of Na⁺-H⁺ exchange and stretch-activated channels underlies the slow inotropic response to stretch in myocytes and muscle from the rat heart." *J Physiol* **559**(Pt 1): 205-214.
- Chen Y, Rajashree R, Liu Q, Hofmann P (2003): "Acute p38 MAPK activation decreases force development in ventricular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**(6): H2578-2586.
- Clerk A, Michael A, Sugden PH (1998a): "Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes." *Biochem J* **333** (Pt 3): 581-589.
- Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH (1998b): "Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses." *J Biol Chem* **273**(13): 7228-7234.

- Cook SA, Sugden PH Clerk A (1999): "Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease." *J Mol Cell Cardiol* 31(8): 1429-1434.
- Fagbemi OS, Brack K, Golar S, Crisp D Economides A (2001): "Electrophysiological and biochemical changes in rabbit hearts stored at 4 degrees C for 6 or 24 h." *Clin Sci (Lond)* 101(4): 367-376.
- Flesch M, Margulies KB, Mochmann HC, Engel D, Sivasubramanian N Mann DL (2001): "Differential regulation of mitogen-activated protein kinases in the failing human heart in response to mechanical unloading." *Circulation* 104(19): 2273-2276.
- Folden DV, Gupta A, Sharma AC, Li SY, Saari JT Ren J (2003): "Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism." *Br J Pharmacol* 139(7): 1310-1316.
- Fryer MW, Gage PW, Neering IR, Dulhunty AF Lamb GD (1988): "Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase." *Pflugers Arch* 411(1): 76-79.
- Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A Cohen P (1997): "Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases." *FEBS Lett* 409(1): 57-62.
- Goldhaber SZ (2004): "Pulmonary embolism." *Lancet* 363(9417): 1295-1305.
- Gudi SR, Lee AA, Clark CB Frangos JA (1998): "Equibiaxial strain and strain rate stimulate early activation of G proteins in cardiac fibroblasts." *Am J Physiol* 274(5 Pt 1): C1424-1428.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B Davis RJ (1996): "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." *Embo J* 15(11): 2760-2770.
- Gwathmey JK, Hajjar RJ Solaro RJ (1991): "Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium." *Circ Res* 69(5): 1280-1292.
- Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, et al. (2001): "Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure." *Circulation* 103(5): 670-677.
- Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann HP, Astheimer K, Pieske B Just H (1994): "Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy." *Eur Heart J* 15(2): 164-170.
- Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, Hirotani S, Nakayama H, Yamaguchi O, Matsumura Y, Ueno H, Tada M Hori M (2002): "Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* 34(2): 233-240.
- Hu H Sachs F (1997): "Stretch-activated ion channels in the heart." *J Mol Cell Cardiol* 29(6): 1511-1523.
- Jennings RB Reimer KA (1991): "The cell biology of acute myocardial ischemia." *Annu Rev Med* 42: 225-246.
- Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S Han J (1996): "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." *J Biol Chem* 271(30): 17920-17926.
- Kan H, Birkle D, Jain AC, Failinger C, Xie S Finkel MS (2005): "p38 MAP kinase inhibitor reverses stress-induced cardiac myocyte dysfunction." *J Appl Physiol* 98(1): 77-82.

- Konstantinides S (2005): "Pulmonary embolism: impact of right ventricular dysfunction." *Curr Opin Cardiol* 20(6): 496-501.
- Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC Young PR (1997): "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." *Biochem Biophys Res Commun* 235(3): 533-538.
- Kyoi S, Otani H, Matsuhisa S, Akita Y, Tatsumi K, Enoki C, Fujiwara H, Imamura H, Kamihata H Iwasaka T (2006): "Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster." *Cardiovasc Res* 69(4): 888-898.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al. (1994): "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature* 372(6508): 739-746.
- Lemke LE, Bloem LJ, Fouts R, Esterman M, Sandusky G Vlahos CJ (2001): "Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK alpha is the predominant isoform expressed in human heart." *J Mol Cell Cardiol* 33(8): 1527-1540.
- Lewis JM Schwartz MA (1995): "Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin beta 1 cytoplasmic domain mutants." *Mol Biol Cell* 6(2): 151-160.
- Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M Shah AM (2002): "Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure." *Hypertension* 40(4): 477-484.
- Li M, Georgakopoulos D, Lu G, Hester L, Kass DA, Hasday J Wang Y (2005): "p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart." *Circulation* 111(19): 2494-2502.
- Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ Han J (1996): "The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases." *Biochem Biophys Res Commun* 228(2): 334-340.
- Liao P, Wang SQ, Wang S, Zheng M, Zheng M, Zhang SJ, Cheng H, Wang Y Xiao RP (2002): "p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes." *Circ Res* 90(2): 190-196.
- Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, et al. (2001): "The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(21): 12283-12288.
- Löffler G Petrides P: *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage; Springer Verlag. Heidelberg 2003.
- Luers C, Fialka F, Elgner A, Zhu D, Kockskamper J, von Lewinski D Pieske B (2005): "Stretch-dependent modulation of [Na⁺]_i, [Ca²⁺]_i, and pHi in rabbit myocardium--a mechanism for the slow force response." *Cardiovasc Res* 68(3): 454-463.
- Ma XL, Kumar S, Gao F, Loudon CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang C, Lee JC, Feuerstein GZ Yue TL (1999): "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion." *Circulation* 99(13): 1685-1691.
- Mertens S, Craxton M Goedert M (1996): "SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases." *FEBS Lett* 383(3): 273-276.
- Mulieri LA Alpert NR (1984): "Differential effects of 2,3-Butanedione Monoxime (BDM) on activation and contraction." *Biophys J* 45: 47a.
- Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM Alpert NR (1989): "Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime." *Circ Res* 65(5): 1441-1449.
- Mulieri LA, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen PD Alpert NR (1992): "Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure." *Circulation* 85(5): 1743-1750.

- Palomeque J, Sapia L, Hajjar RJ, Mattiazzi A, Vila Petroff M (2006): "Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(1): H96-106.
- Parmley WW, Chuck L (1973): "Length-dependent changes in myocardial contractile state." *Am J Physiol* 224(5): 1195-1199.
- Perreault CL, Mulieri LA, Alpert NR, Ransil BJ, Allen PD, Morgan JP (1992): "Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium." *Am J Physiol* 263(2 Pt 2): H503-510.
- Phillips RM, Altschuld RA (1996): "2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM) induces calcium release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum." *Biochem Biophys Res Commun* 229(1): 154-157.
- Pieske B, Schlotthauer K, Schattmann J, Beyersdorf F, Martin J, Just H, Hasenfuss G (1997): "Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent regulation of contractility in isolated human myocardium." *Basic Res Cardiol* 92 Suppl 1: 75-86.
- Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): "Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy." *Circulation* 92(5): 1169-1178.
- Pimentel DR, Amin JK, Xiao L, Miller T, Viereck J, Oliver-Krasinski J, Baliga R, Wang J, Siwik DA, Singh K, et al. (2001): "Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes." *Circ Res* 89(5): 453-460.
- Rosen LB, Ginty DD, Greenberg ME (1995): "Calcium regulation of gene expression." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30: 225-253.
- Sadoshima J, Izumo S (1993): "Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism." *Embo J* 12(4): 1681-1692.
- Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Konietzka I, Rauen U, Heusch G (2003): "Stress kinase phosphorylation is increased in pacing-induced heart failure in rabbits." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(5): H2084-2090.
- Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y (1997): "Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 239(3): 840-844.
- Solaini G, Harris DA (2005): "Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion." *Biochem J* 390(Pt 2): 377-394.
- Sugden PH, Clerk A (1998): "'Stress-responsive' mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium." *Circ Res* 83(4): 345-352.
- Szokodi I, Kerkela R, Kubin AM, Sarman B, Pikkarainen S, Konyi A, Horvath IG, Papp L, Toth M, Skoumal R, et al. (2008): "Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility." *Circulation* 118(16): 1651-1658.
- Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Che W, Lee JD, Kawakatsu H, Hoit BD, Berk BC, Walsh RA (2002): "Activation of mitogen-activated protein kinases and p90 ribosomal S6 kinase in failing human hearts with dilated cardiomyopathy." *Cardiovasc Res* 53(1): 131-137.
- Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W, Lee JD, Kawakatsu H, Lawrence EG, Hoit BD, Berk BC, et al. (2001): "Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy

-
- and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch." *J Mol Cell Cardiol* 33(9): 1637-1648.
- Vahebi S, Ota A, Li M, Warren CM, de Tombe PP, Wang Y Solaro RJ (2007): "p38-MAPK induced dephosphorylation of alpha-tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity." *Circ Res* 100(3): 408-415.
- von Lewinski D, Stumme B, Fialka F, Luers C Pieske B (2004): "Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium." *Circ Res* 94(10): 1392-1398.
- von Lewinski D, Stumme B, Maier LS, Luers C, Bers DM Pieske B (2003): "Stretch-dependent slow force response in isolated rabbit myocardium is Na⁺ dependent." *Cardiovasc Res* 57(4): 1052-1061.
- Wang M, Tsai BM, Turrentine MW, Mahomed Y, Brown JW Meldrum DR (2005): "p38 mitogen activated protein kinase mediates both death signaling and functional depression in the heart." *Ann Thorac Surg* 80(6): 2235-2241.
- Wang Y (2007): "Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases." *Circulation* 116(12): 1413-1423.
- Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Jr., Brown JH, Han J Chien KR (1998): "Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family." *J Biol Chem* 273(4): 2161-2168.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB Johnson GL (1999): "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* 79(1): 143-180.
- Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, Maemura K, Kaida T, Komuro I, Tamemoto H, Kadowaki T, Nagai R Yazaki Y (1993): "Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes." *J Biol Chem* 268(16): 12069-12076.
- Yin H, Zhang J, Lin H, Wang R, Qiao Y, Wang B Liu F (2008): "p38 mitogen-activated protein kinase inhibition decreases TNFalpha secretion and protects against left ventricular remodeling in rats with myocardial ischemia." *Inflammation* 31(2): 65-73.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Pieske für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das Überlassen des Dissertationsthemas bedanken.

Herrn Dr. Post danke ich für die Betreuung der Arbeit. Seine Leidenschaft gegenüber der Wissenschaft war durch den gesamten Verlauf der wissenschaftlichen Tätigkeit sehr motivierend.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinen "Mitdoktoranden" Mounir Khafaga, Meera Flaßkühler, Shila Pazahr und Danan Zhu, die mir an der Anlage mit Rat und Tat zur Seite standen und immer aufmunternde Worte nach langen Stunden im Labor für mich übrig hatten. Die Atmosphäre im Labor habe ich als sehr freundschaftlich empfunden.

Lebenslauf

Am 23.01.1982 wurde ich als Tochter von Thi-Thu-Nga-Duong-Nguyen und Dr. med. Xuan-Trang Nguyen in Göttingen geboren.

Im Jahr 1988 wurde ich in Göttingen eingeschult. Im Anschluss besuchte ich die Orientierungsstufe und das Gymnasium in Göttingen. Die 11. Klasse besuchte ich im Rahmen eines Schüler-Austausches in Toronto, Kanada. Im Jahr 2001 legte ich meine Abiturprüfung ab.

Im Wintersemester 2001/2002 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Ich famulierte in den Fächern Allgemeinchirurgie, Gynäkologie, Psychiatrie und Innere Medizin. Während meines Praktischen Jahres war ich an der Universitätsklinik Göttingen in der Nephrologie/Rheumatologie, der Allgemeinchirurgie und der Pädiatrie tätig. Ein halbes Tertial absolvierte ich in der Kardiologie des Royal Prince Alfred Krankenhauses in Sydney, Australien. Im November 2007 schloss ich mein Studium mit der 2. Ärztlichen Prüfung ab.

Seit Januar 2008 bin ich als Assistenzärztin in der Abteilung für Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Th. Paul tätig.