

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Detlev Drenckhahn

**Charakterisierung der kardialen Funktion
des Stressproteins α B-Crystallin
am isolierten Papillarmuskel der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Andreas Redel
aus München

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Prof. Dr. D. Drenckhahn

Koreferent: Prof. Dr. N. Golenhofen

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 08./09.02.2005

Der Promovend ist Arzt.

*Gehe auf Station und versuche,
deine Patienten besser zu machen.*

*Gehe ins Labor und versuche,
die Medizin besser zu machen!*

B. Allolio

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Physiologische Mechanismen des Herzens zur Regulation des Herz-Zeit-Volumens	1
1.2	Die Ca ²⁺ -Homöostase im Kardiomyozyten und deren Auswirkungen auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	2
1.2.1	Molekulare Mechanismen der Muskelkontraktion	2
1.2.2	Molekulare Mechanismen der Kraft-Frequenz-Beziehung	4
1.3	Reaktion des Herzmuskels auf Ischämie	6
1.3.1	Molekulare Vorgänge im Kardiomyozyten während Ischämie	7
1.3.2	Ischämische Präkonditionierung	8
1.4	Hitzeschockproteine	10
1.5	Das Stressprotein α B-Crystallin	11
1.5.1	Eigenschaften von α B-Crystallin	12
1.5.2	α B-Crystallin im Herzen	13
1.6	Aufbau eines Versuchssystems zur Charakterisierung der Myokardfunktion der Maus	16
1.7	Fragestellung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Versuchsaufbau	18
2.1.1	Versuchstiere	18
2.1.2	Nährlösungen	18
2.1.3	Versuchsordnung	19
2.1.4	Anfertigung der Muskelpräparate	20
2.2	Messungen zur Kraft-Frequenz-Beziehung	21
2.2.1	Adaptationsphase und „KFB-Protokoll“	21
2.2.2	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der Kraft-Frequenz-Beziehung	22
2.2.3	Temperaturabhängigkeit der Kraft-Frequenz-Beziehung	22
2.2.4	Einfluss des Kontraktionstyps (Isometrie/Auxotonie)	22
2.3	Messungen zur simulierten Ischämie und Reperfusion	23
2.3.1	Adaptationsphase	23
2.3.2	Simulierte Ischämie	23
2.3.3	Reperusionsphase	23
2.4	Auswertung und Statistik	24

3	ERGEBNISSE	25
3.1	Charakterisierung der Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln der Maus in Abhängigkeit von extrazellulärer Ca²⁺-Konzentration und Temperatur unter isometrischen und auxotonen Versuchsbedingungen	25
3.1.1	Aufzeichnung einer „KFB-Kurve“	25
3.1.2	Einfluss der Ca ²⁺ -Konzentration auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	26
3.1.3	Einfluss auxotoner Kontraktionsbedingungen auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	27
3.1.4	Einfluss der Temperatur auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	28
3.1.5	Kraftanstiegsgeschwindigkeit und Relaxationszeit in Abhängigkeit unterschiedlicher Versuchsbedingungen	29
3.2	Charakterisierung der Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln von αB-Crystallin -/Mäusen unter simulierter Ischämie und Reperfusion	30
3.2.1	Charakterisierung der Kontraktilität der Papillarmuskeln unter Standardbedingungen im Organbad	30
3.2.2	Charakterisierung der Kontraktilität der Papillarmuskeln unter simulierter Ischämie und Reperfusion	31
4	DISKUSSION	35
5	ZUSAMMENFASSUNG	43
6	LITERATURVERZEICHNIS	45

Abkürzungsverzeichnis

$\alpha\text{B}^{-/-}$	αB -Crystallin gendeletiert
Ca^{2+}	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]$	Calcium-Konzentration
$F_{1\text{Hz}}$	Zuckungskraft bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz
$F_{4\text{Hz}}$	Zuckungskraft bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz
F_k	Restkontraktur in der Reperfusionsphase
$F_{k,\text{max}}$	maximal entwickelte Kontraktur
F_{max}	Maximalkraft (Zuckungskraft nach einer Stimulationspause von 1 min)
F_t	<i>engl.</i> twitch force. Zuckungskraft, Kraftamplitude einer Muskelzuckung
Hsp	Hitzeschockprotein, synonym Stressprotein
KFB	Kraft-Frequenz-Beziehung
R_{50}	halbmaximale Relaxationszeit
T_k	Zeit vom Beginn der simulierten Ischämie bis zum Beginn der Kontraktorentwicklung
T_{tp}	<i>engl.</i> time to peak tension. Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft (Maß für die Kraftanstiegsgeschwindigkeit)
wt	Wildtyp (Kontrolltiere)

1 Einleitung

1.1 Physiologische Mechanismen des Herzens zur Regulation des Herz-Zeit-Volumens

Das Herz ist als zentrales Organ des Herz-Kreislauf-Systems ständig wechselnden Anforderungen des Organismus ausgesetzt. Bei der Anpassung der Herzarbeit an den Bedarf des Körpers ist die Fähigkeit dieses Organs, das Herz-Zeit-Volumen zu variieren, von großer Bedeutung. Daneben muss das Herz in der Lage sein, auf unterschiedliche Arten von Stress, z. B. Azidose, Hypoxie oder Hyperthermie, adäquat zu reagieren.

Beim gesunden Erwachsenen beträgt das Herz-Zeit-Volumen in Ruhe ca. 5 l/min. Bei körperlicher Betätigung, bei Infekten, systemischer Vasodilatation, Anämie und unter anderen Stresszuständen kann es um mehr als das Dreifache gesteigert werden (KASS *et al.*, 1998, ALPERT *et al.*, 1998). Dies geschieht zum einen über eine neurovegetative Beeinflussung des Herzens, zum anderen verfügt auch das Herz selbst über bestimmte Anpassungsmechanismen, die vorwiegend auf den physiologischen Eigenschaften des Myokards beruhen.

Der neurovegetative Einfluss auf das Herz erfolgt über Sympathikus und Parasympathikus. Eine Erhöhung des Herz-Zeit-Volumens wird vom Sympathikus u. a. durch einen positiv chronotropen Effekt auf die Schrittmacherzentren des Herzens und einen positiv inotropen Effekt auf die Kardiomyozyten erreicht. Die Steigerung der Inotropie wird vermittelt über eine Verstärkung des transmembranären Ca^{2+} -Einstroms, aber auch durch eine Steigerung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente (Übersichten s. BERS, 2002).

Bestimmte physiologische Eigenschaften des Myokards zur Regulation des Herz-Zeit-Volumens wurden bereits vor über 100 Jahren beschrieben. OTTO FRANK und ERNEST STARLING veröffentlichten in den Jahren 1895 und 1897 ihre Beobachtung, dass isolierte Herzen auf eine Erhöhung des enddiastolischen Volumens mit einer Steigerung der systolischen Auswurfmenge reagieren (FRANK, 1895; STARLING, 1897). Der nach ihnen benannte Mechanismus wird heute dadurch erklärt, dass mit der Dehnung der Myofibrillen deren Ca^{2+} -Sensitivität steigt. Dafür scheint zum einen die mit zunehmender Längsdehnung steigende Anzahl der für den Querbrückenzyklus zur

Verfügung stehenden Aktin-Myosin-Bindungsstellen verantwortlich zu sein. Zum anderen nimmt bei Längsdehnung eines Sarkomers dessen Querdurchmesser ab, da das Filamentsystem ein isovolumentrisches System darstellt. Die Verminderung des Abstandes zwischen Aktin und Myosin erhöht deren Bindungsstärke (Übersichten s. FUCHS & SMITH, 2001; BERS, 2002).

Nicht nur die enddiastolische Vordehnung, sondern auch die Schlagfrequenz hat einen Einfluss auf die vom Myokard entwickelte Zuckungskraft. H. P. BOWDITCH veröffentlichte 1871 in seiner Arbeit „Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche Muskelfasern des Herzens zeigen“ seine Beobachtung, dass die von isolierten Muskelfasern des Froschherzens entwickelte Zuckungskraft mit zunehmender Stimulationsfrequenz ansteigt (BOWDITCH, 1871). Den Zusammenhang zwischen Zuckungskraft und Stimulationsfrequenz bezeichnet man als „Kraft-Frequenz-Beziehung“. Nimmt die Kraft mit steigender Frequenz zu, bezeichnet man die Kraft-Frequenz-Beziehung als positiv, nimmt sie ab, ist die Kraft-Frequenz-Beziehung negativ. Dem Zusammenhang zwischen Zuckungskraft und Stimulationsfrequenz liegen bestimmte Veränderungen transmembranärer Ionen-Ströme zugrunde, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

Das Herz ist also in der Lage, auf verschiedene Anforderungen des Organismus mit intrakardialen (Bowditch-Effekt, Frank-Starling-Mechanismus) und extrakardialen Mechanismen (v. a. Beeinflussung von Inotropie und Chronotropie durch das vegetative Nervensystem) zu reagieren.

1.2 Die Ca^{2+} -Homöostase im Kardiomyozyten und deren Auswirkungen auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

1.2.1 Molekulare Mechanismen der Muskelkontraktion

Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Kraft-Frequenz-Beziehung des Mäuseherzens. Die Kenntnis der molekularen Vorgänge während einer Muskelkontraktion ist für das Verständnis der Kraft-Frequenz-Beziehung von großer Bedeutung. Bei diesen Vorgängen spielt Ca^{2+} als „second messenger“ eine Schlüsselrolle, da es die mechanische Aktion der Myofibrillen an den elektrischen Reiz, das Aktionspotential, koppelt (Übersichten s. BERS, 2002; DRENCKHAHN, 2003; RÜEGG,

1997; ANTONI, 1997). BERS unterscheidet eine Phase der Aktivierung von einer Phase der Beendigung der Kontraktion.

Aktivierung der Myofibrillen

Die Kontraktion der Myofibrillen wird über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) vermittelt. Folgender Mechanismus liegt diesem Vorgang zugrunde:

Erreicht ein Aktionspotential das Sarkolemm, öffnet ein in den transversalen Tubuli lokalisierter spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (auch Dihydropyridin- oder DHP-Rezeptor genannt), so dass geringe Mengen Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen. In direkter Nachbarschaft zu den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen befinden sich in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) Ca^{2+} -abhängige Ca^{2+} -Kanäle, sog. Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Sie öffnen, wenn Ca^{2+} durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle einströmt. Dies bewirkt, dass große Mengen Ca^{2+} entlang dem Konzentrationsgefälle ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}: \sim 1 \text{ mM}$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zytoplasma}}: < 10^{-4} \text{ mM}$) aus dem SR ins Zytoplasma fließen. Die Stimulation des Ca^{2+} -Flux' vom SR ins Zytoplasma durch aus dem Extrazellulärraum einströmendes Ca^{2+} bezeichnet man als „ Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung“.

Das aus dem SR ins Zytoplasma einströmende Ca^{2+} wird auch „Aktivator- Ca^{2+} “ genannt. Es bewirkt durch Bindung an Troponin C des Troponinkomplexes eine Konformationsänderung des Tropomyosins. Dadurch werden am Aktinfilament Bindungsstellen für Myosin-Querbrücken frei, welche in einem Winkel von 90° an das Aktinfilament binden. Indem die Querbrücke am Übergang zwischen Kopf- und Halsabschnitt bis auf einen Winkel von 50° abknickt, werden Aktin- und Myosin-Filamente gegeneinander bewegt. Durch Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) lösen sich die Myosin-Querbrücken vom Aktin-Filament, nehmen unter ATP-Verbrauch wieder ihre ursprüngliche Stellung von 90° ein und binden erneut an Aktin. Dieser sog. Querbrückenzyklus wurde von RAYMENT und Mitarbeitern (1993) erstmalig als Grundlage der aktiven, krafterzeugenden Verkürzung der Sarkomere und damit des gesamten Muskels beschrieben.

Beendigung der Aktivierung

Um die Kontraktion der Myofibrillen zu beenden, muss zum einen der Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum und dem SR ins Zytoplasma gestoppt werden, zum anderen muss die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wieder auf diastolische Ausgangswerte gesenkt werden.

Der Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum wird durch die Inaktivierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals beendet. Diese Inaktivierung wird durch Aktivator- Ca^{2+} vermittelt. Für die Beendigung des Ca^{2+} -Influx aus dem SR werden zwei Mechanismen diskutiert: ein Absinken der Ca^{2+} -Konzentration im SR sowie eine Inaktivierung des RyR.

Am Absinken der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sind im wesentlichen vier Transportsysteme beteiligt: Die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2a), die Ca^{2+} ATP-abhängig aus dem Intrazellulärraum zurück in das SR pumpt, der sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), der Ca^{2+} im Antiport zu Na^+ von intrazellulär nach extrazellulär transportiert, die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase, die Ca^{2+} ATP-abhängig nach extrazellulär pumpt, und schließlich der mitochondriale Ca^{2+} -Uniport, der Ca^{2+} aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien transportiert. Den größten Anteil am Absinken der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration hat die SERCA 2a. Beim Kaninchen übernimmt sie 70 % des Ca^{2+} -Exports, der NCX ist zu 28 %, die beiden anderen Transportsysteme sind zu je 1 % am Ca^{2+} -Export beteiligt. Beim Menschen ist der Ca^{2+} -Transport zu ähnlichen Prozentsätzen auf die genannten Transportsysteme verteilt (BERS, 2002). Ein Großteil des intrazellulären Ca^{2+} geht also nicht an den Extrazellulärraum verloren, sondern wird ins SR zurückgepumpt und steht als Aktivator- Ca^{2+} für die nächste Kontraktion zur Verfügung.

Es wird deutlich, dass die Ca^{2+} -Homöostase des Kardiomyozyten durch ein komplexes Zusammenspiel von Ca^{2+} -Kanälen und -Transportsystemen reguliert wird.

1.2.2 Molekulare Mechanismen der Kraft-Frequenz-Beziehung

Die von einem menschlichen Myokardstreifen entwickelte Zuckungskraft nimmt zu, wenn die Stimulationsfrequenz von 60 auf ca. 180 min^{-1} gesteigert wird. In diesem Bereich ist die Kraft-Frequenz-Beziehung also positiv. Erhöht man die Frequenz weiter, nimmt die Zuckungskraft hingegen ab, die Kraft-Frequenz-Beziehung wird negativ (s.

ALPERT *et al.*, 1998). Dieser biphasische Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung hängt von zwei Einflussgrößen ab: von der Potenzierung der Zuckungskraft durch die Stimulationsfrequenz und der Wiederherstellung der Ca^{2+} -Homöostase in der Diastole, der sog. „Restitution“ (Übersicht s. CROTAZIER, 1998).

Frequenz-Potenzierung

PIOT und Mitarbeiter (1996) konnten zeigen, dass der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle mit steigender Stimulationsfrequenz zunimmt, da die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch Frequenzsteigerung potenzierbar sind. BRIXIUS und Mitarbeiter (1999) wiesen nach, dass die Zunahme der Zuckungskraft mit einer Zunahme der systolischen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einhergeht. Obwohl eine Zunahme der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration von diesen Autoren nicht nachgewiesen werden konnte, gehen sie davon aus, dass die Frequenzerhöhung nicht nur zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Influx, sondern auch zu einem verminderten diastolischen Abtransport von Ca^{2+} aus der Zelle führt, da die Diastole mit zunehmender Frequenz kürzer wird. Die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt auch zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im SR. Dadurch nimmt die Menge an Aktivator- Ca^{2+} , die für jede Kontraktion an den Myofilamenten zur Verfügung steht, zu, woraus letztlich eine erhöhte Zuckungskraft resultiert.

Restitution

Wie erwähnt, muss in der Diastole Ca^{2+} von den Myofibrillen in die zellulären Ca^{2+} -Speicher transportiert werden. Diesen Vorgang nennt man Restitution. Die dabei beteiligten Transportsysteme wurden in Kap. 1.2.1 beschrieben. Bei Frequenzen bis 180 min^{-1} kann das Aktivator- Ca^{2+} in der Diastole vollständig aus dem Zytoplasma in das SR zurücktransportiert werden. Dies führt zu einem positiven Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung. Bei Schlagfrequenzen über 180 min^{-1} ist die Diastole so kurz, dass die Ca^{2+} -Speicher nur ungenügend gefüllt werden, weil in der kurzen Zeit nicht genügend Ca^{2+} ins SR gepumpt werden kann und die beteiligten Ca^{2+} -Kanäle noch nicht vollständig reaktiviert sind (CROZATIER, 1998). Die zur Kontraktion bereitgestellte Menge an Aktivator- Ca^{2+} nimmt also ab, wenn die Stimulationsfrequenz einen bestimmten Wert überschritten hat. Dies führt zu einer negativen Kraft-Frequenz-

Beziehung, da der Effekt der ungenügenden Restitution den der weiter zunehmenden Frequenz-Potenzierung übersteigt.

Ein Beispiel für die klinische Bedeutung der Kraft-Frequenz-Beziehung ist die Herzinsuffizienz (Übersichten s. MEUSE *et al.*, 1992; ALPERT *et al.*, 1998; SCHILLINGER *et al.*, 1998). Wie bereits erwähnt, ist die Kraft-Frequenz-Beziehung des gesunden menschlichen Kardiomyozyten bis zu einer Schlagfrequenz von etwa 180 min^{-1} positiv, erst bei höheren Frequenzen wird sie negativ. Eine Frequenzsteigerung von beispielsweise 110 auf 160 min^{-1} ist also beim gesunden Herzen mit einer Erhöhung der Kontraktilität und damit mit einer Steigerung des Herz-Zeit-Volumens verbunden. Bei Herzinsuffizienz ist der Punkt, an dem die Kraft-Frequenz-Beziehung negativ wird, in Richtung niedrigerer Frequenzen verschoben. Veränderte Aktivitäten von SERCA 2a (SCHWINGER *et al.*, 1997) und NCX (CROZATIER, 1998) scheinen dafür mit verantwortlich zu sein. Im Bereich von 120 bis 180 min^{-1} ist die Kraft-Frequenz-Beziehung des insuffizienten Herzens also negativ, d. h. eine Frequenzsteigerung von 110 auf 160 min^{-1} ist beim insuffizienten Herzen nicht mit einer Kontraktilitätssteigerung verbunden, sie kann sogar zu einem Kontraktilitätsverlust führen. Der physiologische Mechanismus, das Herz-Zeit-Volumen durch Sympathikus-vermittelte Frequenzsteigerung zu erhöhen, funktioniert also beim insuffizienten Herzen nicht. Dies erklärt beispielsweise, warum eine pulmonale Stauung auf dem Boden einer dekompensierten Linksherzinsuffizienz durch Frequenzsteigerung nur schlecht rekompensiert werden kann.

1.3 Reaktion des Herzmuskels auf Ischämie

Eine Herzinsuffizienz resultiert nicht selten aus den Folgen ischämischer Ereignisse am Myokard, wo es aufgrund thrombembolischer Ereignisse in den Koronargefäßen zu einer akuten Minderdurchblutung des vom betroffenen Gefäß versorgten Myokardareales kommen kann. Kardiomyozyten verfügen jedoch über verschiedene endogene Mechanismen, mit denen sie sich vor schädigenden Einflüssen schützen. Bevor auf diese Mechanismen im Detail eingegangen wird, sei in den folgenden Absätzen die Pathophysiologie der ischämischen Zellschädigung kurz umrissen.

1.3.1 Molekulare Vorgänge im Kardiomyozyten während Ischämie

(Übersichten s. KLONER *et al.*, 1998) Wenn etwa 8 Sekunden nach Versiegen der arteriellen Blutzufuhr die intrazellulären Sauerstoffvorräte in Hämoglobin und Myoglobin aufgebraucht sind, kommt es zum Wechsel von aerober auf anaerobe Glycolyse, damit die Versorgung der Zelle mit energiereichen Phosphaten, also ATP, aufrecht erhalten werden kann. Die Kreatinin-Vorräte sind bereits 30 Sekunden nach Beginn der Ischämie erschöpft, so dass die anaerobe Glycolyse als einzige Möglichkeit zur Bereitstellung von Energieträgern verbleibt. Dabei entstehen Lactat und H^+ , die in der Zelle akkumulieren. Der intrazelluläre pH sinkt nach nur 10 Minuten Ischämie auf bis zu 5,8. Dies und der Leistungsabfall ATP-abhängiger membranständiger Ionen-Transporter führt zu einem Konzentrationsanstieg der osmotisch wirksamen Moleküle in der Zelle. Daraus resultiert ein Einstrom von H_2O in die Zelle und damit ein intrazelluläres und insbesondere mitochondriales Ödem. Aus Adenosindiphosphat (ADP), das nicht mehr zu ATP aufgebaut werden kann, entsteht schließlich Adenosin, das neben Substanzen wie Noradrenalin, Angiotensin, Bradykinin, Prostaglandinen und Opioiden die Zelle verlässt. Fehlendes ATP führt schließlich zu einer insuffizienten Ca^{2+} -Elimination. Es resultiert eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase i. S. einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung. Diese bewirkt eine Daueraktivierung der Aktin-Myosin-Interaktion und macht die regelrechte mechanische Reaktion auf das Aktionspotential unmöglich. Die ischämische Zellschädigung resultiert in einem Verlust der Kontraktilität und schließlich in der Ruptur der Zellmembran, für die u. a. die Desorganisation und Zerstörung des kardiomyozytären Zytoskeletts verantwortlich gemacht wird. Schon an dieser Stelle sei erwähnt, dass der Schutz zytoskelettaler Proteine unter Ischämie (neben anderen Mechanismen) einen wichtigen endogenen Schutzmechanismus der Zelle vor ischämischer Schädigung darstellt.

Falls das Gewebe durch die Ischämie aufgrund rechtzeitig wieder gewährleisteter Reperfusion nicht irreversibel geschädigt wurde, entwickelt sich innerhalb der ersten fünf Minuten der Reperfusion eine reaktive Hyperämie von bis zu 600 % der Durchblutung vor Ischämie. Durch Wiedereinsetzen der aeroben Glycolyse erholen sich der intrazelluläre pH, der ATP-Gehalt und die Kreatinin-Vorräte der Zelle innerhalb weniger Minuten. Allerdings scheint das vermehrte Sauerstoffangebot im Rahmen der Reperfusion mit einer massiven Produktion von reaktiven

Sauerstoffradikalen verbunden zu sein. Durch welche Mechanismen die Sauerstoffradikale entstehen, ist nicht vollständig geklärt. Möglicherweise sind bestimmte Enzyme (z. B. die Xanthin-Oxidase), autooxidative Prozesse, eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, ein Anstieg von Reduktionsäquivalenten und ein Integritätsverlust der Mitochondrien-Membran daran beteiligt (s. KLONER *et al.*, 1998). Reaktive Sauerstoffradikale führen neben einer Enzyminaktivierung und einer Lipid-Peroxidation zu einer weiteren Schädigung zytoskelettaler und kontraktile Proteine sowie der Zellmembran und der Membran des SR. Den Verlust der Kontraktilität, der aus der Zellschädigung im Rahmen der Reperfusion entsteht, bezeichnet man als „Reperfusionsschaden“.

1.3.2 Ischämische Präkonditionierung

Kurze, für die Zelle nicht letale ischämische Ereignisse bewirken eine Toleranzsteigerung gegenüber nachfolgenden, länger andauernden Stressereignissen. Dieses Phänomen wird als „ischämische Präkonditionierung“ bezeichnet. Dabei unterscheidet man eine sofortige von einer verzögerten Präkonditionierung.

Die klassische, sofortige Präkonditionierung wurde von MURRY und Mitarbeitern (1986) erstmals beschrieben. Er zeigte in seiner Arbeit, dass die Infarktgröße von Hundeherzen nach 40-minütiger Ischämie im Vergleich zu Kontrolltieren durch eine vorangehende jeweils 5-minütige Ischämie und Reperfusion um 25 % verkleinert werden kann. Offenbar schützen also kurzzeitige Ischämie-Perioden, die der eigentlichen Ischämie unmittelbar vorausgehen, das Myokard weitgehend vor Ischämie- und Reperfusionsschäden. Für die Zeit zwischen präkonditionierender und eigentlicher Ischämie ist in manchen Spezies ein Reperusionsintervall von einer Minute ausreichend (ALKHULAIFI *et al.*, 1993), üblicherweise wird in tierexperimentellen Untersuchungen jedoch ein Intervall von 5 – 30 min gewählt. Der zytoprotektive Effekt der klassischen Präkonditionierung hält allerdings nicht lange vor: Übersteigt das Zeitintervall zwischen präkonditionierender und nachfolgender Ischämie zwei Stunden, ist kein Schutz vor Infarzierung mehr nachweisbar (MURRY *et al.*, 1991; SACK *et al.*, 1993).

Nach etwa 24 Stunden bewirkt die präkonditionierende Ischämie erneut einen Schutz der Zelle vor Ischämie. Dieser Effekt der sog. „verzögerten Präkonditionierung“ wurde

von KUZUYA und Mitarbeitern (1993) erstmalig beschrieben. Der Schutzeffekt ist 48 bis 72 Stunden nach Präkonditionierung nachweisbar und hält bis zu 96 Stunden nach Präkonditionierung an (BAXTER *et al.*, 1997).

Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen von sofortiger und verzögerter Präkonditionierung sind noch nicht endgültig geklärt, jedoch sind zahlreiche an dem Prozess beteiligte Faktoren identifiziert.

Für die sofortige, klassische ischämische Präkonditionierung ist die Beteiligung mehrerer Signalwege gezeigt worden, die Endeffektoren bleiben jedoch unklar (Übersichten s. KLONER & JENNINGS, 2001a; KLONER & JENNINGS, 2001b; SCHULZ *et al.*, 2001; PAGLIARO *et al.*, 2001; EATON *et al.*, 2000). Die wichtigsten endogenen Auslöser der Präkonditionierung sind die im Rahmen ischämischer Perioden freigesetzten Moleküle Adenosin, Bradykinin, Opiate, Prostaglandine und freie Radikale. In der weiteren Signalkaskade scheinen die Proteinkinase C, Tyrosin-Kinasen, sowie Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) von Bedeutung zu sein. Als Endeffektoren, die letztendlich den Schutz vermitteln, werden u. a. eine Reduktion des Energiebedarfs und eine verbesserte Erhaltung der Integrität der Mitochondrien durch Öffnung der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle (Wirkmechanismus ungeklärt) diskutiert. Auch der Schutz zytoskelettaler Proteine durch „chaperones“ scheint am Schutzeffekt der sofortigen Präkonditionierung beteiligt zu sein. Chaperones sind Helferproteine, die die korrekte Faltung neu synthetisierter oder konformationsdefekter Proteine vermitteln (*engl.* chaperone = Anstandsdame, Begleitperson).

Die verzögerte Präkonditionierung wird zum Teil durch ähnliche Mechanismen vermittelt wie die klassische Präkonditionierung, unterscheidet sich aber in vielen Punkten deutlich (Übersichten s. BAXTER & FERDINANDY, 2001; BOLLI, 2000; PAGLIARO *et al.*, 2001). Wie bereits oben erwähnt, tritt der protektive Effekt erst nach etwa 24 Stunden auf und hält bis zu drei Tage an. Bei der verzögerten Form der Protektion ist die präkonditionierende Ischämie durch andere Stressereignisse, wie z. B. kurze Hyperthermie-Perioden, ersetzbar. Auslöser für die verzögerte Präkonditionierung sind, ähnlich wie bei der sofortigen Präkonditionierung, Adenosin und freie Radikale, aber auch Stickoxyd (NO). Bradykinin und Opiate scheinen beim verzögerten Effekt eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im weiteren Signalweg sind wie bei der sofortigen

Präkonditionierung die Protein-Kinase C, Tyrosin-Kinasen, sowie MAP-Kinasen beteiligt. Zusätzlich wird bei der verzögerten Protektion dem Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle zugesprochen (XUAN *et al.*, 1999). Als Endeffektoren, die den Schutz letztlich vermitteln, werden Zielproteine diskutiert, deren Synthese durch die Aktivierung der oben aufgeführten Signalkaskaden, wahrscheinlich vermittelt über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, induziert wird. Dabei ist es als unwahrscheinlich anzunehmen, dass ein einziges Protein für die Protektion verantwortlich ist. Eher ist von einer Vielzahl ineinander greifender Mechanismen auszugehen. Für mehrere Proteine bzw. Proteinfamilien ist eine Hochregulation parallel zum Zeitverlauf der verzögerten Protektion gezeigt worden, unter ihnen einige Enzyme (z. B. Cyclooxygenase 2 (COX 2), induzierbare NO-Synthase (iNOS) und mitochondriale ATP-abhängige K⁺-Kanäle) sowie die Gruppe der Hitzeschockproteine. Kardiomyozyten verfügen also über verschiedene endogene Mechanismen, mit denen sie sich vor ischämischer Schädigung schützen können. Zu diesen Mechanismen zählt die Expression von Hitzeschockproteinen, auf die im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.

1.4 Hitzeschockproteine

1962 beobachtete RITOSSA, dass die Exposition von Speicheldrüsenzellen aus *Drosophila*-Larven gegenüber erhöhten Temperaturen zum Auftreten neuer „Puffs“ (Aufreibungen im Chromosom, an denen DNA abgelesen wird) in den Riesenchromosomen dieser Zellen führt. Heute weiß man, dass diese „Puffs“ die transkriptionale Induktion spezifischer Gene repräsentieren, die eine Gruppe bestimmter Proteine codieren. Da RITOSSA die Expression dieser Proteine durch Temperaturerhöhung induzierte, bezeichnete man diese Proteingruppe zunächst als „Hitzeschockproteine“ (Hsp). Inzwischen ist bekannt, dass auch eine Reihe anderer Stressoren, z. B. Hypoxie, Ischämie, freie Radikale u. a., die Expression von Hitzeschockproteinen induzieren kann (Übersichten s. LATCHMAN, 2001). Man bezeichnet Hitzeschockproteine deshalb auch weiter gefasst, aber synonym, als „Stressproteine“.

Unter physiologischen Bedingungen wirken die meisten Hitzeschockproteine als „molecular chaperones“ und sind so an der korrekten Faltung von zytosolischen

Proteinen beteiligt. Zusätzliche Funktionen der Stressproteine unter Stressbedingungen sind zu vermuten, aber noch wenig untersucht.

Hitzeschockproteine werden im allgemeinen nach dem jeweiligen Molekulargewicht zu Proteinfamilien zusammengefasst (Übersichten s. LATCHMAN, 2001; BENJAMIN & McMILLAN, 1998). Man unterscheidet die Familien von Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 und Hsp32 und die der kleinen Hitzeschockproteine. Für Hsp70 ist schon seit längerem eine kardioprotektive Funktion bekannt (s. RADFORD *et al.*, 1996; TROST *et al.*, 1998). Hsp70 wird durch Ischämie induziert. Seine Expression ist in Tiermodellen reziprok mit der Infarktgröße nach Ischämie korreliert. Die Überexpression von Hsp70 in transgenen Mäusen führt sowohl zu einer verbesserten myokardialen Kontraktilität als auch zu einer Reduktion der Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion.

Zur Gruppe der kleinen Stressproteine gehören Hsp27, die α -Crystalline, Hsp20, MKBP (= HspB2), cvHsp, Hsp22 und HspB9. Kleine Hitzeschockproteine können Homo- und Heterooligomere mit einer Größe bis zu ca. 800 kDa bilden und mit verschiedenen Zytoskelettkomponenten interagieren (SUGIYAMA *et al.*, 2000). Man geht davon aus, dass auf diese Weise Zytoskelettproteine unter Stressbedingungen stabilisiert werden und kleine Hitzeschockproteine dadurch eine zytoprotektive Rolle übernehmen. Außer α A-Crystallin und HspB9 sind alle Proteine durch eine starke Expression im Muskelgewebe gekennzeichnet. Im einzelnen sind die Funktionen der kleinen Hitzeschockproteine jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.5 Das Stressprotein α B-Crystallin

α B-Crystallin, als Strukturprotein der Augenlinse schon lange bekannt, wurde von R. KLEMENZ (1991) aufgrund bestimmter Proteineigenschaften als Hitzeschockprotein eingeführt und der Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine zugeordnet. J. HORWITZ (1992) schrieb ein Jahr später: „A major unanswered question is: What is the function of α B-Crystallin?“. Bezüglich der Bedeutung von α B-Crystallin in der Augenlinse konnten die letzten 10 Jahre Antworten auf diese Frage bringen. Es schützt β - und γ -Crystallin, Proteine der Linsenmatrix, die für die Brechungseigenschaften der Linse verantwortlich sind, vor Aggregation und Denaturierung. Die Funktion von α -Crystallin in der Linse spiegelt sich auch in genetisch bedingten, autosomal-dominant vererbten Katarakt-Erkrankungen wieder, als deren Ursache eine Missense-Mutation im α A-

Crystallin-Gen (LITT *et al.*, 1998) bzw. eine Deletion im α B-Crystallin-Gen (BERRY *et al.*, 2001) identifiziert werden konnte. Die Frage nach der Funktion von α B-Crystallin im Herzen, wo es ebenfalls exprimiert wird, konnte bisher allerdings nicht beantwortet werden. Sie ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.5.1 Eigenschaften von α B-Crystallin

Das α B-Crystallin-Gen ist im Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus drei Exons und zwei Introns (Übersicht s. GROENEN *et al.*, 1994). Es kodiert für ein Protein mit 175 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 20200 Da. Man nimmt eine Zwei-Domänenstruktur an, eine globuläre N-terminale Domäne und eine unter den kleinen Stressproteinen hoch konservierte, sogenannte α -Crystallin-Domäne nahe des C-Terminus (CARVER *et al.*, 1992; INGOLIA & CRAIG, 1982; WISTOW, 1985). Die exakte Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur ist nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf eine überwiegende β -Faltblattstruktur mit geringen α -helikalen Anteilen (SIEZEN & ARGOS, 1983). *In vivo* wird α B-Crystallin als hochmolekularer Komplex mit einer Größe von 600 – 800 kDa gefunden. Es handelt sich dabei sowohl um Homo- als auch Heterooligomere mit verwandten Proteinen der Gruppe der kleinen Stressproteine. Für die Oligomerisierung sind hydrophobe Abschnitte der konservierten C-terminalen Domäne von Bedeutung (BOELENIS *et al.*, 1998a; LIU & WELSH, 1999). Die Quartärstruktur der Oligomere scheint dynamisch und variabel zu sein, wahrscheinlich eine globuläre Form mit einer zentralen Höhle (HALEY *et al.*, 1998; VANHOUDT *et al.*, 1998). Abbildung 1-1 zeigt eine dreidimensionale Rekonstruktion des α B-Crystallin-Oligomers.

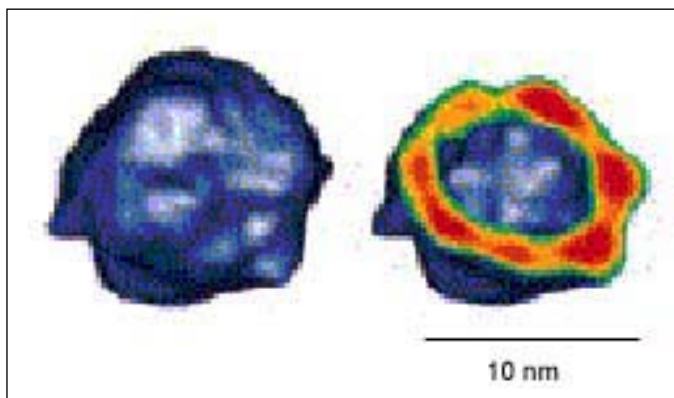


Abbildung 1-1: Dreidimensionale Rekonstruktion des α B-Crystallin-Oligomers. Links die Oberfläche des Oligomers, rechts ein Schnittbild, in dem die zentrale Höhle sichtbar wird. Blaue Flächen stellen Regionen mit hoher, rote Flächen solche mit niedriger Proteindichte dar. Nach HALEY *et al.*, 1998.

α B-Crystallin hat *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* chaperone-ähnliche Eigenschaften, d. h. es kann an denaturierte Proteine binden, diese in einem faltungskompetenten Zustand halten und vor unspezifischer Aggregation bewahren (CARVER *et al.*, 1995; WANG & SPECTOR, 2000). Eine Enzyminaktivierung kann durch diese Bindung allerdings nicht verhindert werden. Durch Interaktion mit anderen chaperones (z. B. Hsp70, Hsp40, Hsp60, Chaperonin 60 (GroEL) u. a.) können die denaturierten Proteine in ihre korrekte native Konformation zurückgebracht werden und deren Enzymaktivität wieder hergestellt werden. Eine solche Hemmung der Proteinaggregation durch α B-Crystallin wurde *in vitro* für die Enzyme Alkoholdehydrogenase, Katalase, Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase und die Linsenproteine β - und γ -Crystallin gezeigt (DERHAM & HARDING 1999; HOOK & HARDING, 1997a; HOOK & HARDING, 1997b; HORWITZ, 2000).

1.5.2 α B-Crystallin im Herzen

BHAT & NAGINENI (1989) zeigten an der Ratte erstmalig, dass α B-Crystallin nicht, wie bis dahin angenommen, linsenspezifisch ist, sondern ubiquitär vorkommt, z. B. in Haut, Gehirn, Lunge, Niere und in besonders hoher Konzentration im Herzen und in langsamen Skelettmuskelfasern. DUBIN und Mitarbeiter (1989) wiesen unabhängig davon α B-Crystallin-RNA in Lungen-, Nieren-, Skelettmuskel- und Herzmuskelgewebe der Maus nach.

Vieles deutet darauf hin, dass α B-Crystallin im Herzen ähnlich wie in der Linse eine Schutzfunktion ausübt (s. MARTIN *et al.*, 1997). Der definitive Nachweis einer kardioprotektiven Funktion von α B-Crystallin steht jedoch noch aus und soll in der vorliegenden Arbeit erbracht werden.

Nach Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe macht α B-Crystallin im Rattenherzen 1 – 2 % der gesamten löslichen Proteine aus (GOLENHOFEN *et al.*, 1998). α B-Crystallin wurde von BARBATO *et al.* (1996) und CHIESI *et al.* (1990) an den I-Banden der Myofibrillen lokalisiert. GOLENHOFEN *et al.* (1998) konnten zeigen, dass α B-Crystallin, das unter physiologischen Bedingungen im Zytosol gelöst ist, unter Ischämie innerhalb von Minuten an die I-Bande der Myofibrillen transloziert. Der Hauptbindungspartner von α B-Crystallin am kontraktilen Apparat konnte vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe

identifiziert werden (GOLENHOFEN *et al.*, 1999). Es handelt sich um Titin, ein Protein des elastischen Filamentsystems des Kardiomyozyten. Ein weiterer Bindungspartner scheint das Intermediärfilament Desmin zu sein. Nachfolgend sei kurz auf das kardiomyozytäre Filamentsystem eingegangen.

Abbildung 1-2 gibt einen schematischen Überblick über das kardiomyozytäre Filamentsystem. Es besteht aus dem Aktin-Myosin-Filamentsystem, dem elastischen Filamentsystem und dem Intermediär-Filamentsystem (Übersichten s. a. DRENCKHAHN, 2002).

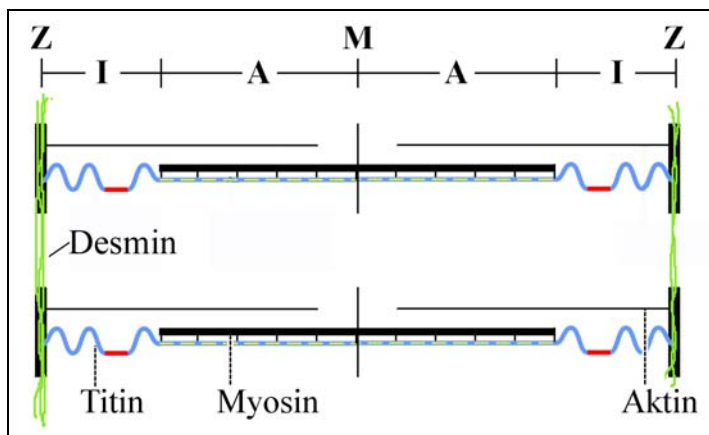


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des kardiomyozytären Filamentsystems. Beachte: Das Titin-Filament reicht von der Z-Scheibe bis zur Mitte der M-Linie. In seinem I-Banden-Abschnitt weist es elastische Eigenschaften auf.

Das Aktin-Myosin-Filamentsystem ist für die Muskelkontraktion verantwortlich. Die etwa 8 nm dicken Aktinfilamente sind in den Z-Scheiben verankert und reichen bis in die A-Bande hinein. Zwischen ihnen befinden sich die etwa 15 nm dicken Myosinfilamente. Beide Filamente können sich durch den in Kap. 1.2.1 beschriebenen Mechanismus in Längsrichtung gegeneinander verschieben und dadurch eine Verkürzung des Sarkomers bewirken (s. RAYMENT *et al.*, 1993).

Parallel zum Aktin-Myosin-Filamentsystem verläuft das Titin-Filament. Es wird wegen seiner geringen Dicke (2 – 4 nm) dem sog. superdünnen Filamentsystem zugerechnet. Titin ist in der Z-Scheibe verankert und reicht zur Mitte der M-Linie; im A-Banden-Abschnitt bindet es an Myosin. Der I-Banden-Abschnitt von Titin ist für die elastischen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich. Er besteht überwiegend aus Ig-Domänen, zwischen denen sich Sequenzabschnitte befinden, die besonders reich an Prolin,

Glutamat, Valin und Lysin sind (sog. „PEVK-Domäne“). Das elastische Titin-Filamentsystem hält die Sarkomere bei starker Dehnung des Muskels zusammen und schützt sie so vor Überdehnung. Bei Entspannung des Muskels ermöglicht es ein aktives Zurückgleiten der Aktin-Filamente zwischen die Myosin-Filamente. Darüber hinaus ist das Titin-Filamentsystem für die Ruhespannung des Muskels verantwortlich.

In transversaler Richtung werden die Myofibrillen durch Desmin-Filamente zusammengehalten. Desmin-Filamente werden aufgrund ihrer Dicke von 8 – 10 nm den Intermediär-Filamenten zugerechnet. Sie verlaufen ringförmig auf Höhe der Z-Scheiben um die Myofibrillen, verbinden diese miteinander und strahlen in spezielle Zellkontakte an der Plasmamembran, die Costamere, ein. Desminfilamente sind somit im Herzmuskel für die exakte Ausrichtung der Myofibrillen verantwortlich.

α B-Crystallin transloziert also unter Ischämie an die Myofibrillen und bindet dort hauptsächlich an Titin. Wie bereits erwähnt, ist es unklar, ob α B-Crystallin, ähnlich wie in der Linse, durch diese Translokation und Bindung eine Schutzfunktion im Kardiomyozyten erfüllt. Erste konkrete Hinweise auf eine mögliche kardioprotektive Funktion ergaben Versuche mit kultivierten Kardiomyozyten. Im Zellkulturmodell war der LDH-Austritt, ein Zeichen für Zelluntergang, bei Überexpression von α B-Crystallin unter simulierter Ischämie reduziert (MARTIN *et al.*, 1997). Einen weiteren Hinweis auf eine Schutzfunktion von α B-Crystallin scheint eine Muskelerkrankung zu geben, als deren Ursache die Arbeitsgruppe um VICART (1998) eine Missense-Mutation des α B-Crystallin-Gens identifizieren konnte. Klinisch imponieren eine Katarakt, eine Muskelschwäche der Extremitäten, des Nackens, des Velopharynx und des Rumpfes sowie eine Kardiomyopathie. Biopsien der betroffenen Muskeln zeigten Aggregationen von Desmin, deren Zustandekommen man sich dadurch erklärt, dass Desmin nicht mehr durch α B-Crystallin vor Aggregation geschützt wird.

Von der Arbeitsgruppe um E. F. WAWROUSSEK wurde eine α B-Crystallin gendeletierte Maus hergestellt und charakterisiert (BRADY *et al.*, 2001). Die Autoren beobachteten bei diesen Tieren Befunde, die denen der von VICART beschriebenen humanen Myopathie nicht unähnlich sind. Ab etwa der 20. Lebenswoche machte sich bei den Mäusen eine Muskeldystrophie vor allem an der paravertebralen Muskulatur bemerkbar. Degenerative osteoarthritische Veränderungen der Facettengelenke führten zu einer

massiven Kyphose. Elektronenmikroskopisch zeigten sich in den betroffenen Muskeln Aggregate amorpher, flockiger Materialien sowie intrazelluläre Vakuolen. Ebenfalls betroffen war die hintere Zungenmuskulatur. Die dystrophischen Veränderungen waren hier begleitet von einem fast kompletten Ersatz degenerierter Muskelfasern durch Fettgewebe. Der Funktionsverlust der Zunge erklärt den ebenfalls beobachteten Gewichtsverlust. An der Linse und am Herzen hingegen fanden die Autoren kaum Veränderungen.

Auch in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde deutlich, dass die Herzen der α B-Crystallin gendelierten Mäuse weder makroskopisch noch histologisch sichtbare Veränderungen gegenüber Wildtyp-Mäusen aufweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass α B-Crystallin als Stressprotein seine putative Schutzwirkung erst unter Stressbedingungen, beispielsweise unter Ischämie, entfalten kann. Um diese Frage zu klären, etablierten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Versuchssystem, das es uns erlaubte zu prüfen, ob ischämischer Stress zu einer gegenüber Kontrolltieren verstärkten Kompromittierung des Kontraktionsverhaltens von isolierten Papillarmuskelpräparaten α B-Crystallin defizienter Mäuse führt. Dazu stand mir die oben erwähnte α B-Crystallin gendelierte Maus am Hause zur Verfügung.

1.6 Aufbau eines Versuchssystems zur Charakterisierung der Myokardfunktion der Maus

Zur Charakterisierung der kardialen Funktion von α B-Crystallin etablierten wir ein geeignetes System zur Untersuchung der murinen Myokardfunktion, bei dem wir isolierte Papillarmuskeln der Maus verwendeten. Das Modell isolierter Herzmuskelpräparate der Maus findet in der Forschung zunehmende Verbreitung, da durch die Möglichkeiten der Gendelation und Genüberexpression viele Mausmodelle kardiovaskulärer Erkrankungen zur Verfügung stehen. Allerdings ist die Physiologie des Mäuseherzens schlecht untersucht. In der Literatur reichen Berichte über ein bestimmtes physiologisches Charakteristikum, die bereits erwähnte Kraft-Frequenz-Beziehung, von einem „negativen“ bis hin zu einem „stark positiven“ Verlauf (BLUHM *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 1999; WOLSKA & SOLARO, 1996). Da diesen widersprüchlichen Ergebnissen verschiedene, z. T. unphysiologische

Versuchsbedingungen (isometrische Kontraktionsbedingungen, $[Ca^{2+}] = 2,5 \text{ mM}$, Raumtemperatur) zugrunde liegen, untersuchten wir im Rahmen des Aufbaus unseres Systems zunächst den Einfluss verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen, der Temperatur und der Kontraktionsbedingungen (Isometrie vs. Auxotonie) auf die Kontraktilität der Muskeln und den Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung. Im Anschluss verwendeten wir dieses Versuchssystem, um die Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln αB -Crystallin defizienter Mäuse unter simulierter Ischämie und Reperfusion zu untersuchen.

1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die bislang unbekannte Funktion des Stressproteins αB -Crystallin im Herzen. Dazu setzten wir im Organbad isolierte Papillarmuskeln αB -Crystallin gendelezierter Mäuse einer simulierten Ischämie aus und charakterisierten den Verlauf der Kontraktilität unter simulierter Ischämie und Reperfusion.

Zuvor etablierten wir ein geeignetes System zur Untersuchung der Kontraktilität isolierter Herzmuskelpräparate der Maus. Dabei überprüften wir die Eignung des isolierten Papillarmuskels als Präparat für Versuche im Organbad, definierten optimale Versuchsbedingungen und untersuchten systematisch den Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration, der Temperatur und der Kontraktionsbedingungen (Isometrie vs. Auxotonie) auf den Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Versuchstiere

Für die Messungen zur Kraft-Frequenz-Beziehung verwendeten wir 12 – 20 Wochen alte Mäuse (Stamm 129 Sv, Gewicht 20 – 30 g).

Zur Untersuchung der Rolle von α B-Crystallin im Herzen standen mir am Hause α B-Crystallin gendeletierte Mäuse zur Verfügung, die wir von E. F. WAWROUSSEK erhalten hatten (Charakterisierung s. BRADY *et al.*, 2001). Sie waren 35 – 40 Wochen alt und wogen 20 – 30 g. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Tiere (wt-Tiere, Stamm 129 Sv) von gleichem Alter und Gewicht.

2.1.2 Nährlösungen

Die Nährlösungen für alle Versuche sowie die Präparier-Lösung basierten auf der Standardlösung nach Krebs. Ihre Zusammensetzung zeigt nachfolgende Tabelle:

Tabelle 2-1: Ionenkonzentrationen und Begasung der für die Versuche verwendeten Nährlösungen

	Standard-Lösung	Ischämie-Lösung	Präp.-Lösung
NaCl (mM)	135	135	135
KCl (mM)	4,7	4,7	4,7
MgCl₂ (mM)	1,2	1,2	1,2
KH₂PO₄ (mM)	1,2	1,2	1,2
NaHCO₃ (mM)	25	25	-
CaCl₂ (mM)	s. Protokoll	1,5	2,5
Hepes (mM)	-	-	10
Glucose (mM)	12	-	12
Na-Pyruvat (mM)	-	-	5
BDM (mM)	-	-	20
Begasung	95% O ₂ , 5% CO ₂	95% N ₂ , 5% CO ₂	100% O ₂
pH	7,4	7,4	7,4

2.1.3 Versuchsanordnung

Nachfolgende Abbildungen zeigen die Versuchsanordnung sowie einen fertig präparierten Papillarmuskel.

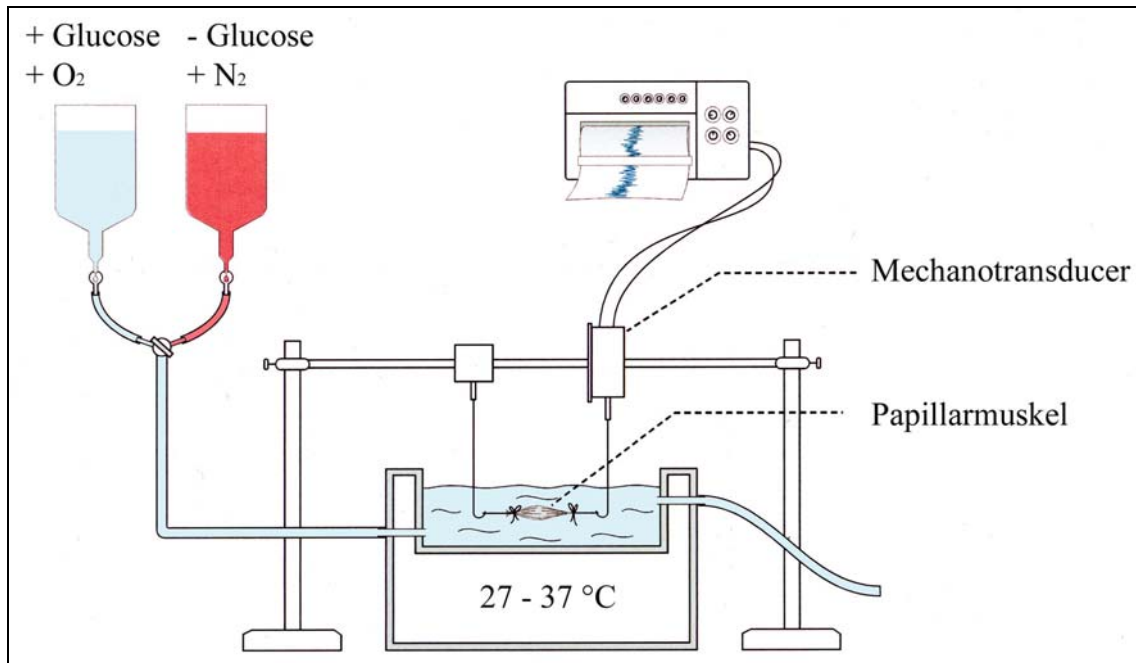


Abbildung 2-1: Versuchsaufbau. Das Muskelpräparat ist an zwei Häkchen im Organbad aufgehängt, das mit Standard- (blau) oder Ischämie-Lösung (rot) perfundiert werden kann. Die entwickelte Zuckungskraft wird über einen Mechanotransducer abgenommen und aufgezeichnet. Die elektrische Stimulation des Muskels erfolgt über zwei waagrecht in das Organbad montierte Elektroden (nicht dargestellt).

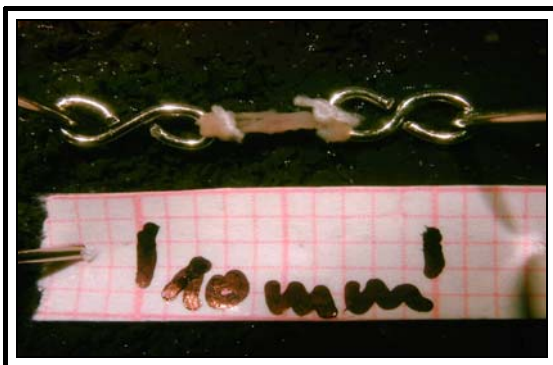


Abbildung 2-2: Fotografie eines isolierten linksventrikulären anterioren Papillarmuskels der Maus. Der Papillarmuskel wurde in einer oxygenierten Nährlösung aus dem linken Ventrikel präpariert und an zwei Metallösen fixiert. Diese dienen zur Aufhängung im Organbad.

Für das Perfusionssystem wurden doppelwandige Glaskolben und Schlauchsysteme verwendet. Die Temperatur im Wärmekreislauf wurde durch einen Thermostat-gesteuerten Umlaufferhitzer und einen Tauchsieder geregelt.

Das Organbad wurde in unserer Arbeitsgruppe konstruiert. Bei einem Volumen von 2 ml wurde es mit einer Durchflussrate von 5 ml/min perfundiert. Das Muskelpräparat wurde mit Metallösen horizontal zwischen zwei von oben in das Organbad reichende Metallhäkchen gespannt. Die Häkchen für isometrische Messungen bestanden beide aus starrem Metall, zur Herstellung auxotoner Bedingungen wurde eines der Häkchen gegen einen flexiblen Stahldraht ausgetauscht, der als Feder fungierte. Dabei war die Federkonstante mit $k = 3 \text{ N/m}$ so gewählt, dass bei einer Kraft von 1 mN (repräsentativer Wert der Zuckungskraft unter Standardbedingungen) eine Muskelverkürzung um 10 – 15 % auftritt.

Die Muskelpräparate wurden über horizontal im Organbad montierte Platinelektroden gereizt. Die Reizdauer betrug 1 ms, die Reizfrequenz betrug unter Standardbedingungen 1 Hz. Die Spannung wurde an den Elektroden abgegriffen und an einem Oszilloskop überwacht. Sie lag etwa 50 % über der Auslöseschwelle (entspricht 5 – 7 V).

Die Kontraktionskräfte wurden über einen Dehnungs-Messstreifen-Transducer abgenommen, der über eine Brücke mit einem hochauflösenden Schreiber (Gould 2400) verbunden war.

2.1.4 Anfertigung der Muskelpräparate

Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet, thorakotomiert und das Herz an den großen Gefäßen abgesetzt. Die Muskeln wurden unter einem Stereomikroskop (Olympus) in oxygenierter, 32 °C warmer Nährlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 2-1, „Präp.-Lösung“) präpariert. Die Lösung wurde während der Präparation regelmäßig ausgetauscht, um eine ausreichende Oxygenierung zu gewährleisten.

Nach Absetzen beider Vorhöfe sowie der Gefäßstümpfe von A. pulmonalis und Aorta wurde der linke Ventrikel auf der posterioren Seite durch einen Längsschnitt vom Ring der Mitralklappe auf die Apex zu eröffnet. Es folgten Fixierung der Hinterwand und Durchtrennung der Vorderwand des linken Ventrikels zwischen anteriorem und posteriorem Papillarmuskel. Der verbleibende Myokardstreifen wurde knapp unterhalb

des Klappenringes vom anterioren Papillarmuskel abgesetzt und nach lateral mobilisiert. Dabei wurden teilweise vorhandene muskuläre Trabekel, die von der Mitte des Muskelbauches zum Myokard zogen, durchtrennt. Das Myokard um den Klappenring sowie direkt unterhalb der Insertionsstelle wurde *in situ* belassen, um einen Ansatz für die Anschlingung an die Metallösen zu gewährleisten. Diese Ösen wurden durch einen Seidenfaden mit dem Muskelpräparat verbunden. Die fertigen Präparate hatten einen Durchmesser von 0,5 – 0,6 mm, waren 2 – 3 mm lang und hatten eine Querschnittsfläche von 0,2 – 0,3 mm² (vgl. Abbildung 2-2).

Die Präparation dauerte in der Regel nicht länger als 15 min. Während des Präparationsvorganges wurden Längs- und Torsionskräfte sowie die Berührung des Präparates vermieden.

2.2 Messungen zur Kraft-Frequenz-Beziehung

2.2.1 Adaptationsphase und „KFB-Protokoll“

Nach dem Einbringen des Muskels ins Organbad, (Perfusion mit „Standard-Lösung“, Zusammensetzung s. Tabelle 2-1) wurde dieser sofort mit einer Frequenz von 1 Hz gereizt. Das Präparat wurde schrittweise gedehnt, bis sich die Zuckungskraft nicht mehr erhöhen ließ. Anschließend wurde der Muskel 60 min unter Standardbedingungen ($[Ca^{2+}] = 1,5 \text{ mM}$, Temp. = 32 °C) konstant mit 1 Hz gereizt. Falls die Ruhespannung in dieser Phase nicht konstant blieb, wurde das Präparat verworfen.

Im Anschluss an die Adaptationsphase wurde ein „KFB-Protokoll“ (KFB = Kraft-Frequenz-Beziehung) aufgezeichnet. Dazu wurden Einzelzuckungen bei einer Schreibergeschwindigkeit von 100 mm/sek aufgezeichnet, um die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft (T_{tp} , *engl.* time to peak tension) als Maß für die Kraftanstiegsgeschwindigkeit sowie die Zeit bis zur halbmaximalen Relaxation (R_{50}) messen zu können (s. Abbildung 2-3). Es schloss sich die Messung der Maximalkraft F_{max} (Zuckungskraft nach einer Stimulationspause von 1 min) an. Nach weiteren 5 min unter Standardbedingungen wurde der Muskel je 30 – 60 sek mit unterschiedlichen Frequenzen (0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 Hz) gereizt.

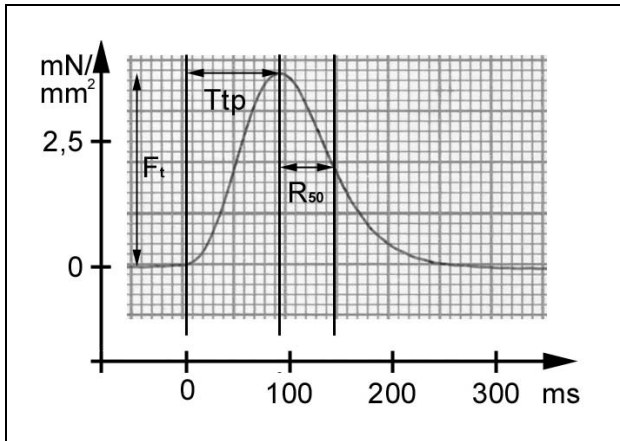


Abbildung 2-3: Originalregistrierung einer Einzelzuckung. Ttp: „time to peak tension“, Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft; R_{50} : halbmaximale Relaxationszeit; F_t : Zuckungskraft.

2.2.2 Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kraft-Frequenz-Beziehung

Nach einer 60-minütigen Adaptationsphase wurde das in Kap. 2.2.1 beschriebene „KFB-Protokoll“ bei einer Temperatur von 32 °C jeweils für $[Ca^{2+}] = 1,0 - 1,5 - 2,5 - 5,0$ mM (entweder in auf- oder in absteigender Reihenfolge) aufgezeichnet. Bevor das „KFB-Protokoll“ nach einer Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration aufgezeichnet wurde, ließen wir den Muskel etwa 15 min bei 1 Hz äquilibrieren.

2.2.3 Temperaturabhängigkeit der Kraft-Frequenz-Beziehung

Ebenfalls nach einer 60-minütigen Adaptationsphase wurde das in Kap. 2.2.1 beschriebene Protokoll für Temp. = 27 °C - 32 °C - 37 °C (entweder in auf- oder in absteigender Reihenfolge) aufgezeichnet. Die Ca^{2+} -Konzentration betrug konstant 1,5 mM. Auch nach einer Temperaturveränderung ließen wir den Muskel vor der Aufzeichnung des „KFB-Protokolls“ etwa 15 min bei 1 Hz äquilibrieren.

2.2.4 Einfluss des Kontraktionstyps (Isometrie/Auxotonie)

Die in Kap. 2.2.2 und 2.2.3 beschriebenen Versuchsreihen wurden sowohl unter isometrischen wie unter auxotonen Kontraktionsbedingungen durchgeführt.

2.3 Messungen zur simulierten Ischämie und Reperfusion

2.3.1 Adaptationsphase

Die Versuche wurden unter auxotonen Kontraktionsbedingungen durchgeführt. Das Muskelpräparat wurde in das Organbad eingebracht, sofort mit 1 Hz gereizt und schrittweise gedehnt, bis sich die Zuckungskraft nicht mehr weiter steigern ließ. In der Adaptationsphase wurde das Organbad mit Standard-Lösung (s. Tabelle 2-1), also unter Sauerstoff- und Glucosezusatz, bei einer Temperatur von 32 °C perfundiert. Falls die Ruhespannung in dieser Phase nicht konstant blieb, wurde das Präparat verworfen. Nach einer 60-minütigen Adaptationsphase in Standard-Nährlösung wurden Einzelzuckungen mit hoher Schreibergeschwindigkeit (100 mm/sec) aufgezeichnet, um die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft (T_{tp} , *engl.* time to peak tension) sowie die Zeit bis zur halbmaximalen Relaxation (R_{50}) messen zu können (s. Abbildung 2-3).

2.3.2 Simulierte Ischämie

Im Anschluss an die Adaptationsphase wurde eine 20-minütige Ischämie simuliert, indem dem Muskelpräparat durch Perfusion des Organbades mit Ischämie-Lösung (Zusammensetzung s. Tabelle 2-1) Sauerstoff und Glucose entzogen wurde. Die Zeit für die simulierte Ischämie wurde so gewählt, dass Muskelpräparate von wt-Mäusen eine geringgradige Schädigung aufwiesen, um eventuelle Abweichungen bei den Muskeln gendeletierter Mäuse optimal beobachten zu können.

2.3.3 Reperfusionsphase

Nach simulierter Ischämie wurde das Organbad 60 min mit Standard-Lösung perfundiert, sodass das Muskelpräparat wieder mit Sauerstoff und Glucose versorgt wurde. Am Ende der Reperfusionsphase wurden abschließend Einzelzuckungen aufgezeichnet.

2.4 Auswertung und Statistik

Die gewonnenen Daten werden in der vorliegenden Arbeit als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts präsentiert und wurden mit dem t-Test (Kraft-Frequenz-Beziehung) bzw. dem Wilcoxon-Test (simulierte Ischämie und Reperfusion) auf Signifikanz ($p < 0,05$) getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln der Maus in Abhängigkeit von extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration und Temperatur unter isometrischen und auxotonen Versuchsbedingungen

3.1.1 Aufzeichnung einer „KFB-Kurve“

Im Rahmen der Etablierung eines Experimentalsystems zur Untersuchung der kardialen Funktion von αB -Crystallin haben wir an isolierten Papillarmuskeln der Maus den Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung (KFB) bei verschiedenen experimentellen Bedingungen (Ca^{2+} -Konzentration, Temperatur, Isometrie vs. Auxotonie) untersucht. In die Auswertung zu den Untersuchungen zur Kraft-Frequenz-Beziehung gingen insgesamt 28 Versuchstiere ein. Abbildung 3-1 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Original-Aufzeichnung einer „KFB-Kurve“ nach dem „KFB-Protokoll“ (s. Kap. 2.2.1) im Frequenzbereich 0,1 – 5,0 Hz.

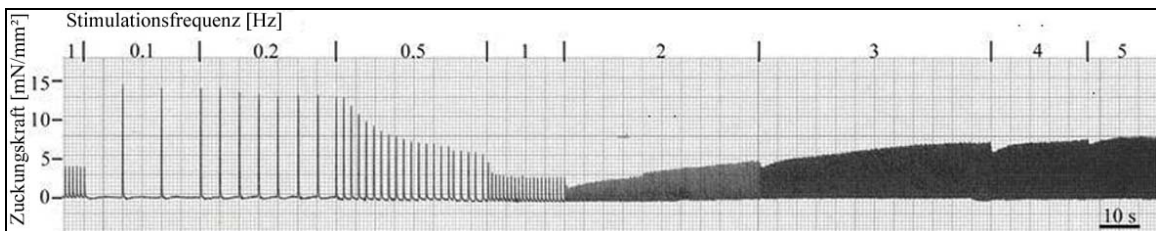


Abbildung 3-1: Aufzeichnung eines „KFB-Protokolls“. Beachte: Im Bereich von 1 – 4 Hz ist die Kraft-Frequenz-Beziehung positiv. $[\text{Ca}^{2+}] = 1,5 \text{ mM}$; Temp. = $27 \text{ }^\circ\text{C}$; Isometrie

Dabei entspricht der Frequenzbereich von 1 – 4 Hz bei $27 \text{ }^\circ\text{C}$ den physiologischen Herzfrequenzen der Maus (z. B. 4 Hz bei $27 \text{ }^\circ\text{C}$ entspr. $10 \text{ Hz} (= 600 \text{ min}^{-1})$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für einen anzunehmenden Temperaturkoeffizienten von 2,5).

Für unphysiologisch niedrige Stimulationsfrequenzen von 0,1 und 0,2 Hz liegt die Zuckungskraft (F_t) nahe an der Maximalkraft (F_{max} , Zuckungskraft nach einer Stimulationspause von 1 min, Aufzeichnung von F_{max} im Ausschnitt nicht gezeigt). Bei 0,5 Hz sinkt sie leicht ab. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz nimmt F_t minimale Werte an und steigt bis zu einer Frequenz von 4 Hz. Bei einer Steigerung der Stimulationsfrequenz über 5 Hz nimmt die Zuckungskraft ab, die Kraft-Frequenz-Beziehung wird negativ (in Abbildung 3-1 nicht gezeigt).

3.1.2 Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Zur Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kraft-Frequenz-Beziehung wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration systematisch zwischen 1,0 und 5,0 mM variiert und die Kraft-Frequenz-Beziehung im Bereich von 0,1 bis 5 Hz registriert (Temp. = 27 °C, Isometrie). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Zuckungskräfte (F_t) auf die Zuckungskraft bei 1 Hz ($F_{1\text{Hz}}$) normiert. Abbildung 3-2 veranschaulicht die gewonnenen Ergebnisse.

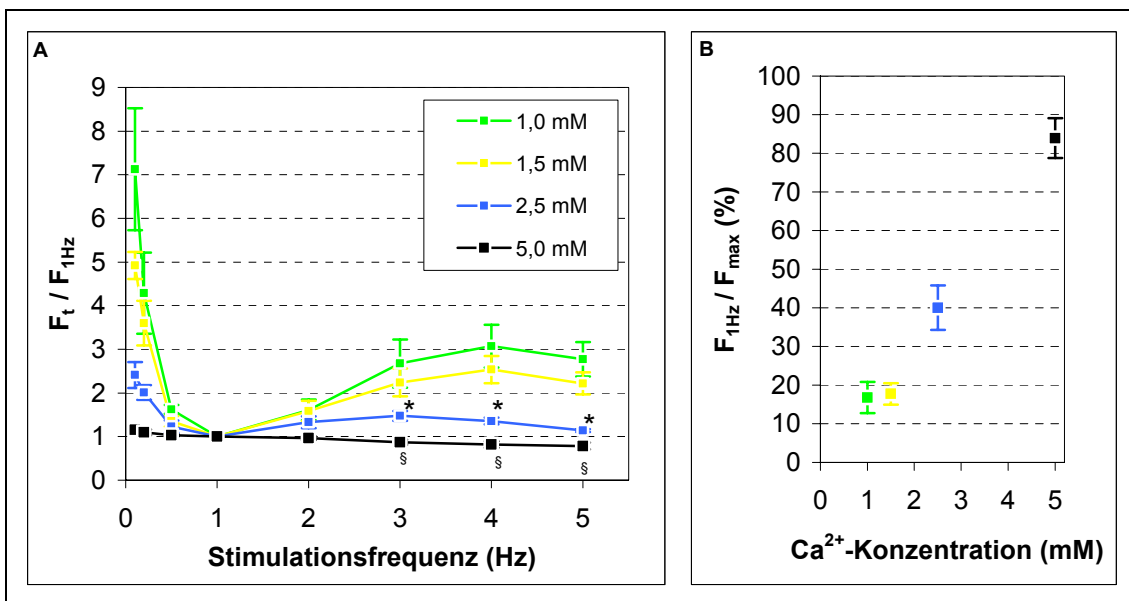


Abbildung 3-2: Einfluss der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Kraft-Frequenz-Beziehung; Temp. = 27 °C, Isometrie. F_t : Zuckungskraft, $F_{1\text{Hz}}$: Zuckungskraft bei 1 Hz, F_{max} : Maximalkraft. **A:** Die Kraft-Frequenz-Beziehung steigt im Bereich von 1 – 4 Hz für $[\text{Ca}^{2+}] = 1,0$ mM um den Faktor 3 und flacht mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration ab. Für $[\text{Ca}^{2+}] = 5,0$ mM ist sie negativ. * $P < 0,05$ vs. $[\text{Ca}^{2+}] = 1,0$ und 1,5 mM, § $P < 0,05$ vs. $[\text{Ca}^{2+}] = 1,0, 1,5$ und 2,5 mM. **B:** Quotient aus der Zuckungskraft bei 1 Hz und der Maximalkraft bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen. Beachte: Bei $[\text{Ca}^{2+}] = 5,0$ mM liegt $F_{1\text{Hz}}$ bereits nahe an F_{max} !

In dem für uns interessanten Frequenzbereich zwischen 1 und 4 Hz ist die Kraft-Frequenz-Beziehung bei Ca^{2+} -Konzentrationen von 1,0 und 1,5 mM deutlich positiv und erreicht relative Werte von 3,1 und 2,5 bei 4 Hz (s. Abbildung 2-3A). Bei Frequenzen über 4 Hz nahm die Zuckungskraft wieder ab, was wahrscheinlich auf eine mangelnde Nährstoffversorgung des Muskelpräparates im Organbad zurückzuführen ist. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration auf 2,5 mM führte im Bereich von 1 – 4 Hz zu einer signifikanten Abflachung der Kraft-Frequenz-Beziehung, eine Erhöhung auf 5,0 mM sogar zu einer negativen Kraft-Frequenz-Beziehung.

Die absoluten Werte der bei 1 Hz entwickelten Zuckungskräfte waren ebenfalls stark Ca^{2+} -abhängig, wohingegen die maximale Zuckungskraft (Kraft nach einer Stimulationspause von 1 min) sich als Ca^{2+} -unabhängig erwies. Abbildung 3-2B zeigt die Relation der Zuckungskraft bei 1 Hz ($F_{1\text{Hz}}$) zur Maximalkraft (F_{max}) bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen. Es wird deutlich, dass bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (5,0 mM) $F_{1\text{Hz}}$ schon nahe an F_{max} liegt (84 %) und daher bei Frequenzerhöhung wahrscheinlich nicht mehr viel gesteigert werden kann. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen (1,0 und 1,5 mM) hingegen liegt das Verhältnis von $F_{1\text{Hz}}$ und F_{max} bei 15 – 20 %. Dies könnte die positive Kraft-Frequenz-Beziehung unter diesen Versuchsbedingungen erklären.

3.1.3 Einfluss auxotoner Kontraktionsbedingungen auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Das gleiche Versuchsprotokoll wurde bei auxotonen Kontraktionsbedingungen durchgeführt. Der Muskel wurde dazu an einer Seite an einem flexiblen Draht mit Federwirkung (Verkürzung des Muskels um durchschnittlich 10 – 15 %) befestigt.

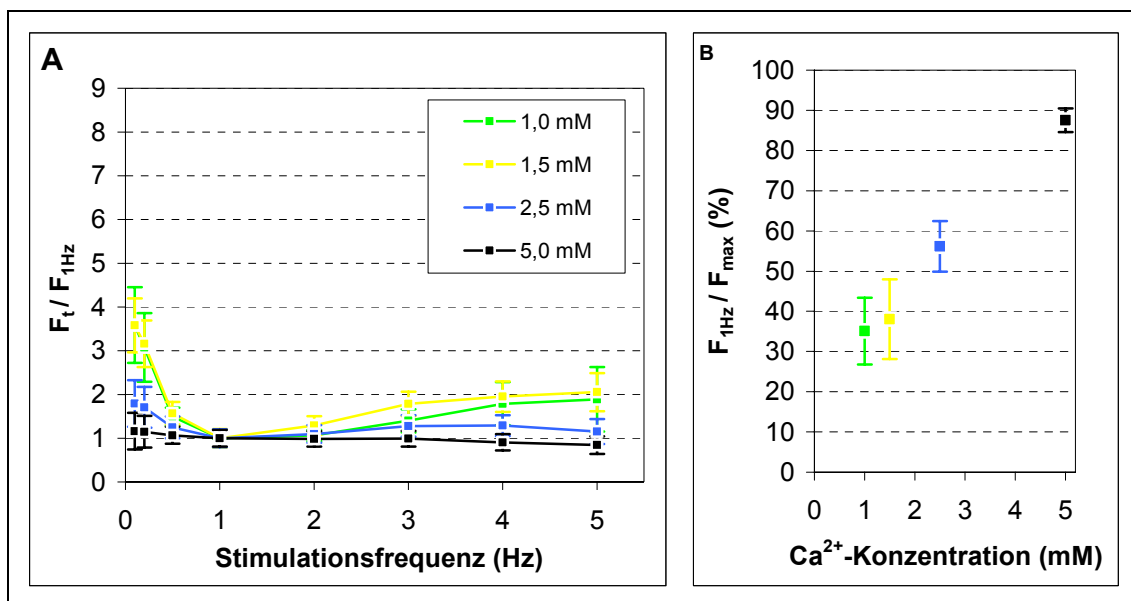


Abbildung 3-3: Einfluss der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Kraft-Frequenz-Beziehung; Temp. = 27 °C, Auxotonie. F_t : Zuckungskraft, $F_{1\text{Hz}}$: Zuckungskraft bei 1 Hz, F_{max} : Maximalkraft. A: Im Bereich von 1 – 4 Hz ist die Kraft-Frequenz-Beziehung bei $[\text{Ca}^{2+}] = 1,0$ mM und 1,5 mM positiv, bei steigender Ca^{2+} -Konzentration flacht sie ab, bis sie bei $[\text{Ca}^{2+}] = 5,0$ mM negativ wird. Unter auxotonen Kontraktionsbedingungen ist die Ca^{2+} -Abhängigkeit weniger stark ausgeprägt als unter isometrischen (vgl. Abbildung 3-2). B: Quotient aus der Zuckungskraft bei 1 Hz und der Maximalkraft bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen. Beachte: Bei $[\text{Ca}^{2+}] = 5,0$ mM liegt $F_{1\text{Hz}}$ bereits nahe an F_{max} !

Abbildung 3-3A zeigt, dass bei auxotonen Kontraktionen im Vergleich zu isometrischen Kontraktionen die Kraft-Frequenz-Beziehung im Bereich von 1 – 4 Hz bei vergleichbaren Ca^{2+} -Konzentrationen weniger stark positiv verläuft. So beträgt das Verhältnis von $F_{4\text{Hz}}$ zu $F_{1\text{Hz}}$ bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,0 mM 1,7 (3,1 unter Isometrie), bei $[\text{Ca}^{2+}] = 1,5 \text{ mM}$ 2,0 (2,5 unter Isometrie). Bei Ca^{2+} -Konzentrationen von 2,0 und 5,0 mM zeigen sich keine Unterschiede zwischen auxotonen und isometrischen Versuchsbedingungen. Auch das Verhältnis von $F_{1\text{Hz}}$ zu F_{max} (s. Abbildung 3-3B) unterschied sich bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,0 und 1,5 mM im Vergleich zur Isometrie. Es betrug unter auxotonen Bedingungen bei Ca^{2+} -Konzentrationen 1,0 und 1,5 mM ca. 30 % (15 – 20 % unter Isometrie). Dies deutet auf eine bei auxotonen Kontraktionen im Vergleich zu isometrischen relativ höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei 1 Hz hin und könnte die flacher verlaufende Kraft-Frequenz-Beziehung erklären.

3.1.4 Einfluss der Temperatur auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Um den Einfluss der Temperatur auf die Kraft-Frequenz-Beziehung zu untersuchen, wurden Messungen bei Temp. = 27, 32 und 37 °C unter isometrischen und auxotonen Kontraktionsbedingungen bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,5 mM durchgeführt.

Abbildung 3-4A zeigt das Verhältnis der Zuckungskraft bei 4 Hz ($F_{4\text{Hz}}$) zur Zuckungskraft bei 1 Hz ($F_{1\text{Hz}}$) bei den verschiedenen angegebenen Temperaturen. Es wird deutlich, dass eine Temperaturerhöhung sowohl unter isometrischen als auch unter auxotonen Kontraktionsbedingungen zu einer flach (32 °C) bis leicht negativ (37 °C) verlaufenden Kraft-Frequenz-Beziehung führt.

Abbildung 3-4B zeigt, dass die Abflachung der Kraft-Frequenz-Beziehung bei 32 und 37 °C ähnlich wie bei einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (vgl. Abbildung 3-2B und Abbildung 3-3B) von einem Anstieg des Quotienten $F_{1\text{Hz}}/F_{\text{max}}$ begleitet wurde, was auch hier die flach bzw. negativ verlaufende Kraft-Frequenz-Beziehung bei 32 bzw. 37 °C erklären könnte.

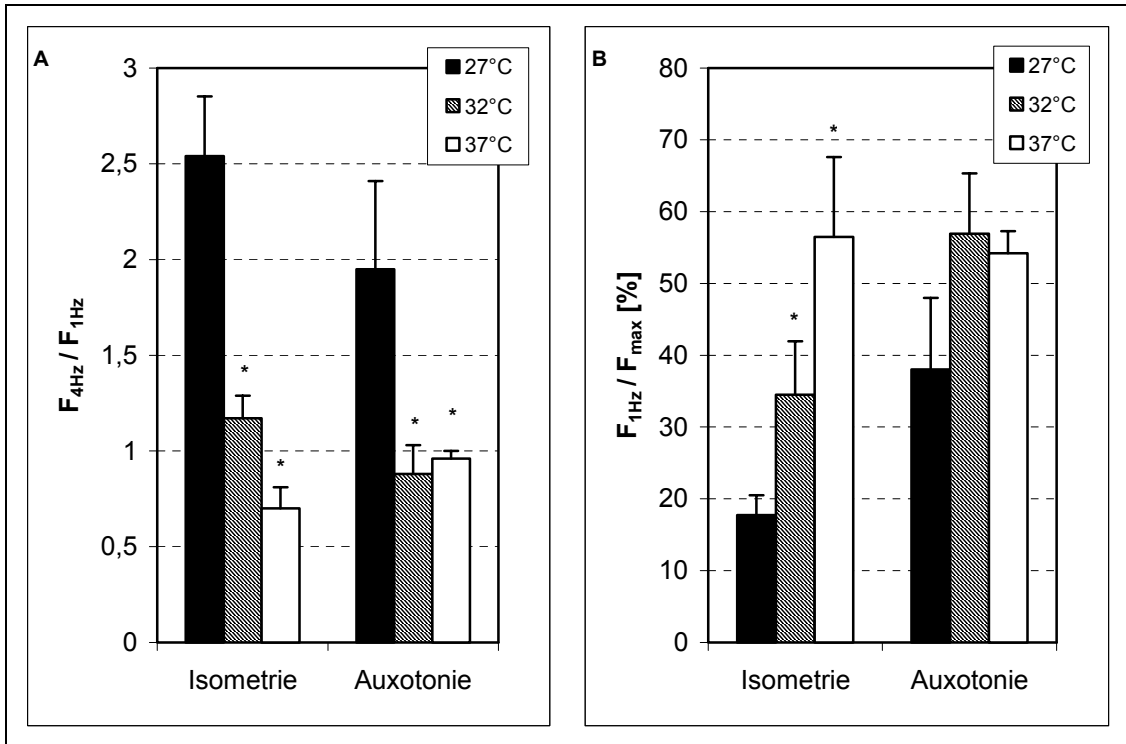


Abbildung 3-4: Einfluss der Temperatur auf die Kraft-Frequenz-Beziehung im Bereich von 1 – 4 Hz. [Ca^{2+}] = 1,5 mM. A: Bei 27 °C ist die Kraft-Frequenz-Beziehung positiv, die Zuckungskraft bei 4 Hz steigt unter Isometrie auf das 2,5-fache der Zuckungskraft bei 1 Hz, unter Auxotonie auf das 1,9-fache. Bei 32 °C verläuft sie flach, bei 37 °C wird die Kraft-Frequenz-Beziehung negativ. * $P < 0,05$ vs. 27 °C. B: Ähnlich wie bei der Ca^{2+} -Abhängigkeit korrespondiert eine flache Kraft-Frequenz-Beziehung (37 °C) mit Zuckungskräften, die bei 1 Hz bereits nahe an der Maximalkraft liegen.

3.1.5 Kraftanstiegsgeschwindigkeit und Relaxationszeit in Abhängigkeit unterschiedlicher Versuchsbedingungen

Bei den oben aufgeführten unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurde zusätzlich je eine Einzelzuckung bei erhöhter Schreibergeschwindigkeit (100 mm/sec) aufgezeichnet (s. Abbildung 2-3), um die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft (T_{tp}) als Maß für die Kraftanstiegsgeschwindigkeit sowie die halbmaximale Relaxationszeit (R_{50}) zu bestimmen.

T_{tp} und R_{50} zeigten nur eine geringe Ca^{2+} -Abhängigkeit, aber eine deutliche Temperaturabhängigkeit. Die Kontraktionsart (Auxotonie vs. Isometrie) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf T_{tp} und R_{50} . Tabelle 3-1 bietet eine Übersicht über die Ergebnisse.

Tabelle 3-1: Einfluss von Ca²⁺-Konzentration, Temperatur und Kontraktionsbedingung auf Ttp und R₅₀ (gemessen bei 1 Hz). Ttp und R₅₀ sind gering Ca²⁺- und deutlich temperaturabhängig. Die Kontraktionsart hat keinen Einfluss auf Ttp und R₅₀

Kontraktionsart	Temp. (°C)	Ca²⁺-Konz. (mM)	Ttp (ms)	R₅₀ (ms)
Isometrie	27	1,0	81,3 ± 3,1	67,5 ± 6,6
		1,5	90,0 ± 6,8	62,5 ± 6,3
		2,5	96,3 ± 4,7 *	62,5 ± 7,5
		5,0	106,3 ± 2,4 *	72,5 ± 6,0
	32	1,5	67,5 ± 4,8	43,8 ± 4,3 §
	37	1,5	58,8 ± 3,1 §	32,5 ± 2,5 §
Auxotonie	27	1,0	92,0 ± 2,6	64,0 ± 1,9
		1,5	90,8 ± 4,4	64,2 ± 2,0
		2,5	92,5 ± 3,6	59,2 ± 2,7
		5,0	100,0 ± 2,9 *	41,7 ± 4,0
	32	1,5	63,3 ± 2,1 §	41,7 ± 4,0 §
	37	1,5	47,0 ± 1,2 §	28,0 ± 1,2 §
<p>* $P < 0,05$ vs. $[Ca^{2+}] = 1,0$ mM § $P < 0,05$ vs. $T = 27$ °C, $[Ca^{2+}] = 1,5$ mM</p>				

3.2 Charakterisierung der Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln von αB-Crystallin -/- Mäusen unter simulierter Ischämie und Reperfusion

3.2.1 Charakterisierung der Kontraktilität der Papillarmuskeln unter Standardbedingungen im Organbad

Um einen eventuellen kardioprotektiven Effekt von αB-Crystallin nachzuweisen, haben wir isolierte Papillarmuskeln αB-Crystallin gendeletierter Mäuse und wt-Mäuse im Organbad unter Kontrollbedingungen und unter einer simulierten Ischämie und Reperfusion untersucht.

Nach Einbringen des Muskelpräparates in das Organbad ließen wir diesen unter Standard-Bedingungen (Perfusionslösung mit $[Ca^{2+}] = 1,5 \text{ mM}$, Temp. = $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$, auxotone Kontraktionsbedingungen) bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz 60 min lang an die Bedingungen des Organbads äquilibrieren. An diese Adaptationsphase schloss sich eine 20-minütige Ischämiephase sowie eine 60-minütige Reperfusionphase an. In die Auswertung gingen 8 wt- und 9 $\alpha\text{B}^{-/-}$ Tiere ein.

Um die Kontraktilität von $\alpha\text{B}^{-/-}$ und wt-Papillarmuskeln unter Kontrollbedingungen zu vergleichen, wurden nach 60 min Adaptation im Organbad Einzelzuckungen aufgezeichnet (s. Abbildung 2-3) und die Zuckungskraft F_t , die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft (T_{tp}) und die Zeit bis zur halbmaximalen Relaxation (R_{50}) gemessen. Nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 3-2: F_t , T_{tp} und R_{50} nach 60 min Adaptation der Papillarmuskeln im Organbad. Unter Standard-Bedingungen bestehen zwischen $\alpha\text{B}^{-/-}$ und wt-Präparaten keine signifikanten Unterschiede im Kontraktionsverhalten bei Einzelzuckungen.

	F_t	T_{tp}	R_{50}
	($m\text{N}/\text{mm}^2$)	(ms)	(ms)
$\alpha\text{B}^{-/-}$	$2,05 \pm 0,52$	$77,5 \pm 2,50$	$47,5 \pm 1,44$
wt	$2,47 \pm 0,46$	$77,5 \pm 2,50$	$50,0 \pm 4,56$

Es wird deutlich, dass sich die Muskeln der $\alpha\text{B}^{-/-}$ Mäuse in keinem der genannten Parameter signifikant von denen der wt-Mäuse unterscheiden, d. h. unter Standard-Bedingungen besteht im Kontraktionsverhalten der Papillarmuskeln αB -Crystallin gendeletierter Mäuse kein Unterschied zu denen von Kontrolltieren.

3.2.2 Charakterisierung der Kontraktilität der Papillarmuskeln unter simulierter Ischämie und Reperfusion

Im Anschluss an die Adaptationsphase wurde den Muskelpräparaten durch Austausch der Perfusionslösung für 20 min Sauerstoff und Glucose entzogen und so eine Ischämie simuliert. Danach wurde erneut für 60 min auf die Standard-Perfusionslösung (mit Sauerstoff und Glucose) umgestellt.

Abbildung 3-5 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus der Originalaufzeichnung eines wt-Präparates während der simulierten Ischämie, Abbildung 3-6 die eines $\alpha B^{-/-}$ -Präparates.

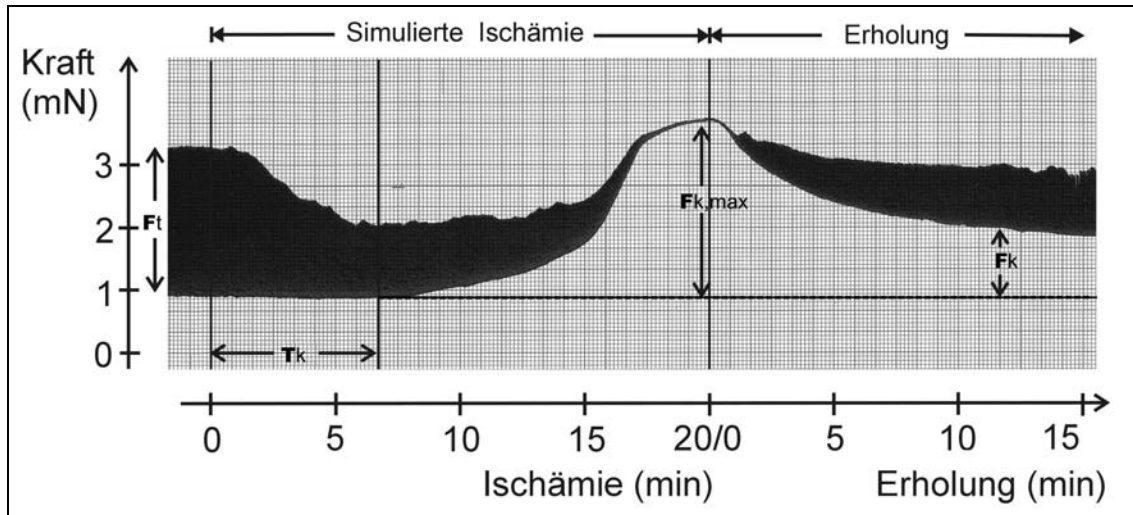


Abbildung 3-5: Originalregistrierung eines wt-Präparates während simulierter Ischämie. F_t : Zuckungskraft unter physiologischen Bedingungen; T_k : Zeit bis zum Beginn der Kontraktur; $F_{k,max}$: maximal entwickelte Kontraktur; F_k : Restkontraktur in der Reperfusionphase. Stimulationsfrequenz = 1Hz.

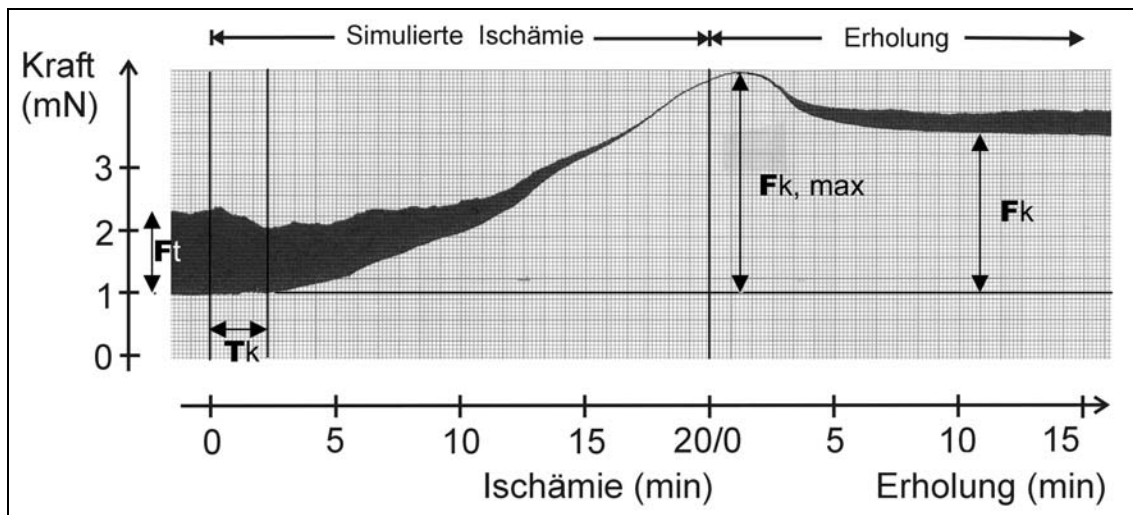


Abbildung 3-6: Originalregistrierung eines $\alpha B^{-/-}$ Präparates während simulierter Ischämie. F_t : Zuckungskraft unter physiologischen Bedingungen; T_k : Zeit bis zum Beginn der Kontraktur; $F_{k,max}$: maximal entwickelte Kontraktur; F_k : Restkontraktur in der Reperfusionphase. Stimulationsfrequenz = 1Hz.

Bereits wenige Minuten nach Beginn der Ischämie war bei wt- und $\alpha B^{-/-}$ Muskeln eine Abnahme der Zuckungskraft F_t zu beobachten. In den ersten 10 min nach Beginn der

simulierten Ischämie entwickelten die Muskeln eine Kontraktur, d. h. die Ruhespannung begann zu steigen. Diese Kontraktur erreichte nach etwa 20 min ihr Maximum ($F_{k,max}$). In derselben Zeit war die Zuckungskraft auf nahezu Null abgesunken. In der anschließenden simulierten Reperfusion nahm die Zuckungskraft der Muskeln nach wenigen Minuten wieder zu. Auch die Kontraktur bildete sich langsam zurück.

α B-/- Muskeln wurden bezüglich der in Abbildung 3-6 eingezeichneten Parameter Zuckungskraft (F_t), Zeit bis zum Beginn der Kontraktur (T_k), maximal entwickelte Kontraktur ($F_{k,max}$), Restkontraktur in der Reperfusionsphase (F_k) sowie T_{tp} und R_{50} mit wt-Muskeln verglichen. Eine Übersicht über die Ergebnisse geben Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4.

Tabelle 3-3: Übersicht über die während der simulierten Ischämie erhobenen Werte (s. a. Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6)

	T_k (min)	$F_{k,max} / F_t$ (%)
α B-/-	7,4 ± 1,8*	234,1 ± 34,6 *
wt	13,1 ± 1,8	90,9 ± 22,7

* $P < 0,05$ vs. wt

Tabelle 3-4: Übersicht über die während der Reperfusionsphase erhobenen Werte (s. a. Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6)

	$F_{k,60' Reperf} / F_t$ (%)	$F_{t, 60' Reperf} / F_t$ (%)	T_{tp} (ms)	R_{50} (ms)
α B-/-	55,8 ± 17,1*	47,3 ± 6,9	56,2 ± 2,4*	43,8 ± 3,8
wt	21,3 ± 7,7	56,5 ± 2,9	65,0 ± 2,9	45,0 ± 2,0

* $P < 0,05$ vs. wt

α B-Crystallin defiziente Präparate zeigten eine im Vergleich zu Muskeln von Kontrolltieren eine signifikant verkürzte Zeit bis zum Beginn der Kontraktur ($T_k = 7,4 \pm 1,8$ min vs. $13,1 \pm 1,8$ min). Zur Auswertung der maximal entwickelten Kontraktur

($F_{k,max}$) bezogen wir die Absolutwerte von $F_{k,max}$ auf die Zuckungskraft des Muskels vor Ischämie (F_t), da die Ausgangskräfte der Muskeln eine deutliche Streuung aufwiesen. Die maximal entwickelte Kontraktur ($F_{k,max}$) war bei $\alpha B^{-/-}$ Muskeln ebenfalls signifikant erhöht ($234,1 \pm 34,6$ % vs. $90,9 \pm 22,7$ %). Die Restkontraktur nach 60 min Reperfusion (genormt an der Zuckungskraft vor simulierter Ischämie; $F_{k,60'Reperf}/F_t$) war bei $\alpha B^{-/-}$ Muskeln gegenüber den wt-Muskeln signifikant erhöht ($55,8 \pm 17,1$ % vs. $21,3 \pm 7,7$ %). Die Zuckungskräfte nach 60 min Reperfusion (genormt an der Zuckungskraft vor Ischämie, $F_{t,60'Reperf}/F_t$) unterschieden sich hingegen nicht signifikant. $\alpha B^{-/-}$ Muskeln zeigten unter simulierter Ischämie und Reperfusion somit eine stärkere Einschränkung der Kontraktilität als wt-Muskeln, was für einen protektiven Effekt von αB -Crystallin bei kardialer Ischämie sprechen würde.

Nach 60 min Reperfusion wurde eine Einzelzuckung aufgezeichnet (s. Abbildung 2-3), um die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft (T_{tp}) sowie die halbmaximale Relaxationszeit (R_{50}) zu diesem Zeitpunkt zwischen $\alpha B^{-/-}$ und wt-Muskeln zu vergleichen. Die T_{tp} der $\alpha B^{-/-}$ Muskeln war gegenüber wt-Muskeln signifikant, die R_{50} nicht signifikant verkürzt (s. Tabelle 3-3).

Unsere Ergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass isolierte Papillarmuskeln αB -Crystallin gendeletierter Mäuse unter Kontrollbedingungen kein unterschiedliches Kontraktionsverhalten bezüglich verschiedener Parameter zeigten. Bei simulierter Ischämie trat jedoch die Kontraktur signifikant früher ein und war von stärkerem Ausmaß. Die Kontraktur bildete sich während der Reperfusion bei $\alpha B^{-/-}$ Präparaten schlechter zurück als bei wt-Präparaten. Die Kontraktionskraft von $\alpha B^{-/-}$ und wt-Muskeln zeigte jedoch zu keinem Zeitpunkt der Ischämie oder Reperfusion signifikante Unterschiede. Übertragen auf das Gesamtherz weist dies auf eine gestörte diastolische Relaxation bei $\alpha B^{-/-}$ Mäusen unter Ischämie und Reperfusion hin, wohingegen die systolische Funktion nicht beeinträchtigt zu sein scheint.

4 Diskussion

Charakterisierung der Kraft-Frequenz-Beziehung des Mäuse-Myokards

In der kardiologischen Forschung ist das Modell isolierter Herzmuskelstreifen im Organbad von großer Bedeutung für die Untersuchung verschiedenster Einflüsse auf die kontraktilen Eigenschaften des Myokards. Von zunehmendem Interesse sind dabei Herzmuskelpräparate der Maus, da durch die Möglichkeiten der Gendelektion und Genüberexpression viele Mausmodelle kardiovaskulärer Erkrankungen zur Verfügung stehen. Wir nutzten dieses Modell im Rahmen unserer Frage nach der kardialen Funktion von α B-Crystallin zur Untersuchung der Kontraktilität isolierter Herzmuskelpräparate α B-Crystallin gendeletierter Mäuse.

Das physiologische Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelstreifen der Maus im Organbad ist allerdings bisher schlecht untersucht. Zur Beurteilung der Kontraktilität wird beispielsweise häufig die Kraft-Frequenz-Beziehung herangezogen, die etwa beim gesunden menschlichen Myokard positiv ist, bei Herzinsuffizienz jedoch negativ wird (MEUSE *et al.*, 1992; SCHILLINGER *et al.*, 1998). Während Studien über die Kraft-Frequenz-Beziehung großer Säuger übereinstimmend einen positiven Verlauf derselben belegen (BUCKLEY *et al.*, 1972; PENEFSKY *et al.*, 1972), divergieren die veröffentlichten Ergebnisse bezüglich des Verlaufs der Kraft-Frequenz-Beziehung von kleinen Säugern (Ratten und Mäusen) erheblich. Sucht man in der Literatur nach Angaben über den physiologischen Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung der Maus, so finden sich Aussagen, die von „negativ“ bis „stark positiv“ reichen (BLUHM *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 1999; WOLSKA & SOLARO, 1996). Wir vermuten, dass diese z. T. widersprüchlichen Aussagen darin begründet liegen, dass von den Autoren jeweils verschiedene, teils unphysiologische Versuchsbedingungen (z. B. $[Ca^{2+}] = 2,5$ mM, Raumtemperatur, isometrische Kontraktionsbedingungen) zugrunde gelegt wurden. Im Rahmen der Anfertigung der vorliegenden Arbeit untersuchten wir deshalb zunächst systematisch den Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration und der Temperatur auf die Kraft-Frequenz-Beziehung von Mäuse-Myokard und versuchten, die optimalen Versuchsbedingungen für Untersuchungen an isolierten Herzmuskelpräparaten der Maus zu definieren.

Als Versuchspräparate wählten wir den isolierten linksventrikulären anterioren Papillarmuskel der Maus, da dieser als unversehrter Muskel im Ganzen präpariert werden kann und bei vergleichbaren Tieren eine ähnliche Größe aufweist. Seine Dicke von durchschnittlich 0,5 – 0,6 mm kann, was die vollständige Versorgung des Präparates mit Nährstoffen anbelangt, als grenzwertig betrachtet werden. Für Muskelpräparationen aus dem Ventrikel der Ratte wurden von SCHOUTEN & TER KEURS (1986) Myokardtrabekel mit einem Durchmesser von etwa 0,2 mm als optimal angesehen. Im Mäuse-Myokard sind Trabekel mit diesem Durchmesser in ausreichender Länge allerdings nicht verfügbar. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Muskelpräparate im Organbad zu garantieren, werden üblicherweise die Stimulationsfrequenz und die Temperatur unter die physiologischen Werte gesenkt (z. B. Reizung bei 1 Hz; Raumtemperatur).

Ein Hinweis auf eine ausreichende Energieversorgung unserer Muskelpräparate ist die Konstanz der Ruhespannung in der Adaptationsphase. War diese nicht konstant, wurden die Präparate verworfen. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Energieversorgung bei 1 Hz nicht nur ausreichend ist, sondern dass sogar noch eine gewisse Energiereserve besteht, ist die Beobachtung einer unter bestimmten Versuchsbedingungen flachen bzw. positiven Kraft-Frequenz-Beziehung im Bereich von 1 – 4 Hz. Da die Zuckungskraft unter diesen Bedingungen erst bei Stimulationsfrequenzen über 5 Hz abnahm, scheint die kritische Frequenz für die Energieversorgung der Präparate bei dieser Frequenz erreicht, unterhalb aber ausreichend zu sein. Die von unseren Präparaten entwickelten Zuckungskräfte (5 – 10 mN/mm² bei 1 Hz, Maximalkräfte zwischen 10 und 25 mN/mm² unter Isometrie) waren außerdem mit anderen in der Literatur veröffentlichten Werten vergleichbar (s. BLUHM 2000; MEYER *et al.*, 1999). Bei der Frage der Energieversorgung ist auch die Ca²⁺-Konzentration im Organbad zu beachten. Ca²⁺-Konzentrationen von z. B. 2,5 mM, die von vielen Arbeitsgruppen gewählt werden, und die über das physiologische Maß hinausgehen, steigern die Kontraktionskraft und damit den Stoffwechsel der Kardiomyozyten. Die Energieversorgung könnte dann bereits unter niedrigen Stimulationsfrequenzen kritische Werte erreichen. Eine Absenkung der Temperatur im Organbad könnte hingegen sinnvoll sein, um den Energiebedarf der Myozyten zu senken. Allerdings beeinflusst dies (u. a. durch eine Senkung der Ca²⁺-Sensitivität des kontraktile Apparates) die Kontraktilität der Myozyten. Versuche bei

Raumtemperatur scheinen vor diesem Hintergrund ungeeignet. Wir schlagen 32 °C als optimale Versuchstemperatur vor.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Kraft-Frequenz-Beziehung des isolierten Papillarmuskels der Maus im entscheidenden Frequenzbereich von 1 – 4 Hz in Abhängigkeit von extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration und Temperatur positiv und negativ sein kann. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen und Temperaturen ($[\text{Ca}^{2+}] = 1,5$ mM, Temp. = 27 °C, Isometrie) ist sie positiv (Anstieg der Zuckungskraft bei 4 Hz auf das 2,5-fache der Zuckungskraft bei 1 Hz), bei einer Steigerung der Ca^{2+} -Konzentration und / oder der Temperatur kommt es zu einer Abflachung der Kraft-Frequenz-Beziehung. Bei Ca^{2+} -Konzentrationen von 5,0 mM und Temperaturen von 37 °C ist die Kraft-Frequenz-Beziehung der Maus negativ.

Damit lässt sich der von BLUHM *et al.* (2000) und MEYER *et al.* (1999) beobachtete negative Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung des Mäuse-Myokards auf eine von diesen Gruppen unphysiologisch hoch gewählte Ca^{2+} -Konzentration zurückführen (2,0 bzw. 2,5 mM). Der von GAO und Mitarbeiter (1998) beobachtete stark positive Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung (7-facher Anstieg der Zuckungskraft bei einer Steigerung der Stimulationsfrequenz von 0,2 auf 7 Hz) ist nach unseren Untersuchungen am wahrscheinlichsten durch die unphysiologisch niedrig gewählten Ca^{2+} -Konzentrationen (1,0 mM) und Temperaturen (Raumtemperatur) zu erklären.

Unsere Befunde stimmen hingegen gut mit den von LAYLAND & KENTISH (1999) an der Ratte erhobenen Ergebnissen überein. Die Autoren zeigten, dass die Kraft-Frequenz-Beziehung von Myokardtrabekeln der Ratte bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,0 mM positiv ist und durch Anheben der Ca^{2+} -Konzentration auf bis zu 8,0 mM negativ wird. Auch die Ergebnisse bezüglich des Temperatureinflusses zeigten einen ähnlichen Trend.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss auxotoner Kontraktionsbedingungen auf die Kraft-Frequenz-Beziehung der Maus systematisch untersucht. Wenn es laut KRUEGER & POLLAK (1975) auch nicht als gesichert angenommen werden kann, dass isometrisch montierte Muskelpräparate tatsächlich ohne jegliche Verkürzung des Sarkomers kontrahieren, so ist dennoch davon auszugehen, dass die auxotone Montage von Muskelpräparaten der physiologischen Situation wesentlich näher kommt. Unter auxotonen Kontraktionsbedingungen fanden

wir – bei sonst gleichen Versuchsbedingungen – flacher verlaufende Kraft-Frequenz-Beziehungen als bei isometrischen Kontraktionsbedingungen. Wie HOUSEMANS *et al.* (1983) und LAB *et al.* (1984) zeigen konnten, geht die auxotone Kontraktion mit einem gegenüber der isometrischen Kontraktion verlängerten Aktionspotential und einer höheren intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einher. Dies könnte zur Folge haben, dass durch Frequenzerhöhung die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht mehr so stark gesteigert werden kann, so dass es zu einem flacheren Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung kommt.

Wählt man die Versuchsbedingungen also so, dass sie die physiologischen Bedingungen im Organbad optimal widerspiegeln ($[\text{Ca}^{2+}] = 1,5 \text{ mM}$, Temp. = 32 °C, Auxotonie), verläuft die Kraft-Frequenz-Beziehung im Frequenzbereich von 1 – 4 Hz, der den Herzfrequenzen der Maus *in vivo* entspricht, flach. Unsere Befunde wurden kürzlich durch *in vivo* - Untersuchungen zur Kraft-Frequenz-Beziehung an anästhesierten Mäusen bestätigt (GEORGAKOPOULOS & KASS, 2001). Übereinstimmend mit unseren Resultaten fanden die Autoren eine flach verlaufende Kraft-Frequenz-Beziehung im physiologischen Frequenzbereich der Maus. Dies zeigt, dass die im Organbad erhobenen Parameter der Kraft-Frequenz-Beziehung die physiologische Situation *in vivo* praktisch unverfälscht widerspiegeln.

Wie in Kap. 1.1 ausgeführt, spielt eine positiv verlaufende Kraft-Frequenz-Beziehung beim Menschen neben anderen intrakardialen Mechanismen sowie der Inotropiesteigerung über die sympathoadrenerge Innervation des Herzens eine bedeutende Rolle bei der Erhöhung des Herz-Zeit-Volumens. Welchen Anteil die einzelnen Mechanismen an der Leistungssteigerung des Herzens jedoch haben, ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich. Große Säuger, wie z. B. der Mensch, können ihre Ruhefrequenz um über 300 % steigern (KASS *et al.*, 1998; ALPERT *et al.*, 1998). Entsprechend der bei diesen Spezies vorliegenden positiven Kraft-Frequenz-Beziehung (s. BUCKLEY *et al.*, 1972; PENEFSKY *et al.*, 1972) ist diese Frequenzsteigerung mit einer deutlichen Steigerung der Kontraktionskraft verbunden. Die Ruhefrequenz kleiner Säuger, auch der Maus, liegt jedoch nur 30 % unter der maximal möglichen Herzfrequenz (s. KASS *et al.*, 1998; VORNANEN, 1992). Durch Steigerung der Herzfrequenz ist bei diesen Spezies im Vergleich zu großen Säugern also nur eine relativ geringe Erhöhung des Herz-Zeit-Volumens zu erreichen. Möglicherweise sind

kleine Säuger also bei der Steigerung ihres Herz-Zeit-Volumens nicht auf eine stark positive Kraft-Frequenz-Beziehung angewiesen. Es wäre denkbar, dass anderen Mechanismen, wie z. B. dem Frank-Starling-Mechanismus oder einer Inotropiesteigerung durch sympathoadrenerge Innervation im Vergleich zur Kraft-Frequenz-Beziehung eine wesentlich größere Bedeutung bei der Steigerung des Herz-Zeit-Volumens zukommt.

Charakterisierung der Funktion von α B-Crystallin im Herzen

Hinweise auf eine kardioprotektive Funktion von α B-Crystallin kommen aus einer familiären Myopathie und Kardiomyopathie, der eine Mutation des α B-Crystallin - Gens zugrunde liegt (VICART *et al.*, 1998). Wir haben daher die Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln von α B-Crystallin gendeletierten Mäusen im Organbad untersucht.

Im Organbad war unter Standardbedingungen ($[Ca^{2+}] = 1,5$ mM, Temp. = 32 °C, Auxotonie) kein signifikanter Unterschied in der Zuckungskraft von α B-/- und wt-Muskelpräparaten zu sehen ($2,05 \pm 0,52$ mN/mm² vs. $2,47 \pm 0,46$ mN/mm²). Auch die Charakteristika einer Einzelzuckung (Zeit bis zum Erreichen der maximalen Zuckungskraft, Ttp, und halbmaximale Relaxationszeit, R₅₀) waren nicht signifikant unterschiedlich, so dass sich ein Fehlen von α B-Crystallin unter Ruhebedingungen offensichtlich nicht auf die Myokardkontraktilität auswirkt. Dies passt zu den in der Einleitung erwähnten fehlenden morphologischen und histologischen Unterschieden zwischen Herzen von α B-/- und wt-Mäusen.

GOLENHOFEN *et al.* (1998; 1999) konnten zeigen, dass α B-Crystallin unter kardialer Ischämie sehr schnell vom Zytosol an die Myofibrillen transloziert. Über eine Stabilisierung myofibrillärer Proteine könnte α B-Crystallin unter Ischämie eine protektive Funktion ausüben. Wir haben daher die Papillarmuskeln α B-Crystallin gendeletierter Mäuse im Organbad einer 20-minütigen simulierten Ischämie (Sauerstoff- und Glukose-Entzug) und einer 60-minütigen Reperfusion ausgesetzt.

Unter simulierter Ischämie beobachteten wir bei allen Muskelpräparaten einen Anstieg der Ruhespannung. Diese Kontraktur setzte bei den α B-/- Muskeln signifikant früher ein ($7,4 \pm 1,8$. vs. $13,1 \pm 1,8$ min) und war von stärkerem Ausmaß als bei wt-Muskeln ($234,1 \pm 34,6$ % vs. $90,9 \pm 22,7$ % bezogen auf die Zuckungskraft vor Ischämie). Nach

der 60-minütigen Reperfusionphase blieb die Kontraktur der α B-/- Muskeln im Vergleich zu wt-Muskeln signifikant erhöht ($55,8 \pm 17,1$ % vs. $21,3 \pm 7,7$ % in Relation zur Zuckungskraft vor simulierter Ischämie). Die Zuckungskräfte nach 60 min Reperfusion unterschieden sich dagegen nicht signifikant ($47,3 \pm 6,9$ % vs. $56,5 \pm 2,9$ % der Zuckungskraft vor simulierter Ischämie).

Wir konnten somit erstmals zeigen, dass das Fehlen von α B-Crystallin eine eingeschränkte Kontraktilität des Myokards unter Ischämie und Reperfusion zur Folge hat. Dabei scheint weniger die Zuckungskraft beeinträchtigt zu sein, als vielmehr die Kontraktorentwicklung. Bezogen auf das Gesamtherz bedeutet dies, dass das Fehlen von α B-Crystallin weniger die systolische Funktion als vielmehr die diastolische Relaxation betrifft. Dieser Befund passt zu der Beobachtung, dass α B-Crystallin unter Ischämie an das elastische Titin-Filamentsystem bindet (GOLENHOFEN *et al.*, 1998), denn die mangelnde diastolische Relaxationsfähigkeit während Ischämie und Reperfusion lässt sich gut durch eine Schädigung des elastischen Titin-Filaments erklären. Möglicherweise kann α B-Crystallin durch die Bindung an Titin die Konformation der elastischen Titin-Domänen unter Ischämie schützen und so die Elastizität des Titin-Proteins während und vor allem nach Ischämie bewahren.

Die kardioprotektive Wirkung von α B-Crystallin scheint sich also weniger auf die Aufrechterhaltung der systolischen Kontraktionskraft, als vielmehr auf die Aufrechterhaltung der diastolischen Relaxationsfähigkeit, also die Verhinderung einer restriktiven diastolischen Insuffizienz zu beziehen. Die entscheidende Bedeutung der diastolischen Relaxationsfähigkeit für die Effektivität der Herzaktion spiegelt sich nicht nur in den klinischen Erfahrungen mit der Restriktiven Kardiomyopathie, sondern auch in den gerade im Zusammenhang mit Myokardinfarkten häufig beobachteten, folgeschweren Einschränkungen der diastolischen Relaxationsfähigkeit im Rahmen des „Remodelling“ wider.

Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass die untersuchte α B-Crystallin gendeletierte Maus eine zweite Gendeletion enthält, und zwar des MKBP- (Myotonin-Kinase-bindendes-Protein) bzw. HspB2-Gens (BRADY *et al.*, 2001; SUZUKI *et al.*, 1998). Es handelt sich um ein Protein mit sehr großer Homologie zu α B-Crystallin, das ebenfalls der Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine

zugerechnet wird. Das HspB2-Gen liegt in einem Abstand von nur 958 bp Kopf an Kopf am α B-Crystallin-Gen, wird möglicherweise vom selben Promoter reguliert und wird in entgegengesetzter Richtung zum α B-Crystallin-Gen abgelesen (IWAKI *et al.*, 1997). Laut IWAKI haben Genprodukte derart lokalisierter Gene häufig strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten. HspB2 wird ähnlich wie α B-Crystallin im Skelett- und Herzmuskel, nicht aber in der Linse exprimiert. Die Funktion dieses Proteins ist jedoch unbekannt. Aufgrund der großen Homologie des Proteins zu α B-Crystallin kann man davon ausgehen, dass beide Proteine ähnliche Funktionen erfüllen. HspB2 assoziiert z. B. ähnlich wie α B-Crystallin unter kardialer Ischämie mit myofibrillären Proteinen im Bereich der Z-Scheibe/I-Bande (YOSHIDA *et al.*, 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse müssen also vor dem Hintergrund interpretiert werden, dass ihnen sowohl das Fehlen von α B-Crystallin alleine, das Fehlen von HspB2 alleine, als auch ein Summationseffekt des Fehlens beider Proteine zugrunde liegen kann. Für einen durch α B-Crystallin vermittelten kardioprotektiven Effekt sprechen Untersuchungen an α B-Crystallin überexprimierenden Mäusen von MARTIN *et al.* (2002) und RAY *et al.* (2001). Unter physiologischen Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den transgenen und den Kontrolltieren, jedoch war die postischämische Erholung der transgenen Mäuseherzen (gemessen am maximalen linksventrikulären Druck und der Anstiegssteilheit der Muskelzuckung) signifikant besser als bei Kontrolltieren. Auch die Infarktgröße sowie die Apoptoserate war bei den transgenen Tieren geringer.

Inwieweit der in dieser Arbeit beobachtete kardioprotektive Effekt von α B-Crystallin (oder HspB2) für das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung mit verantwortlich ist, bleibt offen. Für die verzögerte Protektion nach ischämischer Präkonditionierung wird eine Beteiligung von Stressproteinen angenommen (s. BAXTER & FERDINANDY, 2001; BOLLI, 2000; PAGLIARO *et al.*, 2001). Für die sofortige Protektion werden allerdings andere Mechanismen diskutiert (s. KLONER & JENNINGS, 2001a; KLONER & JENNINGS, 2001b; SCHULZ *et al.*, 2001; PAGLIARO *et al.*, 2001; EATON *et al.*, 2000), da die Zeit zur Proteinsynthese nicht ausreichend ist. α B-Crystallin nimmt unter den Stressproteinen insofern eine Sonderstellung ein, als es bereits konstitutiv im Zytosol der Kardiomyozyten in hoher Konzentration vorliegt (1 – 2 % der

löslichen Proteine; GOLENHOFEN *et al.*, 1998). Die Proteinbiosynthese von α B-Crystallin müsste somit nicht erst induziert werden. α B-Crystallin transloziert unter Ischämie sehr schnell (innerhalb von Minuten) an seinen myofibrillären Bindungspartner Titin und könnte so durch Stabilisierung des Titin-Filamentsystems einen kardioprotektiven Effekt im Rahmen der klassischen ischämischen Präkonditionierung ausüben.

5 Zusammenfassung

Eine familiäre Myopathie und Kardiomyopathie, der eine Missense-Mutation des α B-Crystallin-Gens zugrunde liegt, weist auf eine wichtige Bedeutung des Stressproteins α B-Crystallin im Herzen hin. Die chaperone-ähnlichen Eigenschaften von α B-Crystallin und die unter kardialer Ischämie zu beobachtende schnelle Translokation vom Zytosol an das elastische Titin-Filamentsystem lassen eine protektive Rolle von α B-Crystallin unter Stressbedingungen vermuten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine eventuelle kardioprotektive Funktion von α B-Crystallin durch die Charakterisierung α B-Crystallin gendelezierter Mäuse nachzuweisen. Wir etablierten hierfür ein Versuchssystem zur Untersuchung der Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln im Organbad.

Im Rahmen des Aufbaus unseres Versuchssystems untersuchten wir zunächst den Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration, der Temperatur und der Kontraktionsbedingungen (Auxotonie vs. Isometrie) auf die Kraft-Frequenz-Beziehung von murinem Myokard. Wir konnten zeigen, dass die Kraft-Frequenz-Beziehung von Myokardpräparaten der Maus von den genannten Versuchsbedingungen abhängig ist. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen und Temperaturen ($[\text{Ca}^{2+}] = 1,0 \text{ mM}$, Temp. = $27 \text{ }^\circ\text{C}$) ist sie positiv, flacht bei zunehmender Ca^{2+} -Konzentration und Temperatur ab und ist für $[\text{Ca}^{2+}] = 5,0 \text{ mM}$, Temp. = $37 \text{ }^\circ\text{C}$ negativ. Auxotone Kontraktionsbedingungen führen im Vergleich zu isometrischen bei gleichen Ca^{2+} -Konzentrationen und Temperaturen zu einem flacheren Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung. Unter annähernd physiologischen Bedingungen verläuft die Kraft-Frequenz-Beziehung des Mäuse-Myokards flach bis leicht positiv. Im Gegensatz zum Menschen scheinen somit bei der Maus für eine Steigerung des Herz-Zeit-Volumens andere Mechanismen als eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung von Bedeutung zu sein. Hierbei ist insbesondere der Frank-Starling-Mechanismus und die sympathoadrenerge Innervation des Herzens zu erwähnen.

Zur Charakterisierung der kardialen Funktion von α B-Crystallin untersuchten wir die Kontraktilität isolierter Papillarmuskeln von Wildtyp- und α B-Crystallin gendelezierten Mäusen unter simulierter Ischämie (Glucose- und Sauerstoffentzug) und Reperfusion im Organbad. Unter Kontrollbedingungen zeigten sich zwischen wt- und α B-/- Muskeln keine Unterschiede in der Zuckungskraft, der Geschwindigkeit der Kraftentwicklung

und der Relaxationszeit. Die während der 20-minütigen simulierten Ischämie entwickelte Kontraktur setzte jedoch bei den α B^{-/-} Muskeln signifikant früher ein und verlief signifikant stärker als bei wt-Muskeln. Nach einer 60-minütigen Reperfusionphase blieb die Kontraktur der α B^{-/-} Muskeln im Vergleich zu wt-Muskeln signifikant erhöht. Bezüglich Zuckungskraft, Geschwindigkeit der Kraftentwicklung und Relaxationszeit zeigten sich weder während noch nach simulierter Ischämie deutliche Unterschiede zwischen den Muskeln beider Mäusestämme. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Fehlen von α B-Crystallin am Gesamtherz nicht zu einer Störung der systolischen Herzfunktion, sondern zu einer eingeschränkten myokardialen Relaxationsfähigkeit unter Ischämie und Reperfusion führen würde. Da α B-Crystallin unter kardialer Ischämie an das elastische Titin-Filamentsystem bindet, könnten die elastischen Eigenschaften des Myokards unter Ischämie durch einen Mangel an α B-Crystallin derart beeinträchtigt werden, dass es zu einer höheren Rigidität der Muskulatur kommt. Eine Funktion von α B-Crystallin im Herzen ist somit möglicherweise die Aufrechterhaltung der elastischen Eigenschaften des Myokards unter kardialer Ischämie und Reperfusion.

6 Literaturverzeichnis

- ALKHULAIFI, A.M., PUGSLEY, W.B., YELLON, D.M. (1993) The influence of the time period between preconditioning ischemia and prolonged ischemia on myocardial protection. *Cardioscience* 4: 163-169
- ALPERT, N. R., LEAVITT, B. J., ITTLEMAN, F. P., HASENFUSS, G., PIESKE, B., MULIERI, L. A. (1998) A mechanistic analysis of the force-frequency relation in non failing and progressively failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 93: Suppl 1, 23-33
- ANTONI, H. (1997) Erregungsphysiologie des Herzens. In: SCHMIDT, R. F., THEWS, G., *Physiologie des Menschen*, 27. Auflage, Springer-Verlag
- BARBATO, R., MENABO, R., DAINESE, P., CARAFOLI, E., SCHIAFFINO, S., DI LISA, F. (1996) Binding of cytosolic proteins to myofibrils in ischemic rat hearts. *Circ Res* 78: 821-828
- BAXTER, G.F., FERDINANDY, P. (2001) Delayed preconditioning of myocardium: current perspectives. *Basic Res Cardiol* 96: 329-344
- BAXTER, G.F., GOMA, F.M., YELLON, D.M. (1997) Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol* 92: 159-167
- BENJAMIN, I. J., MCMILLAN, D. R. (1998) Stress (heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83: 117-132
- BERRY, V., FRANCIS, P., REDDY, M.A., COLLYER, D., VITHANA, E., MACKAY, I., DAWSON, G., CAREY, A.H., MOORE, A., BHATTACHARYA, S.S., QUINLAN, R.A. (2001) Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet* 69: 1141-1145
- BERS, D. M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205
- BHAT, S.P., NAGINENI, C.N. (1989) Alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 319-325
- BLUHM, W. F., KRANIAS, E. G., DILLMANN, W. H., MEYER, M. (2000) Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol* 278: H245-H255
- BOELENS, W.C., CROES, Y., DE RUWE, M., DE REU, L., DE JONG, W.W. (1998a) Negative charges in the C-terminal domain stabilize the alpha B- crystallin complex. *J Biol Chem* 273: 28085-28090
- BOLLI, R. (2000) The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87: 972-983

- BOWDITCH, H.P. (1871) Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sachs Ges Wiss* 23: 652-689
- BRADY, J. P., GARLAND, D. L., GREEN, E., TAMM, E. R., GIBLIN, F. J., WAWROUSSEK, E. F. (2001) α B-Crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2924-2934
- BRIXIUS, K., PIETSCH, M., SCHWINGER, R.H.G. (1999) The intracellular Ca^{2+} -homeostasis influences the force-frequency relation in man. *Basic Res Cardiol* 94:152-158
- BUCKLEY, N.M., PENEFSKY, Z.J., LITWAK, R.S. (1972) Comparative force-frequency relationships in human and other mammalian ventricular myocardium. *Pfluegers Arch* 332: 259-270
- CARVER, J.A., GUERREIRO, N., NICHOLLS, K.A., TRUSCOTT, R.J. (1995) On the interaction of alpha-crystallin with unfolded proteins. *Biochim Biophys Acta* 1252: 251-260
- CARVER, J.A., AQUILINA, J.A., TRUSCOTT, R.J., RALSTON, G.B. (1992) Identification by 1H NMR spectroscopy of flexible C-terminal extensions in bovine lens alpha-crystallin. *FEBS Lett* 311: 143-149
- CHIESI, M., LONGONI, S., LIMBRUNO, U. (1990) Cardiac alpha-crystallin. III. Involvement during heart ischemia. *Mol Cell Biochem* 97: 129-136
- CROZATIER, B. (1998) Force-frequency relations in nonfailing and failing animal myocardium. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1: 46-50
- DERHAM, B.K., HARDING, J.J. (1999) Alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Prog Retin Eye Res* 18: 463-509
- DRENCKHAHN, D. (2003) Allgemeine Gewebelehre. In: BENNINGHOFF-DRENCKHAHN, *Anatomie*, 16. Aufl., Urban & Fischer Verlag
- DUBIN, R.A., WAWROUSEK, E.F., PIATIGORSKY, J. (1989) Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol Cell Biol* 9: 1083-1091
- EATON, P., AWAD, W.I., MILLER, J.I.A., HEARSE, D.J., SHATTOCK, M.J. (2000) Ischemic preconditioning: a potential role for constitutive low molecular weight stress protein translocation and phosphorylation? *J Mol Cell Cardiol* 32: 961-971
- FRANK, O. (1895) Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* 32: 370-437
- FUCHS, F., SMITH, S.H. (2001) Calcium, cross-bridges and the Frank-Starling relationship. *News Physiol Sci* 16: 5-10
- GAO, W.D., PEREZ, N.G., MARBAN E. (1998) Calcium cycling and and contractile activation in intact mouse cardiac muscle. *J Physiol (Lond)* 507: 175-184

- GEORGAKOPOULOS, D., KASS, D. (2001) Minimal force-frequency modulation of inotropy and relaxation of in situ murine heart. *J Physiol* 534.2: 535-545
- GOLENHOFEN, N., HTUN, P., NESS, W., KOOB, R., SCHAPER, W., DRENCKHAHN, D. (1999) Binding of the stress protein alpha B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 31: 569-580
- GOLENHOFEN, N., NESS, W., KOOB, R., HTUN, P., SCHAPER, W., DRENCKHAHN, D. (1998) Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein alpha B-crystallin to Z lines of myocardium. *Am J Physiol* 274: H1457-1464
- GROENEN, P.J., MERCK, K.B., DE JONG, W.W., BLOEMENDAL, H. (1994) Structure and modifications of the junior chaperone alpha-crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur J Biochem* 225: 1-19
- HALEY, D.A., HORWITZ, J., STEWART, P.L. (1998) The small heat-shock protein alpha B-crystallin has a variable quaternary structure. *J Mol Biol* 277: 27-35
- HOOK, D.W., HARDING, J.J. (1997a) Inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by sugars, prednisolone-21-hemisuccinate, cyanate and other small molecules. *Biochim Biophys Acta* 1362: 232-242
- HOOK, D.W., HARDING, J.J. (1997b) Molecular chaperones protect catalase against thermal stress. *Eur J Biochem* 247: 380-385
- HORWITZ, J. (2000) The function of alpha-crystallin in vision. *Semin Cell Dev Biol* 11: 53-60
- HORWITZ, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10449-10453
- HOUSMANS, P.R., LEE, N.K., BLINKS, J.R. (1983) Active shortening retards the decline of the intracellular calcium transient in mammalian heart muscle. *Science* 221: 159-161
- INGOLIA, T.D., CRAIG, E.A. (1982) Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2360-2364
- IWAKI, A., NAGANO, T., NAKAGAWA, M., IWAKI, T., FUKUMAKI, Y. (1997) Identification and characterization of the gene encoding a new member of the alpha-crystallin/small hsp family, closely linked to the alpha B-crystallin gene in a head-to-head manner. *Genomics* 45: 386-394
- KASS, D. A., HARE, J. M., GEORAKOPOULOS, D. (1998) Murine cardiac function. A cautionary tail. *Circ Res* 82: 519-522

- KLEMENZ, R., FROEHLI, E., STEIGER, R.H., SCHAFER, R., AOYAMA, A. (1991) Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3652-3656
- KLONER, R.A., JENNINGS, R.B. (2001a) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 104: 2981-2989
- KLONER, R.A., JENNINGS, R.B. (2001b) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 104: 3158-3167
- KLONER, R.A., BOLLI, R., MARBAN, E., REINLIB, L., BRAUNWALD, E. (1998) Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. *Circulation* 97: 1848-1867
- KRUEGER, J.W., POLLAK, G.H. (1975) Myocardial sarcomere dynamics during isometric contraction. *J Physiol* 251: 627-643
- KUZUYA, T., HOSHIDA, S., YAMASHITA, N., FUJI, H., OE, H., HORI, M., KAMADA, T., TADA, M. (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 72: 1293-1299
- LAB, M.J., ALLEN, D.G., ORCHARD, C.H. (1984) The effects of shortening on myoplasmic calcium concentration and on the action potential in mammalian ventricular muscle. *Circ Res* 55: 825-829
- LATCHMAN, D.S. (2001) Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiov Res* 51:637-646
- LAYLAND, J., KENTISH, J.C. (1999) Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol* 276: H9-H18
- LITT, M., KRAMER, P., LAMORTICELLA, D.M., MURPHEY, W., LOVRIEN, E.W., WELEBER, R.G. (1998) Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet* 7: 471-474
- LIU, C., WELSH, M.J. (1999) Identification of a site of Hsp27 binding with Hsp27 and alpha B-crystallin as indicated by the yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 256-261
- MARTIN, J.L., BLUHM, W.F., HUAPING, H., MESTRIL, R., DILLMANN, W.H. (2002) Mutation of COOH-terminal lysines in overexpressed α B-crystallin abrogate ischemic protection in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H85-H91

- MARTIN, J.L., MESTRIL, R., HILAL-DANDAN, R., BRUNTON, L.L., DILLMANN, W.H. (1997) Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation*, 96, 4343-4348
- MEUSE, A. J., PERREAULT C. L., MORGAN J.P. (1992) Pathophysiology of cardiac hypertrophy and failure of human working myocardium: abnormalities in calcium handling. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 1: 223-233
- MEYER, M., BLUHM, W.F., HE, H., POST, S.R., GIORDANO, F.J., LEW, W.Y., DILLMANN, W.H. (1999) Phospholamban - to SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *Am J Physiol* 276: H779-H785
- MURRY, C.E., RICHARD, V.J., JENNINGS, R.B., REIMER, K.A. (1991) Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 260: H796-804
- MURRY, C.E., JENNINGS, R.B., REIMER, K.A. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136
- PAGLIARO, P., GATTULLO, D., RASTALDO, R., LOSANO, G. (2001) Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection. *Life Sci* 69: 1-15
- PENEFSKY, Z.J., BUCKLEY, N.M., LITWAK, R.S. (1972) Effect of temperature and calcium on force-frequency relationships in mammalian ventricular myocardium. *Pfluegers Arch* 332: 271-282
- PIOT, C., LEMAIRE, S., ALBAT, B., SEGUIN, J., NARGEOT, J., RICHARD, S. (1996) High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* 93: 120-128
- RADFORD, N.B., FINA, M., BENJAMIN, I.J., MOREADITH, R.W., GRAVES, K.H., ZHAO, P., GAVVA, S., WIETHOFF, A., SHERRY, A.D., MALLOY, C.R., WILLIAMS, R.S. (1996) Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2339-2342
- RAY, P.S., MARTIN, J.L., SWANSON, E.A., OTANI, H., DILLMANN, W.H., DAS, D.K. (2001) Transgene overexpression of α B-crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion *FASEB J* 15: 393-402
- RAYMENT, I., RYPNIEWSKI, W.R., SCHMIDT-BASE, K., SMITH, R., TOMCHICK, D.R., BENNING, M.M., WINKELMANN, D.A., WESENBERG, G., HOLDEN, H.M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261:50-58
- RITOSSA, F. (1962) A new puffing pattern induced and temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573

- RÜEGG, J. C. (1997) Muskel. In: SCHMIDT, R. F., THEWS, G., *Physiologie des Menschen*, 27. Auflage, Springer-Verlag
- SACK, S., MOHRI, M., ARRAS, M., SCHWARZ, E.R., SCHAPER, W. (1993) Ischemic preconditioning - time course of renewal in the pig. *Cardiovasc Res* 27: 551-555
- SCHILLINGER, W., LEHNART, S.E., PRESTLE, J., PREUSS, M., PIESKE, B., MAIER, L.S., MEYER, M., JUST, H., HASENFUSS, G. (1998) Influence of SR-Ca²⁺-ATPase and Na⁺-Ca²⁺-exchanger on the force-frequency relation. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1: 38-45
- SCHOUTEN, V.J., TER KEURS, H.E. (1986) The force-frequency relationship in rat myocardium. The influence of muscle dimensions. *Pfluegers Arch* 407: 14-17
- SCHULZ, R., COHEN, M.V., BEHRENDTS, M., DOWNEY, J.M., HEUSCH, G. (2001) Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 52: 181-198
- SCHWINGER, R. H. G., BÖHM, M., SCHMIDT, U., KARCZEWSKI, P., BAVENDIEK, U., FLESCH, M., KRAUSE, E.-G., ERDMANN, E. (1997) Unchanged protein levels of SERCA 2a and phospholamban but reduced Ca²⁺-uptake and Ca²⁺-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from patients with dilated cardiomyopathy compared to non-failing patients. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 286-292
- SIEZEN, R.J., ARGOS, P. (1983) Structural homology of lens crystallins. III. Secondary structure estimation from circular dichroism and prediction from amino acid sequences. *Biochim Biophys Acta* 748: 56-67
- STARLING, E. H. (1897) The compensating mechanism of the heart. *Lancet* 1: 569-572
- SUGIYAMA, Y., SUZUKI, A., KISHIKAWA, M., AKUTSU, R., HIROSE, T., WAYE, M.M., TSUI, S.K., YOSHIDA, S., OHNO, S. (2000) Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J Biol Chem*, 275, 1095-1104
- SUZUKI, A., SUGIYAMA, Y., HAYASHI, Y., NYU-I, N., YOSHIDA, M., NONAKA, I., ISHIURA, S., ARAHATA, K., OHNO, S. (1998) MKBP, a novel member of the small heat shock protein family, binds and activates the myotonic dystrophy protein kinase. *J Cell Biol* 140: 1113-1124
- TROST, S.U., OMENS, J.H., KARLON, W.J., MEYER, M., MESTRIL, R., COVELL, J.W., DILLMANN, W.H. (1998) Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70. *J Clin Invest* 101(4): 855-862
- VANHOUDT, J., AERTS, T., ABGAR, S., CLAUWAERT, J. (1998) Quaternary structure of bovine alpha-crystallin: influence of temperature. *Int J Biol Macromol* 22: 229-237

- VORNANEN, M. (1992) Maximum heart rate of soricine shrews: correlation with contractile properties and myosin composition. *Am J Physiol* 262: R842-R851
- VICART, P., CARON, A., GUICHENEY, P., LI, Z., PRÉVOST, M.-C., FAURE, A., CHATEAU, D., CHAPON, F., TOMÉ, F., DUPRET, J.-M., PAULIN, D., FARDEAU, M. (1998) A missense mutation in the α B-Crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature genetics* 20: 92-96
- WANG, K., SPECTOR, A. (2000) Alpha-crystallin prevents irreversible protein denaturation and acts cooperatively with other heat-shock proteins to renature the stabilized partially denatured protein in an ATP-dependent manner. *Eur J Biochem* 267: 4705-4712
- WISTOW, G. (1985) Domain structure and evolution in alpha-crystallins and small heat-shock proteins. *FEBS Lett* 181: 1-6
- WOLSKA B. M., SOLARO R. J. (1996) Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am J Physiol* 271: H1250-H1255
- XUAN, Y.T., TANG, X.L., BANERJEE, S., TAKANO, H., LI, R.C., HAN, H., QIU, Y., LI, J.J., BOLLI, R. (1999) Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 84: 1095-1109
- YOSHIDA, K., AKI, T., HARADA, K., SHAMA, K.M., KAMODA, Y., SUZUKI, A., OHNO, S. (1999) Translocation of HSP27 and MKBP in ischemic heart. *Cell Struct Funct* 24: 181-185

Danksagung


Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Detlev Drenckhahn möchte ich für die Überlassung der vorliegenden Arbeit sehr herzlich danken. Dank gilt auch Frau Heike Arthen für die geduldige Anleitung im Labor. Herrn Prof. Dipl. Ing. Dr. Werner Baumgartner danke ich für seine bereitwillige Hilfestellung bei allen statistischen und technischen Fragestellungen.

Ausdrücklicher Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Nikola Golenhofen. Sie stand mir für konstruktive Gespräche, in denen sie mich eine differenzierte Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen und eine kritische Auseinandersetzung mit experimentellen Ergebnissen lehrte, jederzeit zur Verfügung. Ihrem Engagement verdanke ich die Veröffentlichung der gewonnenen Ergebnisse.

Die vorliegende Dissertation ist meiner Familie, besonders meinen Eltern, gewidmet, die mir gemeinsam mein Studium ermöglicht hat.

Ich bestätige, dass ich diese Arbeit alleine und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Würzburg, den 01.12.04


Andreas Redel

Curriculum Vitae – ANDREAS REDEL

Angaben zur Person

Name: Andreas Michael Redel
Anschrift: Klinikstr. 16, 97070 Würzburg
Geburtstag: 03.05.1978 in München
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule an der Toni-Pfülf-Str., München
1988 – 1997 Oskar-von-Miller-Gymnasium, München
27.06.1997 Abitur (Note 1,2)

Zivildienst

1997 – 1998 Tätigkeit im Rettungsdienst und in der Breitenausbildung bei den
Maltesern München

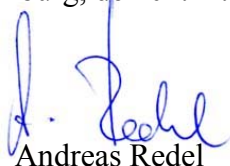
Universitäre Ausbildung

10/1998 – 11/2004 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
12.09.2000 Ärztliche Vorprüfung (Note 1,66)
17.09.2001 1. Staatsexamen (Note 2,00)
01.09.2003 2. Staatsexamen (Note 1,66)
18.11.2004 3. Staatsexamen (Note 1,00),
Ärztliche Prüfung (Gesamtnote 1,46) und Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang

seit 01.12.2004 Wissenschaftlicher Angestellter an der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie der Universität Würzburg,
Direktor Prof. Dr. N. Roewer

Würzburg, den 01.12.04


Andreas Redel