

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Veränderungen im myokardialen Creatinkinase-System gehen der
Entwicklung einer kontraktiven Dysfunktion bei Mäusen mit transgen
verändertem β_1 -adrenergem Rezeptor voraus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Reinhard Niebler
aus Erlangen

Würzburg, März 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. M. Spindler

Koreferent: Prof. Dr. K. Schuh

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2008

Der Promovend ist Arzt

In Dankbarkeit meinen Eltern und meiner Ehefrau Katharina gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden.....	3
2.1. Versuchstiere	3
2.2. Herzpräparation und Herzperfusion	4
2.3. Messung der mechanischen Herzfunktion und Versuchsprotokoll	6
2.4. NMR-Spektroskopie	7
2.4.1. Physikalische Grundlagen	8
2.4.2. NMR-Messapparatur/Technische Daten.....	11
2.4.3. Statistische Auswertung.....	13
2.4.4. Biochemische Analyse.....	13
3. Ergebnisse	14
3.1. Allgemeine Merkmale, Gesamt-CK-Aktivität und CK-Isoenzym- Verteilung bei TG und WT	14
3.2. Herzfunktion und Stoffwechsel der energiereichen Phosphate unter Grundbedingungen.....	16
3.3. Herzfunktion und Stoffwechsel der energiereichen Phosphate während gesteigerter Herzarbeit und der anschließenden Erholung	20
4. Diskussion.....	22
4.1. Die isovolumetrische Kontraktionsleistung bei unterschiedlicher Arbeitsbelastung.....	23
4.2. Myokardialer Energiestoffwechsel und biochemische Veränderungen bei TG und WT	24
5. Zusammenfassung.....	29
6. Abkürzungsverzeichnis	30
7. Literaturverzeichnis	31
8. Verwendete Internetadressen	35

1. Einleitung

Das β -Rezeptorensystem spielt eine wesentliche Rolle in der Modulation von linksventrikulärer Funktion und Herzfrequenz und ist an der Entwicklung der Herzinsuffizienz maßgeblich beteiligt. Der β_1 -Rezeptor ist der vorherrschende Subtyp der β -adrenergen Rezeptoren am Herzen (4, 28). Eine Down-Regulation und Desensibilisierung eben dieser β_1 -Rezeptoren ist ein gemeinsames Charakteristikum der Herzinsuffizienz in experimentellen Tiermodellen und beim Menschen (2, 27, 28, 46). Es ist immer noch Gegenstand der Diskussion, ob die Abnahme der Anzahl und der Funktion der β_1 -Rezeptoren eine Schutz- bzw. Anpassungsreaktion hinsichtlich der Herzinsuffizienz ist, um das Herz vor dem schädlichen Effekt der chronischen neurohumoralen Aktivierung zu schützen oder ob dem Herzen dadurch ein effektiver Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden kardialen Auswurfleistung genommen wird (28). Die pathophysiologische Bedeutung des β -Rezeptorensystems hinsichtlich der Herzinsuffizienz wird durch die Tatsache unterstrichen, dass eine pharmakologische Blockade der β -Rezeptoren zu einer klinischen Besserung und einer längeren Überlebenszeit führt, weshalb die Therapie mit Beta-rezeptorenblockern mittlerweile fester Bestandteil der medikamentösen Standardtherapie der chronischen Herzinsuffizienz ist (6, 47, 48). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass eine herzspezifische Überexpression des β_1 -adrenergen Rezeptors an transgenen Mäusen zur Herzinsuffizienz führt, welche phänotypisch der des Menschen sehr ähnlich ist. Der Modellversuch zeigte insbesondere eine fortschreitende Hypertrophie der Kardiomyozyten, welcher eine Fibrose des linken Ventrikels im höheren Lebensalter folgt (9, 11). Des Weiteren entwickelten diese Tiere eine linksventrikuläre Dysfunktion, welche letztendlich zum klinischen Vollbild einer Linksherzinsuffizienz mit den typischen Symptomen Lungenstauung, Pleuraerguss und Tachypnoe führte (9, 11). Der kausale Zusammenhang zwischen dem kardialen β -Rezeptorensystem und dem biochemischen Mechanismus, welcher zur kontraktile Dysfunktion und nachfolgend zur Herzinsuffizienz führt, ist bislang jedoch noch nicht aufgeklärt. Als ein gemeinsames Charakteristikum der Herzinsuffizienz im experimentellen Modell und beim Menschen konnten typische Veränderungen im myokardialen Stoffwechsel der energiereichen Phosphate nachgewiesen

werden (7, 18, 20, 30, 33, 36, 38, 45, 50). Diese Veränderungen zeigen sich jedoch für gewöhnlich nicht bevor sich nicht auch schon offenkundige Zeichen der linksventrikulären Dysfunktion entwickelt haben.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob Veränderungen im myokardialen Energiestoffwechsel mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei Mäusen mit herzspezifischer Überexpression des β_1 -adrenergen Rezeptors einhergehen oder dieser sogar vorausgehen. Um mögliche auslösende Mechanismen von bereits vorbestehenden Veränderungen unterscheiden zu können, wurden mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie der Gehalt an energiereichen Phosphaten und mittels HPLC und Westernblot der Creatinstoffwechsel in Herzen von Wildtyp- (WT) und β_1 -überexprimierten Mäusen (TG) gemessen, bevor Zeichen der linksventrikulären Dysfunktion nachweisbar waren.

Ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen dem kardialen β -adrenergen System und dem myokardialen Energiestoffwechsel dürfte hinsichtlich der Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien für eine effektive Behandlung der Herzinsuffizienz von großem Nutzen sein.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Generierung der transgenen Mäuse mit herzspezifischer Überexpression des menschlichen β_1 -adrenergen Rezeptors (TG) erfolgte folgendermaßen: Von dem in Abbildung 1 dargestellten Plasmid wurde das Segment isoliert, welches den Promotor für die schwere α -Myosin-Kette und die cDNA für den menschlichen β_1 -adrenergen Rezeptor enthält (11).

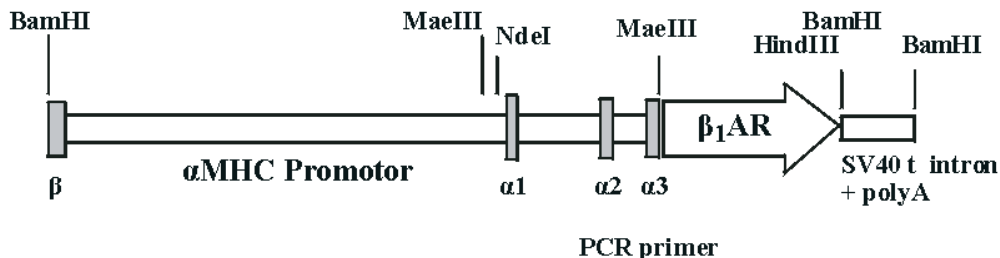


Abb. 1: Transgener Vektor (Erläuterung hierzu siehe Text)

Die gereinigte lineare DNA (1ng/ μ l) wurde gemäß Standard in befruchtete Oozyten von superovulierenden FVB/N Mäusen injiziert. Die injizierten Oozyten wurden anschließend in die Eileiter von pseudoträchtigen CD-1 Mäusen eingepflanzt. Überprüft wurde die Integration des Transgens bei der F_0 -Generation mittels PCR durch einen „sense primer“, 5'-ACG ACT TCA CAT AGA AGC CTA G, der auf dem Promotor für die schwere α -Myosin-Kette lokalisiert ist, und durch einen „antisense primer“, 5'-TGT CCA CTG CTG AGA CAG CG, der auf der den β_1 -Rezeptor kodierenden Sequenz lokalisiert ist.

Für die vorliegende Studie wurden vier Monate alte männliche und weibliche transgene und nicht transgene Versuchstiere verwendet. Die Rezeptordichte im Myokard des linken Ventrikels wurde mittels Radioligand-Bindung mit 125 Iodocyanopindolol bestimmt (10). Der Genotyp jeder Maus wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt (11).

Alle Mäuse wurden in einer speziellen pathogenfreien Umgebung gehalten. Die Erzeugung, Haltung und Untersuchung dieser Mäuse war von den zuständigen Aufsichtsbehörden genehmigt. Das Versuchsprotokoll der vorliegenden Studie

folgte den Richtlinien der American Physiological Society für den Gebrauch und den Umgang mit Versuchstieren.

2.2. Herzpräparation und Herzperfusion

Für die Präparation der Herzen wurde den Tieren 25 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital intraperitoneal zur Betäubung injiziert.

Bei vollständiger Reflexfreiheit wurde das Peritoneum von ventral durch einen transversal verlaufenden Schnitt kurz unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Nach Verlagerung von Leber und Darmkonvolut, welche die Sicht auf das Diaphragma versperrten, erfolgte die Durchtrennung des Diaphragmas. Nach einer medianen Thorakotomie wurde die vordere Brustwand zur Seite geklappt, das Herz mit den Fingern vorsichtig angehoben und unter Einhaltung eines Sicherheitsabstandes erfolgte die Durchtrennung der großen Gefäße. Ohne Verzögerung wurde das Herz in eine mit eisgekühltem Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Schale gegeben, wo die Kontraktionen innerhalb weniger Sekunden sistierten. Unter entsprechender Vergrößerung wurde die Aorta freipräpariert, kurz unterhalb des Abgangs der Aortenbogengefäße durchtrennt und der verbliebene Aortenstumpf der Aorta ascendens an die dafür vorgesehene Kanüle der Perfusionsapparatur angeschlossen (siehe Abbildung 2). Dabei galt es insbesondere zu beachten, ein zu weites Hinaufziehen der Aorta über die Kanüle zu vermeiden, um eine Läsion der Aortenklappe zu verhindern. Nachdem die exakte Position des Herzens mittels Nahtmaterial (Perma-Hand-Seide, Firma Ethicon) fixiert war, erfolgte unverzüglich die retrograde Perfusion nach der Langendorff-Methode bei einer konstanten Temperatur von 37° C und einem konstanten koronaren Perfusionsdruck von 75 mmHg, woraufhin das Herz nach wenigen Sekunden wieder spontan zu schlagen begann. Zur Drainage der Thebesischen Venen wurde nach der Entfernung des linken Herzohrs ein kleiner Polyethylenschlauch von 2 mm Durchmesser vom linken Vorhof durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und die Herzspitze durchstoßen.

Zur Perfusion wurde ein phosphatfreier modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer verwendet, welcher NaCl (118,0 mmol/l), KCl (5,3 mmol/l), CaCl₂ (2,0 mmol/l), MgSO₄ (1,2 mmol/l), EDTA (0,5 mmol/l), NaHCO₃ (25,0 mmol/l), Glukose (10

mmol/l) und Pyruvat (0,5 mmol/l) enthielt und mit Carbogen (95% O₂+ 5% CO₂) äquiliert wurde, um einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen.

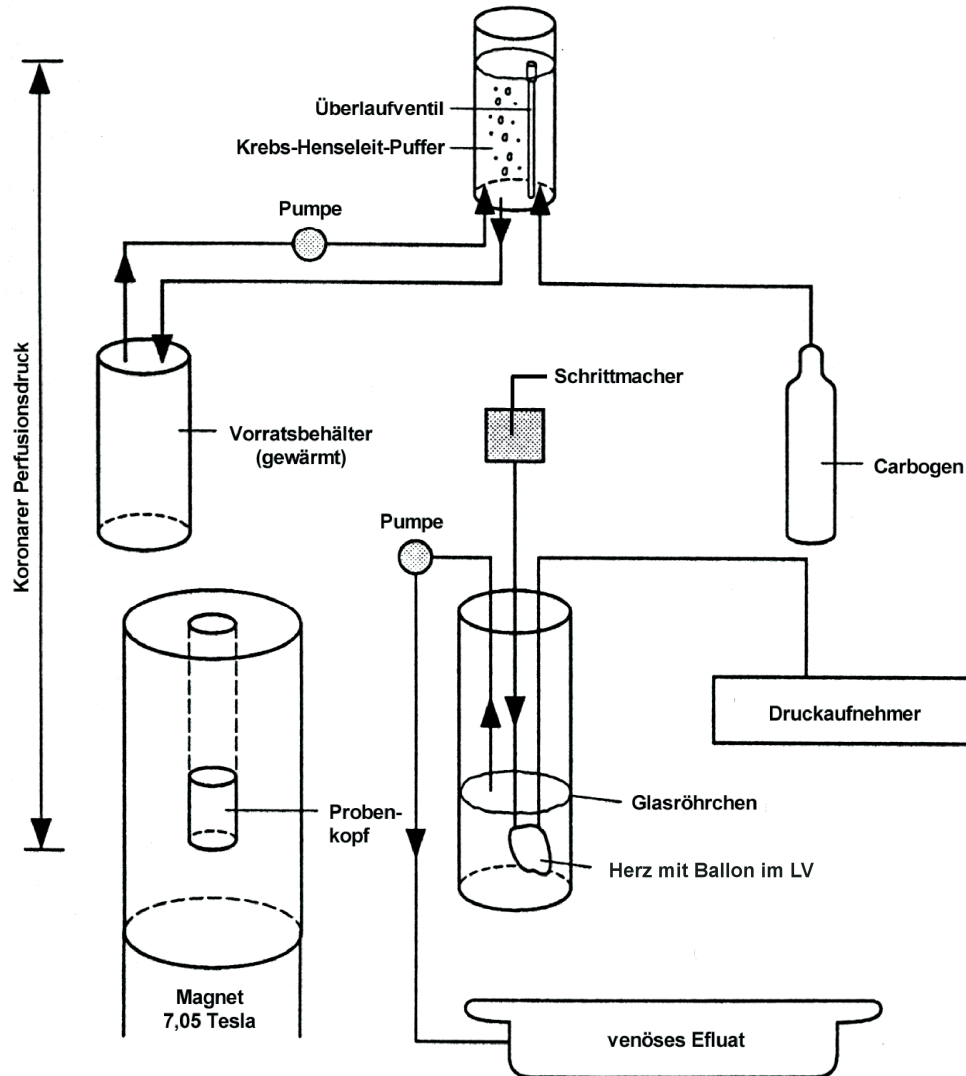


Abb. 2: Versuchsaufbau

2.3. Messung der mechanischen Herzfunktion und Versuchsprotokoll

Zur kontinuierlichen Aufzeichnung der Herzfrequenz und des systolischen und enddiastolischen linksventrikulären Druckes wurde ein luftblasenfrei mit destilliertem Wasser gefüllter in Handarbeit erstellter Latexballon verwendet, welcher über einen kleinlumigen Polyethylenschlauch mit einem Druckübermittler (Statham P23Db, Gould Instruments) in Verbindung stand. Der Ballon wurde nach der Entfernung des linken Herzohrs durch den linken Vorhof über die Mitralklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und dort durch vorsichtige Füllung des Ballons an die Größe des Ventrikels angepasst. Zu Beginn des Protokolls wurde der Füllungszustand des Ballons derart variiert, dass der enddiastolische Druck vereinbarungsgemäß für alle Herzen 8-10 mmHg betrug. Während des Protokolls blieb das Ballonvolumen konstant.

In der vorliegenden Studie verglichen wir die Arbeitsleistung der Herzen unter Ausgangsbedingungen mit der unter gesteigerter Herzarbeit. Zum raschen Anstieg der Herzarbeit wurden parallel die Calcium-Konzentration des Perfusats von 2,0 auf 4,0 mmol/l und die Herzfrequenz von 420 auf 600 Schläge pro Minute erhöht. Diese Methode zur Steigerung der Herzarbeit wurde dabei der Gabe eines pharmakologischen Agens wegen der möglichen verändernden Einflüsse auf das Rezeptorsystem der untersuchten transgenen Herzen bevorzugt.

Zum Aufrechterhalten einer konstanten Herzfrequenz von 420 Schlägen pro Minute und zum raschen Steigern der Herzfrequenz von 420 auf 600 Schläge pro Minute wurde für alle Herzen ein externer Stimulator (HSE Stimulator P, Type 201, Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) mit einer monophasischen Wechselstrom-Frequenz von 7 Hz verwendet. Um Störsignale und Antenneneffekte innerhalb des NMR-Systems zu vermeiden, erfolgte die Impulsübertragung mittels zweier Salzbrücken-Schrittmacherdrähte, welche aus Polyethylen-160-Schläuchen bestanden, die mit 4 mol/l KCl in 2% Agarose gefüllt waren und an das Herz angelegt wurden, ohne dieses zu durchstechen. Anschließend wurde ein NMR-Reagenzglas mit 10 mm Durchmesser über das Herz geschoben, so dass das isolierte Herz permanent von Perfusat umgeben war, welches ununterbrochen oberhalb des Herzens abgesaugt und in einem

externen Sammelbecken aufgefangen wurde. Zur Ermittlung des Koronarflusses wurde der Auswurf der Koronarsinus gesammelt und die Menge mittels eines Messzylinders abgelesen.

Bevor das Herz in den Probenkopf des Magneten eingebracht wurde, wurden sämtliche zu- und ableitenden Schläuche sorgfältig mittels eines Klebebandes am Oberrand des NMR-Reagenzglases fixiert.

Die gewonnenen Daten der mechanischen Herzfunktion, d.h. die Herzfrequenz (Schläge/min) und der linksventrikuläre systolische und diastolische Druck (jeweils in mmHg) wurden kontinuierlich mit einer Aufzeichnungsrate von 200 Hz mit Hilfe eines handelsüblichen Systems zur Datenaufzeichnung (MacLab ADInstruments, Milford) online aufgezeichnet und digital gespeichert.

Das Druck-Frequenz-Produkt (mmHg/min), welches als Maß für die geleistete Herzarbeit herangezogen wurde, konnte rechnerisch aus dem Produkt der Herzfrequenz und der linksventrikulären Druckamplitude, d.h. der Differenz zwischen dem linksventrikulären systolischen und diastolischen Druck, ermittelt werden. Ebenso wurden die minimale und maximale Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt) aus der linksventrikulären Druckkurve offline berechnet. Im Anschluss an die Versuche wurden die Herzen aus dem NMR-Reagenzglas entnommen, der linke Ventrikel mit einer Schere eröffnet und die überschüssige Flüssigkeit durch Betupfen mit einem Zellstofftuch entfernt. Danach wurde zuerst das Gewicht des gesamten Herzens und nach Abtrennen der restlichen Herzhöhlen das Gewicht des linken Ventrikels mit einer Digitalwaage ermittelt.

2.4. NMR-Spektroskopie

Das Hauptanwendungsgebiet der NMR-Spektroskopie liegt in der Strukturaufklärung von Molekülen. In der experimentellen Kardiologie bietet die ^{31}P -NMR-Spektroskopie die Möglichkeit, am isolierten, schlagenden Herzen nicht invasiv den Stoffwechsel der energiereichen Phosphate und des anorganischen Phosphats zu untersuchen, sowie den intrazellulären pH-Wert zu messen.

2.4.1. Physikalische Grundlagen

Viele Atomkerne mit einer ungeraden Anzahl von Protonen und/oder Neutronen besitzen einen Kernspin I und damit ein magnetisches Moment, was die Grundlage der Kernmagnetischen Resonanz (=NMR von englisch Nuclear Magnetic Resonance) bildet.

Dieses Phänomen wird in der Kernspinresonanz-Spektroskopie genutzt und mittels des Vektorenmodells beschrieben (siehe Abbildung 3 und 4).

Die für biologische Fragestellungen interessanten Atomkerne (^1H , ^{13}C , ^{31}P) besitzen den Kernspin $I=1/2$ und richten sich parallel oder antiparallel zu einem von außen angelegten Magnetfeld (B_0) aus.

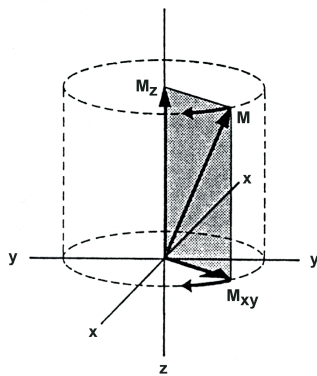


Abb. 3: Zerlegung der präzedierenden Magnetisierung in zwei Vektorkomponenten, eine in der Querebene und eine in Längsrichtung [modifiziert nach (14)].

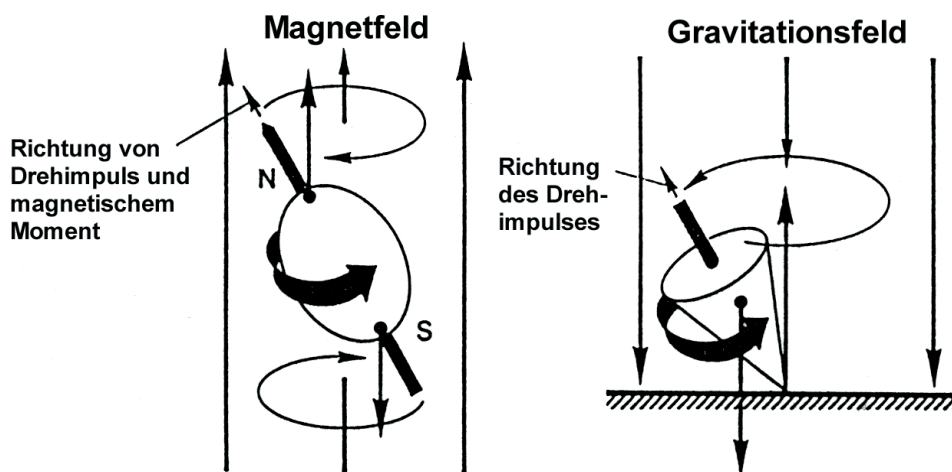


Abb. 4: Darstellung der Ähnlichkeit zwischen einem sich um die eigene Achse drehenden und präzedierenden Kreisler in einem Gravitationsfeld und einem präzedierenden Kern mit Spin in einem Magnetfeld [modifiziert nach (14)].

Ein Atomkern kann aufgrund seines Kernspins vereinfacht als ein magnetischer Kreisel angesehen werden. Wird ein solcher rotierender Atomkern in ein statisches Magnetfeld B_0 gebracht, erfährt dieser ein Drehmoment, das ihn mit der sogenannten Larmorfrequenz um die Richtung des Magnetfeldes B_0 präzedieren lässt. Die Anzahl der Kerne in einer Probe, die sich in Richtung des äußeren Magnetfeldes ausrichtet, ist von der Feldstärke des Magnetfeldes B_0 , der Temperatur T und von dem für jeden Atomkern charakteristischen gyromagnetischen Faktor γ abhängig.

Durch die Zufuhr von elektromagnetischer Energie senkrecht zum Magnetfeld B_0 mit der entsprechenden Larmor- oder Präzessionsfrequenz kommt es zu einer Änderung des Energiezustandes dieser Atomkerne und damit zum Wechsel ihrer Ausrichtung im Magnetfeld. Nach Beendigung der elektromagnetischen Frequenzeinstrahlung kehren die Atomkerne unter Abgabe der vorher aufgenommenen Energie wieder in ihre Ausgangsrichtung zurück und erreichen den ursprünglichen Energiezustand. Während dieser Relaxationszeit strahlen sie selbst elektromagnetische Wellen ab, die in einer Empfängerspule eine Wechselspannung induzieren, die von den Frequenzen der präzedierenden Kerne abhängig ist.

Der aufgezeichnete Spannungsabbau in der Spule, der freie Induktionszerfall (englisch free induction decay = FID), nimmt hinsichtlich der Amplitude exponentiell über die Zeit ab. Die Zeit, die die Rückbildung der Quermagnetisierung benötigt, um auf 63 Prozent ihres Ausgangswertes zu fallen, nennt man T_2 -Relaxationszeit oder auch Spin-Spin-Relaxationszeit.

Die Dauer bis zum Erreichen des Ausgangszustands, d.h. der erneuten Ausrichtung der Kernspins zum äußeren Magnetfeld, ist zusätzlich abhängig von der sogenannten T_1 -Relaxationszeit oder auch Spin-Gitter-Relaxationszeit. Das Signal, der freie Induktionszerfall nach einem Impuls, wird als Funktion der Zeit registriert. Mittels Fourier-Transformation wird per Computer das erhaltene zeitkodierte Signal in ein frequenzkodierte Spektrum umgewandelt. Dieses Verfahren wird als Fourier-Transformations-Spektroskopie bezeichnet.

Von entscheidender Bedeutung für die Qualität eines jeden NMR-Spektrums ist das Signal-Rausch-Verhältnis, das von zahlreichen Faktoren, wie z.B. der Feldstärke B_0 , der Art und Konzentration der Kerne, dem Volumen der Probe und den Relaxationszeiten T_1 und T_2 abhängt. Um das in einem einzelnen FID

bestehende naturgemäß sehr ungünstige Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, werden die FIDs vieler Impulse aufsummiert. Während dabei das Signal linear zunimmt, wächst das Rauschen nur mit dem Faktor der Quadratwurzel der Anzahl der summierten Spektren. Eine weitere Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erhält man durch die Verwendung eines Magneten mit hoher Feldstärke und durch eine hohe Homogenität des Magnetfeldes.

Zwischen den einzelnen Messimpulsen muss zur Vermeidung von Sättigungseffekten ein ausreichend langer Zeitabstand eingehalten werden, damit das System vor jedem neuen Impuls möglichst nahe wieder an den Gleichgewichtszustand zurückkehren kann. Hierbei verwendet man im Allgemeinen das Fünffache der longitudinalen Relaxationszeit.

Um die Homogenität des Magnetfeldes B_0 , die durch das Einbringen der Probe empfindlich gestört wird, zu optimieren, sind zusätzliche Korrekturspulen, auch „Shim“-Spulen genannt, erforderlich. Diese Spulen, die unabhängig vom Hauptmagneten betrieben und verändert werden, sind entlang aller drei Achsen eines fiktiven Koordinatensystems orientiert und dienen der Feinabstimmung der Homogenität des Magnetfeldes im NMR-sensitiven Volumen.

Das Phänomen der chemischen Verschiebung wird zur Charakterisierung des NMR-Signals herangezogen. Es ist hierdurch möglich, chemische Verbindungen zu differenzieren, die ein zu untersuchendes Atom als gemeinsamen Bestandteil haben. Bei der Betrachtung eines hochaufgelösten NMR-Spektrums fällt auf, dass gleichartige Atome in unterschiedlicher chemischer Umgebung aufgrund einer unterschiedlichen Abschirmung durch die sie umgebende Elektronenhülle zu mehreren Signalen im Spektrum führen.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen ^{31}P -NMR-Herzspektren enthalten Signale für anorganisches Phosphat (P_i), Phosphocreatin (PCr) und für die Phosphoratome (α , β , γ) des Adenosintriphosphates (ATP). Die Konzentration des AMP- und ADP- Gehalts ist so gering, dass sie durch die NMR-Spektroskopie nicht erfasst werden können. Der intrazelluläre pH-Wert des untersuchten Objekts kann in jedem Spektrum aus dem Abstand von anorganischem Phosphat und Phosphocreatin anhand von Standardkurven bestimmt werden. Während hierbei die relative Position des anorganischen Phosphates im Spektrum je nach pH-Wert variiert, ist die Position für Phosphocreatin unabhängig vom pH-Wert.

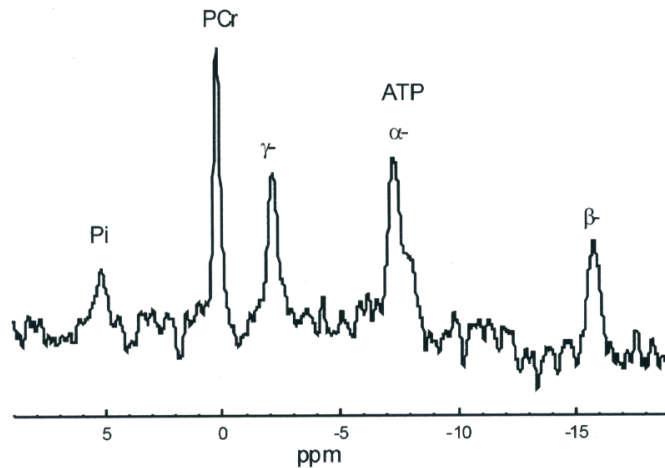


Abb. 5: ^{31}P -NMR-Spektrum eines Mäuseherzens.

2.4.2. NMR-Messapparatur/Technische Daten

Das perfundierte Herz wurde in ein NMR-Reagenzglas mit 10 mm Durchmesser gegeben und in einen speziell angefertigten $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ -NMR-Probenkopf eingelassen, welcher sich in der Bohrung eines „super wide bore“ (150 mm) supraleitenden Magneten (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) mit einer Magnetfeldstärke von 7,05 Tesla befand. Mit einem Aspect 3000 Computer (Bruker, Rheinstetten) wurden über die Fourier-Transformation ^{31}P -NMR-Spektren bei einer Pulsfrequenz von 121,50 MHz aufgezeichnet. Die Aufzeichnung eines einzelnen Spektrums erhielt man durch die Signalmittelung von 256 „Freien Induktionszerfällen“ (FID) über jeweils 8 Minuten. Dabei betragen die Pulslänge 17,2 μs , der Pulswinkel 60° und der Puls-Puls-Abstand 1,84 Sekunden. Den ^{31}P -NMR-Spektren ging eine Homogenisierung des B_0 Magnetfeldes mittels einer 14-Kanal-Bruker-Shimeinheit bis zu einem Maximum der Fläche des FIDs für ^{23}Na voraus.

Zur weiteren Bearbeitung der Daten wurde eine UNIX Arbeitsstation verwendet. Die Amplituden der Resonanzen von ATP, Phosphocreatin (PCr) und anorganischem Phosphat (P_i), die proportional zur Anzahl der Phosphoratome in dem jeweiligen Untersuchungsobjekt sind, wurden in der Zeitdomäne mittels des Programms „AMARES“ bestimmt. Die Berechnung des PCr/ATP-Verhältnisses basierte auf den angepassten Integralen von PCr und γ -Phosphat-Resonanz des ATP. Durch den Vergleich der Amplitudenhöhe von Spektren mit kompletter

Relaxation (Puls-Puls-Abstand 15 s) und mit teilweiser Sättigung (Puls-Puls-Abstand 1,84 s) wurden die Korrekturfaktoren für die partielle Sättigung von ATP (1,0), PCr (1,3) und P_i (1,05) berechnet. Zur Bestimmung der ATP-Konzentration im Zytosol wurden die gesamten Resonanzflächen, die dem γ-Phosphat des ATP in den ³¹P-NMR-Herzspektren entsprachen, auf das Herzgewicht normalisiert. Da der Lowry-Protein-Gehalt (der die Ermittlung extrazellulärer Matrixproteine minimiert und dadurch dem Gehalt an Myozyten-Protein sehr nahe kommt) in beiden Gruppen gleich war (0,150±0,009 gegenüber 0,145±0,006 mg/mg Nassgewicht, siehe Tabelle 1), wurde angenommen, dass die Teilvolumina des intrazellulären Wassers der Myozyten von WT und TG Herzen ähnlich sind und den typischen Werten gut perfundierter Nagetierherzen entsprechen (0,48 µl/mg Nassgewicht) (21). In diesem Fall sind die Flächeneinheiten/mg Nassgewicht direkt proportional zu den absoluten intrazellulären Konzentrationen. Der Wert von 10 mmol/l für die ATP-Konzentration des Myokards bei WT (22) wurde zur Kalibrierung der integrierten Fläche des γ-ATP-Phosphats im ³¹P-NMR-Herzspektrum unter Grundbedingungen herangezogen. Veränderungen der Konzentrationen von ATP, PCr und P_i während des Protokolls wurden errechnet durch die Multiplikation des Verhältnisses ihrer jeweiligen integrierten Fläche zur mittleren Fläche des γ-Phosphat-ATP des Ausgangsspektrums bei 10mM.

Die freie ADP-Konzentration im Zytosol wurde errechnet unter der Verwendung der Gleichgewichtskonstante (K_{eq}) der CK-Reaktion und aus den mittels NMR-Spektroskopie und biochemischen Untersuchungen erhaltenen Werten:

$$[ADP] = \frac{[ATP][\text{freies Cr}]}{[PCr][H^+]K_{eq}},$$

wobei der Wert für die Gleichgewichtskonstante K_{eq} 1,66x10⁹ mmol/l für eine Mg²⁺-Konzentration von 1,0 mmol/l beträgt (25).

Die in den energiereichen Phosphatbanden von ATP gespeicherte und durch ATP-Hydrolyse (ΔG_{ATP}) gewonnene freie Energie hat einen negativen Wert. Zum besseren Verständnis sind alle ΔG_{ATP}-Werte als Absolutwerte angegeben. Demnach zeigt ein Anstieg des Absolutwertes einen Anstieg der freien Energie an:

$$|\Delta G_{ATP}|(kJ/mol) = \left| \Delta G^0 + RT \ln \frac{[ADP][P_i]}{[ATP]} \right|,$$

wobei ΔG (-30,5 kJ/mol) der Wert von ΔG_{ATP} unter Standardbedingungen bzgl. Molarität, Temperatur, pH-Wert und Magnesiumkonzentration $[Mg^{2+}]$ ist und R die allgemeine Gaskonstante (8,3 J/mol K) und T die Temperatur in Kelvin ist (15).

2.4.3. Statistische Auswertung

Alle Daten entsprechen Mittelwerten \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Der Vergleich der Herzen der WT mit denen der TG zu Ausgangsbedingungen und unter erhöhter Herzarbeit erfolgte durch den gepaarten und den ungepaarten Student-t-Test. Berechnungen wurden mittels des StatView SE+Graphics Programms (Brainpower, Calabas, CA) durchgeführt.

p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

2.4.4. Biochemische Analyse

Das nicht kollagene Protein wurde durch die Methode nach Lowry mit Rinder-serumalbumin als Standard gemessen. Zur Bestimmung des Gesamtcreatin-Gehalts wurde die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Citratsynthase wurde durch enzymatische Bestimmung am Photometer (Sigma 228-UV) ermittelt. Die Menge des Creatintransporter-Proteins wurde mittels Westernblot quantitativ bestimmt.

Die Gesamt-CK-Aktivität ($CK V_{max}$) wurde spektralfotometrisch gemessen (Sigma 47-UV) und das jeweilige Verhältnis zur Aktivität der verschiedenen CK-Isoenzyme wurde mit Hilfe des Helena Cardio-Rep CK-Isoenzym Analyzers bestimmt (35). CK-Aktivitäten wurden in der Einheit IU/mg Protein gemessen und umgerechnet in mmol/l/s mittels der gemessenen Konzentrationen der kardialen Proteine. Alle Werte sind in mmol/l/s angegeben bei 37° Celsius. (40).

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Merkmale, Gesamt-CK-Aktivität und CK-Isoenzym-Verteilung bei TG und WT

Das Körpergewicht und das Gewicht des linken Ventrikels waren ebenso wie das Verhältnis der beiden Größen zueinander in den zwei Vergleichsgruppen identisch (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Herzgewicht, Körpergewicht und myokardialer Proteingehalt von WT und TG.

	KG (g)	HG (mg)	HG/KG (mg/g)	Protein (mg Pr/mg NG)
WT (n=8)	28,6±1,4	119±4	4,2±0,1	0,150±0,009
TG (n=11)	30,0±1,4	124±6	4,1±0,1	0,145±0,006

Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis im Anhang.

Die Aktivität der Gesamt-Creatinkinase war in den Herzen der TG um 21 Prozent geringer als in denen der WT (60,7±3,1 mmol/l/s bei den TG im Vergleich zu 76,9±4,7 mmol/l/s bei den WT).

Die Werte für die Aktivität der einzelnen CK-Isoenzyme und das jeweilige Verhältnis zur Aktivität der Gesamt-CK sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verteilung der CK-Isoenzyme und Isoenzymaktivitäten in den Herzen von WT und TG.

	WT (n=8)	TG (n=10)
Gesamt-CK (mmol/l/s)	76,9±4,7	60,7±3,1 *
MM-CK (mmol/l/s)	41,6±2,3	37,6±2,5
MB-CK (mmol/l/s)	4,0±0,5	4,2±0,4
BB-CK (mmol/l/s)	0,5±0,1	0,6±0,1
Mito-CK (mmol/l/s)	30,8±2,6	18,3±2,7 *
MM-CK (% Gesamt-CK)	54,6±1,6	64,1±3,9 *
MB-CK (% Gesamt-CK)	5,2±0,3	6,9±0,4 *
BB-CK (% Gesamt-CK)	0,6±0,1	1,0±0,2
Mito-CK (% Gesamt-CK)	39,6±1,8	28,0±4,0 *

Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen. * P < 0,05 TG- gegenüber WT-Herzen.

Die Herzen der TG hatten einen geringeren Anteil an mitochondrialer Creatinkinase (Mito-CK), sowohl was den Absolutwert der Aktivität angeht, als auch was das Verhältnis zur Aktivität der Gesamt-Creatinkinase betrifft. Die Absolutwerte der Aktivitäten von MM-, MB- und BB-CK zeigten keine Unterschiede zwischen den Herzen der TG und denen der WT (siehe Tabelle 2).

Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Verringerung (-25 Prozent) der Citratsynthase, einem Marker für die Mitochondriendichte (siehe Abbildung 6).

Die Gesamtaktivität der LDH (siehe Abbildung 6) als Index des Verhältnisses von oxidativer und glykolytischer Kapazität war in beiden Vergleichsgruppen unverändert. Die intrazelluläre Konzentration an nicht kollagenem Protein, gemessen als Lowry-Protein, betrug $0,150 \pm 0,009$ mg Protein/mg Feuchtgewicht bei den Herzen der WT und $0,145 \pm 0,006$ mg Protein/mg Feuchtgewicht bei den Herzen der TG.

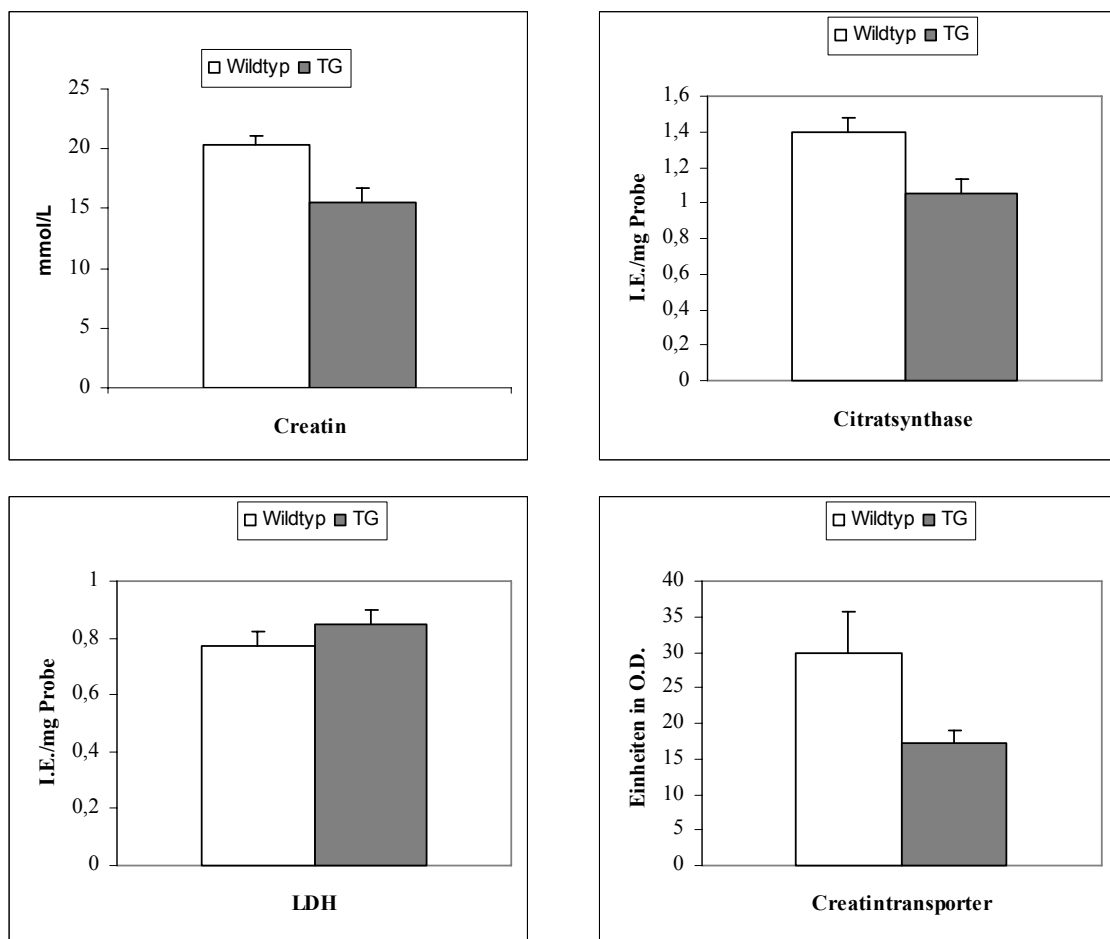


Abb. 6: Stoffwechselfparameter von WT (n = 8) und TG (n = 11). ■ P < 0,05 TG- gegenüber WT- Herzen bezüglich Creatin, Citratsynthase und Creatintransporter.

3.2. Herzfunktion und Stoffwechsel der energiereichen Phosphate unter Grundbedingungen

Unter den Ausgangsbedingungen mit einem enddiastolischen linksventrikulären Druck von 8-10 mmHg und einer Stimulationsfrequenz der isolierten Herzen von 420 Schlägen pro Minute zeigten sich zwischen den Herzen der TG und denen der WT keine Unterschiede hinsichtlich des entwickelten linksventrikulären Drucks, wie aus der Tabelle 3 zu entnehmen ist.

Tabelle 3: Isovolumetrische LV Kontraktionsleistung unter Grundbedingungen, während gesteigerter Arbeit und während der Erholungsphase von WT- (n = 8) und TG-Herzen (n = 11).

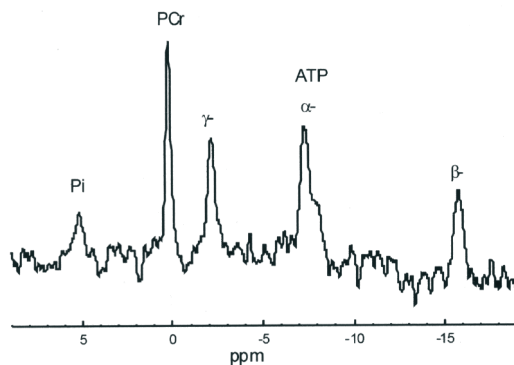
		HF=420/min [Ca ²⁺]=2,0 mmol/l	HF=600/min [Ca ²⁺]=4,0 mmol/l	HF=420/min [Ca ²⁺]=2,0 mmol/l
EDP (mmHg)	WT	8±1	8±3	8±1
	TG	11±1	11±1	11±2
DevP (mmHg)	WT	78±4	76±5	60±2
	TG	76±2	86±10	63±6
RPP (mmHg/min)	WT	33,100±1800	43,400±3600	24,900±1200
	TG	33,200±2000	51,700±5700	26,900±2500
+dP/dt (mmHg/s)	WT	3000±200	3100±200	2200±100
	TG	3100±100	3500±400	2600±200
-dP/dt (mmHg/s)	WT	2300±200	2400±300	1400±100
	TG	2400±200	3200±400	1800±200

Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen. Hinsichtlich der kardialen Funktion bestanden zwischen beiden Gruppen von Herzen keine signifikanten Unterschiede während der unterschiedlichen Belastungsstufen.

Ebenso waren keine Unterschiede nachweisbar hinsichtlich des Druck-Frequenz-Produkts (RPP), der maximalen und minimalen linksventrikulären Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt) und des Koronarflusses pro Herzgewicht.

Während der 30 Minuten andauernden Perfusion unter den Grundbedingungen zeigte sich eine stabile Kontraktionsleistung mit einer Variabilität des RPP von weniger als 5 Prozent.

A Wildtyp



B TG

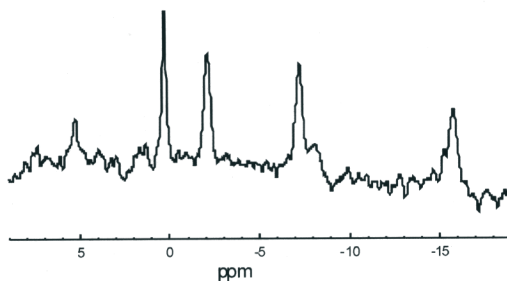


Abb. 7: ^{31}P -NMR-Spektrum eines isolierten Wildtyp- (A) und eines transgenen Mäuseherzens (B).

Wie den typischen Beispielspektren (siehe Abbildung 7) zu entnehmen ist, war der Phosphocreatinegehalt in Herzen der TG ($11,6 \pm 0,5$ mmol/l) um 22 Prozent geringer als in denen der WT ($14,6 \pm 1,0$ mmol/l). Da hinsichtlich des pH-Werts und der Konzentration von ATP und anorganischem Phosphat in den beiden Vergleichsgruppen kein Unterschied auszumachen war, war folglich das Verhältnis Phosphocreatin/ATP in den Herzen der TG ($1,16 \pm 0,06$) niedriger als das in denen der WT ($1,46 \pm 0,10$) (siehe Abbildung 7). Die Gesamtcreatin-Konzentration, welche in denselben Herzen biochemisch mittels HPLC gemessen wurde, zeigte eine signifikant niedrigere Creatin-Konzentration von 24

Prozent bei transgenen Herzen im Vergleich zu denen der Wildtypen ($15,5 \pm 1,2$ gegenüber $20,4 \pm 0,7$ mmol/l, siehe Abbildung 6).

Ebenso war der myokardiale Creatintransporter, das Protein, das für die Regulation der myokardialen Creatin-Konzentration verantwortlich ist, bei den TG im Vergleich um 43 Prozent niedriger ($17,2 \pm 1,9$ optische Dichte-Einheiten bei TG gegenüber $30,0 \pm 5,7$ bei WT) (siehe Abbildung 6). Da die relative Abnahme von Gesamt- und phosphoryliertem Creatin nahezu gleich war, traf genau das auch auf das Verhältnis von phosphoryliertem und freiem Creatin in den Herzen der TG und der WT zu.

Als Konsequenz ergab sich bei der Berechnung der Konzentration des intrazellulären freien ADP mittels der Gleichung für die Creatinkinase-Reaktion eine ähnliche ADP-Konzentrationen für die Herzen von TG (43 ± 6 $\mu\text{mol/l}$) und WT (40 ± 8 $\mu\text{mol/l}$) (siehe Abbildung 8). Genauso verhielt es sich beim Vergleich der errechneten ΔG_{ATP} -Werte ($58,9 \pm 0,6$ kJ/mol bei TG gegenüber $59,3 \pm 0,7$ kJ/mol bei WT) (siehe Abbildung 8).

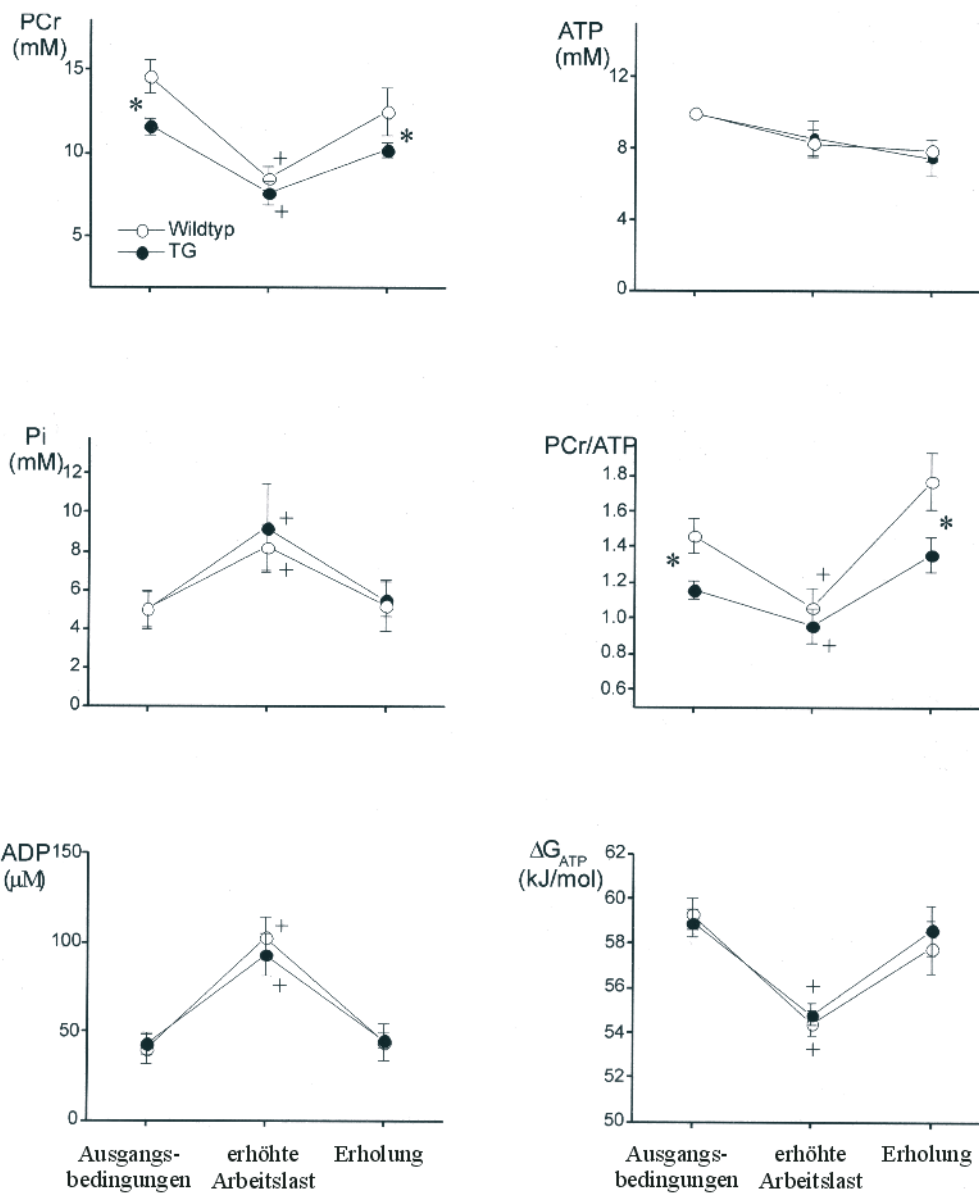


Abb. 8: Myokardiale Energie gemessen mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie von WT- (n=8) und TG-Herzen (n=11) unter Grundbedingungen, während gesteigerter Arbeit und während der Erholungsphase.

Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen. * $P < 0,05$ TG im Vergleich zu WT.

+ $P < 0,05$ gesteigerte Arbeit im Vergleich zu Grundbedingungen. ΔG_{ATP} , freie Energie für die ATP-Hydrolyse.

3.3. Herzfunktion und Stoffwechsel der energiereichen Phosphate während gesteigerter Herzarbeit und der anschließenden Erholung

Nachdem ein Anstieg der Herzarbeit durch eine Verdopplung der extrazellulären Calciumkonzentration und ein Anheben der Stimulationsfrequenz von 420 auf 600 Schläge pro Minute eingeleitet worden war, bewirkte dies einen Anstieg des RPP um durchschnittlich 30-45 Prozent (siehe Tabelle 3).

Es bestanden keine Unterschiede im relativen und absoluten Anstieg des RPP zwischen beiden Gruppen während der Phase der erhöhten Herzarbeit.

Hervorzuheben ist, dass dieser Anstieg der Herzarbeit für die Dauer von 12 Minuten der inotropen und chronotropen Stimulation konstant aufrechterhalten werden konnte und der enddiastolische Druck (EDP), ein sensibler Marker der diastolischen linksventrikulären Leistung, sich in beiden Vergleichsgruppen nicht signifikant änderte (siehe Tabelle 3).

Nachdem die Calciumkonzentration des Perfusats und die Stimulationsfrequenz wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeführt worden waren, ließ sich ein Rückgang der Werte für DevP und RPP auf unterhalb der Ausgangsbedingungen (d.h. während der Perfusion unter Grundbedingungen) beobachten. Nach einer 16 Minuten andauernden Erholungsphase kam es im Durchschnitt bei den Herzen der WT zu einem Rückgang des RPP auf 73 ± 3 Prozent der Werte unter Grundbedingungen, bei denen der TG auf 77 ± 6 Prozent (siehe Tabelle 3). Hinsichtlich EDP, DevP, RPP und maximaler und minimaler Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt) während der erhöhten Herzarbeit und der anschließenden Erholung zeigten sich in beiden Vergleichsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

Ein Anstieg der Herzarbeit um 30-45 Prozent führte zu den erwarteten Veränderungen bei den Konzentrationen der energiereichen Phosphate und des anorganischen Phosphats. Beim anorganischen Phosphat kam es nahezu zu einer Verdopplung der Konzentration, während die des Phosphocreatins bei den Herzen der WT um $6,0 \pm 0,6$ mmol/l (entspricht $27 \pm 4\%$) und bei denen der TG um $4,0 \pm 0,7$ mmol/l (entspricht $26 \pm 7\%$) abnahm. Während der Erholungsphase kam es in beiden Versuchsgruppen zur Resynthese der gleichen Menge an Phosphocreatin, wobei nach 10 Minuten Erholungsphase die Konzentration der

Grundbedingungen nahezu erreicht war. Parallel zu dieser Resynthese des Phosphocreatins kam es in beiden Gruppen zu einem Rückgang des anorganischen Phosphats ebenfalls auf die Werte unter Grundbedingungen (siehe Abbildung 7). Ein Anstieg des RPP führte bei beiden Gruppen zu einer ähnlichen Abnahme der ATP-Konzentration, nämlich um $1,4 \pm 1,0$ mmol/l in den Herzen der WT und um $1,7 \pm 0,8$ mmol/l in denen der TG. Die Gesamtkonzentration an kardialen Phosphaten ($P_i + PCr + 3*ATP$) nahm in beiden Gruppen ausgehend von den Grundbedingungen bis zur Erholungsphase um ca. 15 Prozent ab.

Als Reaktion auf die gesteigerte Herzarbeit kam es im Vergleich zu den Werten unter Grundbedingungen zu einem Anstieg der Konzentration an freiem ADP von 63 ± 8 $\mu\text{mol/l}$ bei den WT und von 50 ± 15 $\mu\text{mol/l}$ bei den TG, wobei im direkten Vergleich kein Unterschied bestand. Erwartungsgemäß kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Abnahme von ΔG_{ATP} unter gesteigerter Herzarbeit, nämlich von $4,9 \pm 0,6$ kJ/mol bei den Herzen der WT und von $4,1 \pm 0,7$ kJ/mol bei den TG (siehe Abbildung 8). Damit ließen sich in beiden Gruppen keine Unterschiede hinsichtlich des ΔG_{ATP} während gesteigerter Herzarbeit und nach der Erholungsphase nachweisen.

4. Diskussion

Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Stimulation des kardialen β_1 -Rezeptor-Systems und der Regulation von Herzfrequenz, linksventrikulärer Kontraktilität und Relaxation ist hinreichend nachgewiesen (3). Bei chronischer Herzinsuffizienz sind sowohl die Anzahl, als auch die Funktion der β -Rezeptoren herabgesetzt (2, 27, 28, 46). Diese Abnahme zeigt sich schon früh bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und korreliert mit dem Schweregrad der linksventrikulären Dysfunktion (8, 23). Die genaue Rolle des β -Rezeptoren-Systems im Rahmen der Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist aber nach wie vor Gegenstand der Diskussion. Während sich dauerhafte therapeutische Interventionen, die unmittelbar eine Stimulation der β_1 -Rezeptoren zum Ziel hatten, als schädlich erwiesen haben, sind demgegenüber pharmakologische Interventionen, die das kardiale β -Rezeptoren-System blockieren, mit einem bedeutenden klinischen Nutzen und einer längeren Lebenserwartung verknüpft (6, 47). Die Beobachtung, dass eine herzspezifische Überexpression des β_1 -Rezeptors bei Mäusen zu einer zunehmenden Herzhypertrophie und in der weiteren Folge zu einer Herzinsuffizienz führt, unterstützt die Hypothese, dass eine chronische Überstimulation des sympathischen Systems negative Auswirkungen auf die Leistung des Myokards und auf die Langzeitprognose hat (11). Den zugrunde liegenden Mechanismus jedoch und noch wichtiger, die initialen Ereignisse dieser Verkettung von pathophysiologischen Ereignissen gilt es noch herauszufinden.

Da ein charakteristisches Muster an Veränderungen im myokardialen Energiestoffwechsel ein gemeinsames Merkmal aller Formen der Herzinsuffizienz ist (22, 26, 32, 38), gingen wir gezielt der Frage nach, ob bei diesen transgenen Tieren mit herzspezifischer Überexpression des β_1 -Rezeptors Veränderungen im myokardialen Stoffwechsel der energiereichen Phosphate zu einem Zeitpunkt feststellbar sind, bevor Anzeichen einer linksventrikulären Verschlechterung und Hypertrophie zutage treten.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei vier Monate alten TG die isoliert betrachtete linksventrikuläre Leistung und die kontraktile Reserve, z.B. die Fähigkeit das kardiale Arbeitspensum zu steigern, komplett erhalten sind. Im Gegensatz dazu war trotz vergleichbarer myokardialer Lastbedingungen der Gehalt an

Phosphocreatin und Gesamtcreatin bei TG im Vergleich zu den WT-Herzen um 20 Prozent geringer. Parallel dazu zeigte sich ein um 43 Prozent verminderter Gehalt des myokardialen Creatin-Transporters. Darüber hinaus war die Gesamt-CK-Aktivität signifikant erniedrigt, was überwiegend auf eine Abnahme der Mito-CK zurückzuführen ist. Schließlich war auch noch die Citratsynthase, ein Marker für die Masse an Mitochondrien, signifikant erniedrigt, was als Zeichen einer frühzeitigen Verschlechterung der oxidativen Energieerzeugung zu deuten ist.

4.1. Die isovolumetrische Kontraktionsleistung bei unterschiedlicher Arbeitsbelastung

Im Alter von vier Monaten zeigte sich bei den Herzen der WT und TG eine nahezu gleiche isovolumetrische linksventrikuläre Leistung, was anhand von DevP, Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt) und Druck-Frequenzprodukt (RPP) beurteilt wurde. Dies stimmt mit früheren Untersuchungsergebnissen bei TG unter der Verwendung eines high-fidelity Katheterspitzen-Mikromanometers überein, in denen sich in vivo initial sogar ein Kontraktilitätsanstieg bei TG im sehr jungen Alter von weniger als 12 Wochen zeigte, aber eine identische linksventrikuläre Leistung in beiden Gruppen zwischen dem vierten und dem fünften Lebensmonat nachweisbar war. Nach 9 Lebensmonaten wurde eine Abnahme der maximalen Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt) des linken Ventrikels registriert (9, 11). Ferner konnte mittels MR-Mikroskopie an vier Monate alten TG gezeigt werden, dass die linksventrikuläre Leistung, die nicht invasiv anhand von Herzzeitvolumen, Schlagvolumen, Ejektionsfraktion und Auswurffraktion bestimmt wurde, bei beiden Gruppen ebenfalls ähnlich war (49). Zusammengefasst war somit unter Ruhebedingungen kein Unterschied hinsichtlich der Kontraktilität zwischen vier Monate alten TG und WT nachweisbar. Bemerkenswerterweise wurden im Rahmen eines ähnlichen Modellversuchs ähnliche Ergebnisse beschrieben. Bisognano et al (1) fanden keine messbaren funktionellen Auswirkungen bei jüngeren, vier Monate alten Mäusen und eine kardiale Dysfunktion bei älteren, über neun Monate alten Tieren. Wenn isoliert perfundierte Herzen mittels eines Anstiegs der Herzfrequenz und der Calcium-Konzentration des Perfusats vermehrt gefordert wurden, waren die

Herzen der TG nicht nur zu einer Zunahme des RPP im gleichen Umfang wie die Herzen der WT in der Lage, sondern auch dazu, diese erhöhte Arbeitsbelastung über die 12 Minuten aufrecht zu erhalten. Dies beweist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der bereits erwähnten in vivo NMR-Studie, dass bei TG und WT nicht nur unter Ruhebedingungen, sondern auch unter inotroper Stimulation die linksventrikulären Auswurfraten nahezu gleich sind (49). Unter der Belastung mit Dobutamin ließ sich jedoch eine signifikante Abnahme der linksventrikulären Füllungsrate als Hinweis auf eine von der Arbeitsbelastung abhängige diastolische Dysfunktion bei narkotisierten TG beobachten. In unserer Studie ließen sich beim Vergleich der Messergebnisse der diastolischen Leistung während erhöhter Belastung ebenso wie bei den Maximalwerten von isovolumetrischer Relaxation und EDP keine Unterschiede zwischen isoliert perfundierten Herzen gleichaltriger TG und WT nachweisen. Dies mag damit zusammenhängen, dass bei der isovolumetrischen Präparation nach Langendorff Kontraktion und Relaxation isometrische Prozesse sind, wo sich keine Veränderungen in der absoluten Muskellänge zeigen und das linksventrikuläre Volumen während des Herzzyklus konstant bleibt. Folglich ist der Prozess der Muskelverlängerung während der linksventrikulären Relaxation nicht nötig, was eine möglich Erklärung für die Unterschiede hinsichtlich der diastolischen Leistung in beiden Studien ist.

4.2. Myokardialer Energiestoffwechsel und biochemische Veränderungen bei TG und WT

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Studie ist, dass die Herzen mit β_1 -Rezeptor-Überexpression trotz vergleichbarer isovolumetrischer Kontraktionsleistung eine signifikant niedrigere Konzentration von Phosphocreatin- (-22%) und Gesamtcreatin-Gehalt (-24%) im Vergleich zu den Herzen der WT aufwiesen. Es ist hierbei wichtig herauszuheben, dass – zusätzlich zum mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie an isoliert perfundierten Herzen und damit nicht invasiv ermittelten Phosphocreatin-Gehalt – der Gesamtcreatin-Gehalt NMR-unabhängig an homogenisiertem Herzmuskelgewebe mittels einer klassischen biochemischen Methode (HPLC) bestimmt wurde.

In vorausgegangenen histologischen Untersuchungen an transgen veränderten β_1 -überexprimierten Herzen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hypertrophie der Myozyten vor dem Nachweis einer Schädigung des linken Ventrikels auftritt (9, 11). Hinsichtlich der Gesamtmasse des linken Ventrikels jedoch, bestimmt anhand des Gewichts des LV und des Verhältnisses von LV-Gewicht und Körpergewicht, bestand weder in der gegenwärtigen, noch in einer früheren Studie im aktuell untersuchten Alter ein Unterschied. Im weiteren Verlauf wurde bei mikroskopischer Betrachtung der histologischen Schnittbilder nach dem Auftreten von Zeichen der Herzinsuffizienz ein zunehmender Ersatz von Myozyten durch fibröses Bindegewebe sichtbar (9, 11). Ein signifikanter Beitrag des nicht Myozyten enthaltenden Gewebes, z.B. extrazelluläre Fibrose oder ausgeprägte extrazelluläre Flüssigkeitszunahme, die zur Verfälschung der biochemischen Messungen, die genormt auf kardialen Proteingehalt bezogen werden, wurde in der vorliegenden Studie unabhängig nochmals durch die normierende Proteinbestimmung nach „Lowry“ ausgeschlossen. Dies hält den Beitrag extrazellulärer Proteine gering, weil diese Proteine eine relativ geringe Menge an aromatischen Aminosäuren enthalten, dem eigentlichen Ziel der „Lowry“-Proteinbestimmung (29).

Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass in anderen Tiermodellen eine, mit dem aktuellen Ergebnis vergleichbare Abnahme des Gesamtcreatin-Gehalts nur für Szenarien fortgeschrittener Herzinsuffizienz beschrieben ist. So konnte beispielsweise in einem Versuchsmodell mit Schrittmacher-induzierter Herzinsuffizienz bei Hunden ein Abfall des Creatin-Gehalts um 15 Prozent bei beginnender kardialer Dysfunktion und ein Abfall um 28 Prozent bei schwerer Herzinsuffizienz beobachtet werden (43). In ähnlicher Weise konnte an Rattenherzen zwei Monate nach einem Myokardinfarkt eine Abnahme des Creatins um 26 Prozent beobachtet werden. Parallel wurde eine signifikante Verschlechterung der linksventrikulären Leistung beobachtet (38). Eine wichtige Erkenntnis bei diesem Versuchsmodell ist, dass durch eine Behandlung dieser nach Myokardinfarkt insuffizienten Herzen mit β -Rezeptoren-Blockern die Abnahme der Creatinmenge verhindert werden konnte und damit ein Erhalt der linksventrikulären Funktion einherging (19).

Eine Reihe weiterer Beobachtungen weisen auf eine primäre und direkte Beziehung von β -Rezeptoren-System und Creatinstoffwechsel hin, im Gegen-

satz zu einem eher sekundären Effekt der Herzinsuffizienzbehandlung im Allgemeinen. Erstens konnte bei der Verwendung eines ACE-Hemmers unter denselben Studienbedingungen ein ähnlich protektiver Effekt auf die linksventrikuläre Leistung beobachtet werden. Die Abnahme des Creatins konnte dadurch allerdings nicht verhindert werden (19). Zweitens führte die Behandlung scheinoperierter Tiere mit β -Rezeptoren-Blockern zu einem signifikanten Creatinanstieg im Vergleich zu unbehandelten scheinoperierten Tieren (24). Vergleichbare Ergebnisse wurden an gesunden Truthahnherzen gefunden (5). Ebenso bemerkenswert ist die Beobachtung, dass über eine in Relation nahezu identische Abnahme der Creatinmenge wie in der vorliegenden Studie beim menschlichen Myokardgewebe berichtet wird, nachdem bei vorher gesunden Unfallopfern aufgrund einer vorgesehenen Verwendung des Herzens zur Organspende über einen längeren Zeitraum eine intensivmedizinische Behandlung mit maschineller Beatmung durchgeführt wurde (33). Diese Personen sind nach dem traumatischen Ereignis und der damit einhergehenden gesteigerten Produktion von Stresshormonen von einer beträchtlichen Menge Adrenalin abhängig, was innerhalb der nächsten 24-120 Stunden zu einem ähnlichen Ausmaß an Creatinverlust führt.

Zusammengefasst deuten diese bisherigen Ergebnisse und die der vorliegenden Studie nachdrücklich auf einen direkten Einfluss des Grades einer β -adrenergen Aktivierung oder einer Rezeptorblockade auf den Gleichgewichtszustand des myokardialen Creatins hin.

Eine der zentralen Fragen diesbezüglich ist, wie die intrazelluläre Creatinkonzentration reguliert wird. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass es bei menschlicher und experimenteller Herzinsuffizienz parallel zur Down-Regulation des Na^+ -Creatin-Cotransporters zu einer Abnahme des myokardialen Creatins kommt, was eine regulierende Funktion für die Creatintransporter vermuten lässt. Die vorliegende Studie beschreibt als erste eine signifikante Abnahme des Creatintransporter-Gehalts in Herzen bei erhaltener linksventrikulärer Funktion. Bisher ist abgesehen vom Schilddrüsenstatus wenig über die Steuerungsmechanismen des Creatintransporters bekannt (42). Die Tatsache, dass der Creatintransporter in Herzen von TG früh betroffen ist, ist ein weiterer Hinweis dafür, dass das β -adrenerge Rezeptorsystem direkt an der Kontrolle des Gehalts an myokardialen Creatintransporter beteiligt ist.

Eine zweite bemerkenswerte Erkenntnis ist die Tatsache, dass die Herzen von TG zum Zeitpunkt einer unveränderten linksventrikulären Leistung eine deutliche Abnahme der Isoenzym-Aktivität der Mito-CK aufwiesen, was zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtaktivität der CK führte. Dies spricht zunächst einmal ebenfalls dagegen, dass ein Verlust der Myozytenmasse für die beschriebenen Unterschiede verantwortlich ist. Viel wichtiger ist, dass diese Veränderung der Verteilung der CK-Isoenzyme von der normalerweise bei Herzinsuffizienz zu beobachtenden Verteilung der CK-Isoenzyme abweicht, welche typischerweise eine signifikante Reduzierung der MM-CK und einen Anstieg der B-CK aufweist (21, 22, 35). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden, wo die Absolutwerte der Aktivitäten von MM-, BB- und MB-CK unverändert waren. Unsere Erkenntnisse stützen jedoch die Hypothese, dass eine erhöhte adrenerge Stimulation den CK-Gehalt des Herzens reguliert. Bei der Perfusion isolierter Herzen mit Norepinephrin zeigte sich ein CK-Verlust und es wurde über akute Veränderungen der CK-mRNA-Expression bereits nach drei Stunden kontinuierlicher Gabe von Isoproterenol berichtet (17). Ob die in der vorliegenden Studie beobachteten Veränderungen einzigartige Charakteristika dieses Modells sind oder vielmehr ein Übergangsstadium hin zur Entwicklung der Verteilung, die man typischerweise bei Herzinsuffizienz beobachten kann, kann anhand der gegenwärtigen Daten nicht beantwortet werden.

Die Beobachtung der selektiven Veränderung der Mito-CK zu diesem frühen Zeitpunkt gibt einen Hinweis darauf, dass die Mitochondrien in diesem Modell der erhöhten adrenergen Stimulation frühzeitig direkt oder indirekt betroffen sind. Dies wird darüber hinaus durch die Beobachtung gestützt, dass die Citratsynthase, ein anderes mitochondriales Protein und ein unabhängiger Marker für die Mitochondrienmenge, in der vorliegenden Studie ebenfalls signifikant erniedrigt war. Es muss jedoch noch gezeigt werden, welche Bestandteile sich weiter verändern und noch wichtiger, wohin die beobachteten Veränderungen im myokardialen CK-System später führen und in welchem Umfang sie zur Entwicklung einer kontraktilen Dysfunktion bei TG beitragen.

Zusammenfassend liefern die vorliegenden Erkenntnisse über Veränderungen des CK-Systems, des Creatinstoffwechsels und der Mitochondrienproteine in den Herzen der TG vor der Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion

einen weiteren Beweis dafür, dass Veränderungen im myokardialen Energiestoffwechsel eine zentrale Rolle bei der Verschlechterung der kardialen Funktion nach chronischer β -adrenerger Stimulation spielen. Zukünftige Studien, die sich auf die Verhinderung dieser Veränderungen in diesem transgenen Tiermodell konzentrieren, könnten möglicherweise bei der Identifizierung neuer Ziele der Herzinsuffizienztherapie behilflich sein.

5. Zusammenfassung

Das β -Rezeptorensystem spielt nicht nur eine wesentliche Rolle in der Modulation von linksventrikulärer Funktion und Herzfrequenz, sondern ist auch an der Entwicklung der Herzinsuffizienz maßgeblich beteiligt. Es konnte bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass eine herzspezifische Überexpression des β_1 -adrenergen Rezeptors an transgenen Mäusen initial zu einer gesteigerten Kontraktilität, im weiteren Verlauf zu einer linksventrikulären Hypertrophie und schließlich zu einer Herzinsuffizienz führt. Da Veränderungen im kardialen Energiestoffwechsel ein Charakteristikum für alle Formen der Herzinsuffizienz sind, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Veränderungen im myokardialen Energiestoffwechsel dieser Mäuse vor den Zeichen einer kardialen Dysfunktion nachweisbar sind. Dazu wurden an isolierten Langendorff-perfundierten Herzen von 4 Monate alten Wildtyp- und β_1 -überexprimierten Mäusen (TG) simultan die linksventrikuläre Funktion und der Energiestoffwechsel (^{31}P -NMR-Spektroskopie) bei unterschiedlichen Arbeitslastbedingungen charakterisiert.

Die isovolumetrische linksventrikuläre Funktion (Druck-Frequenz-Produkt) der β_1 -überexprimierten Herzen unterschied sich nicht von der der Wildtyp-Herzen. Das Phosphocreatin (PCr)/ATP-Verhältnis war jedoch unter gleichen Lastbedingungen in den β_1 -überexprimierten Herzen signifikant niedriger als in denen der WT-Herzen. Parallel zeigte sich im Vergleich zu den WT-Herzen eine Verringerung des Gesamtcreatin-Gehalts (gemessen mittels HPLC). Des Weiteren konnten eine signifikante Abnahme des Creatintransporter-Gehalts, der Aktivität der mitochondrialen und der totalen Creatinkinase sowie der Aktivität der Citratsynthase (als Marker der Mitochondriendichte) nachgewiesen werden. Zusammenfassend erbringen damit diese noch vor der Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion in transgenen Herzen nachweisbaren Veränderungen im Creatinkinase-System, im Creatinstoffwechsel und im Bereich der mitochondrialen Proteine einen weiteren Hinweis dafür, dass Veränderungen im myokardialen Energiestoffwechsel eine mitentscheidende Rolle bei der Verschlechterung der Herzleistung nach chronischer β -adrenerger Stimulation spielen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

TG	Maus mit transgenem β_1 -adrenergem Rezeptor
WT	Wildtyp-Maus
RPP	Produkt aus Herzfrequenz und linksventrikulärem Druck
DevP	entwickelter linksventrikulärer Druck (systolischer-diastolischer Druck)
dP/dt	Druckänderungsgeschwindigkeit
EDP	enddiastolischer Druck
HR	Herzfrequenz
bpm	Schläge pro Minute
NMR	Nuclear magnetic resonance
PCr	Phosphocreatin
P _i	anorganisches Phosphat
ΔG_{ATP}	freie Energie der ATP-Hydrolyse
CK	Creatinkinase
LDH	Laktatdehydrogenase
Mito-CK	mitochondriale Isoform der Creatinkinase
K _{eq}	allgemeine Gaskonstante

7. Literaturverzeichnis

- 1 Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeyer TJ, et al:
Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32(5):817-30.
- 2 Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al:
Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307(4):205-11.
- 3 Brodde OE:
Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):203-42.
- 4 Buxton IL, Brunton LL:
Direct analysis of beta-adrenergic receptor subtypes on intact adult ventricular myocytes of the rat. *Circ Res* 1985; 56(1):126-32.
- 5 Chapados RA, Gruver EJ, Ingwall JS, Marsh JD, Gwathmey JK:
Chronic administration of cardiovascular drugs: altered energetics and transmembrane signaling. *Am J Physiol* 1992; 263(5 Pt 2):H1576-86.
- 6 CIBIS Investigators and Committees:
A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The cardiac insufficiency bisoprolol study (CIBIS). *Circulation* 1994; 90(4):1765-73
- 7 Conway MA, Allis J, Ouwerkerk R, Niioka T, Rajagopalan B, Radda GK:
Detection of low phosphocreatine to ATP ratio in failing hypertrophied human myocardium by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Lancet* 1991; 338(8773):973-6.
- 8 Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, Lohse MJ:
Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsyspecimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(1):146-54.
- 9 Engelhardt S, Boknik P, Keller U, Neumann J, Lohse MJ, Hein L:
Early impairment of calcium handling and altered expression of junction in hearts of mice overexpressing the beta1-adrenergic receptor: *FASEB J* 2001; 15(14):2718-20.
- 10 Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ:
Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol* 2001; 60(4):712-7.
- 11 Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ:
Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(12):7059-64.
- 12 Feldmann DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR:
Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors-alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2(9):475-83.

- 13 Friebolin H:
Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. VCH-Verlag, 2. Auflage 1988; 1-20.
- 14 Gadian DG:
Nuclear magnetic resonance and its application to living systems. Oxford University Press 1982; 1-29.
- 15 Gibbs C:
The cytoplasmatic phosphorylation potential. Its possible role in the control of myocardial respiration and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17(8):727-31.
- 16 Günther H:
NMR-Spektroskopie, Eine Einführung in die Protonenresonanz-Spektroskopie und ihre Anwendungen in der Chemie. Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage 1983; Kapitel 1.
- 17 Hammerschmidt S, Bell M, Buchler N, et al:
Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under beta-adrenergic stimulation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1502(3):471-80.
- 18 Hardy CJ, Weiss RG, Bottomley PA, Gerstenblith G:
Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1991; 122(3 Pt 1):795-801.
- 19 Hugel S, Horn M, de Groot M, et al:
Effects of ACE inhibition and beta-receptor blockade on energy metabolism in rats postmyocardial infarction. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 2):H2167-75.
- 20 Ingwall JS:
Is cardiac failure a consequence of decreased energy reserve? *Circulation* 1993; 87(Suppl VII):58-62.
- 21 Ingwall JS, Atkinson DE, Clarke K, Fetters JK:
Energetic correlates of cardiac failure: changes in the creatine kinase system in the failing myocardium. *Eur Heart J* 1990; 11(Suppl B):108-15.
- 22 Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, et al:
The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. *N Engl J Med* 1985; 313(17):1050-4.
- 23 Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, et al:
Myocardial beta-adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure. *J Clin Invest* 1993; 91(3):907-14.
- 24 Laser A, Neubauer S, Tian R, et al:
Long-term beta-blocker treatment prevents chronic creatine kinase and lactate dehydrogenase system changes in rat hearts after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(2):487-93.
- 25 Lawson JW, Veech RL:
Effects of pH and free Mg²⁺ on the iKi eq of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolyses and phosphate transfer reactions. *J Biol Chem* 1979; 254(14):6528-37.

- 26 Liao R, Nascimben L, Friedrich J, Gwathmey JK, Ingwall JS:
Decreased energy reserve in an animal model of dilated cardiomyopathy.
Relationship to contractile performance. *Circ Res* 1996; 78(5):893-902.
- 27 Lohse MJ:
Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim
Biophys Acta* 1993; 1179(2):171-88.
- 28 Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T:
What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*
2003; 93(10):896-906.
- 29 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ:
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;
193:265-75.
- 30 Michael O`Donnell J, Narayan P, Bailey MQ, et al:
31P-NMR analysis of congestive heart failure in the SHHF/Mcc-facp rat
heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(2):235-41.
- 31 Moon R, Richards J:
Determination of intracellular pH by 31P magnetic resonance. *J Biol
Chem* 1973; 248:7276-78.
- 32 Nascimben L, Friedrich J, Liao R, Pauletto P, Pessina AC, Ingwall JS:
Enalapril treatment increases cardiac performance and energy reserve
via the creatine kinase reaction in myocardium of Syrian myopathic
hamsters with advanced heart failure. *Circulation* 1995; 91(6):1824-33.
- 33 Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, et al:
Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium.
Circulation 1996; 94(8):1894-901.
- 34 Neubauer S, Ertl G, Krahe T, et al:
Experimentelle und klinische Möglichkeiten der MR-Spektroskopie des
Herzens. *Z Kardiol* 1991; 80:25-36.
- 35 Neubauer S, Frank M, Hu K, et al:
Changes of creatine kinase gene expression in rat heart post-myocardial
infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(4):803-10.
- 36 Neubauer S, Horn M, Cramer M, et al:
Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in
patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 96(7):2190-6.
- 37 Neubauer S, Horn M, Ertl G, Kochsiek K:
Magnetresonanz-Spektroskopie des Herzens. *Dtsch med Wschr* 1993;
118:1527-31.
- 38 Neubauer S, Horn M, Naumann A, et al:
Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat
hearts with chronic myocardial infarction. *J Clin Invest* 1995; 95(3):1092-
100.
- 39 Neubauer S, Remkes H, Spindler M, et al:
Downregulation of the Na(+)-creatine cotransporter in failing human
myocardium and in experimental heart failure. *Circulation* 1999;
100(18):1847-50.

- 40 Rosalski SB:
An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. J Lab Clin Med 1967; 69:696-705.
- 41 Saupe KW, Spindler M, Hopkins JC, Shen W, Ingwall JS:
Kinetic, thermodynamic, and developmental consequences of deleting creatine kinase isoenzymes from the heart. Reaction kinetics of the creatine kinase isoenzymes in the intact heart. J Biol Chem 2000; 275(26):19742-6.
- 42 Seppet EK, Saks, VA:
Thyroid hormones and the creatine kinase system in cardiac cells. Mol Cell Biochem 1994; 133(-4):299-309.
- 43 Shen W, Asai K, Uechi M, et al:
Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. Circulation 1999; 100(20):2113-8.
- 44 Spindler M, Saupe KW, Christe ME, et al:
Diastolic dysfunction and altered energetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1998; 101(8):1775-83.
- 45 Starling RC, Hammer DF, Altschuld RA:
Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. Mol Cell Biochem 1998; 180(1-2):171-7.
- 46 Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ:
Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. Circulation 1993; 87(2):454-63.
- 47 Waagstein F, Caidahl K, Wallentin I, Bergh CH, Hjalmarson A:
Long-term beta-blockade in dilated cardiomyopathy. Effects of short- and long-term metoprolol treatment followed by withdrawal and readministration of metoprolol. Circulation 1989; 80(3):551-63.
- 48 Waagstein F, Stromblad O, Andersson B, Bohm M, et al:
Increased exercise ejection fraction and reversed remodeling after long-term treatment with metoprolol in congestive heart failure: a randomized, stratified, double-blind, placebo-controlled trial in mild to moderate heart failure due to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2003; 5(5):679-91.
- 49 Wiesmann F, Ruff J, Engelhardt S, et al:
Dobutamine-stress magnetic resonance microimaging in mice: acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts. Circ Res 2001; 88(6):563-9.
- 50 Zhang J, Merkle H, Hendrich K, et al:
Bioenergetic abnormalities associated with severe left ventricular hypertrophy. J Clin Invest 1993; 92(2):993-1003.

8. Verwendete Internetadressen

http://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page

<http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite>

<http://www.gesundheit.de/roche/>

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Spindler M, Engelhardt S, Niebler R, Wagner H, Hein L, Lohse MJ, Neubauer S:
Alterations in the myocardial creatine kinase system precede the development
of contractile dysfunction in β 1-adrenergic receptor transgenic mice.

J Mol Cell Cardiol 2003; 35:389-97

Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. M. Spindler danke ich für die Überlassung des Themas und für die Übernahme des Referats. Insbesondere danke ich ihm für die Unterstützung, die er mir während der gesamten Zeit entgegenbrachte.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Ertl, in dessen Klinik und Labors die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Herrn Professor Dr. K. Schuh danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Helga Wagner, Lisa Bauer und Charlotte Dienesch danke ich für die Unterstützung beim experimentellen Teil dieser Arbeit.

Herrn Clemens Schaab danke ich für die Unterstützung bei der EDV.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Reinhard, Lothar Niebler
Geburtsdatum 31. August 1974
Geburtsort Erlangen
Familienstand verheiratet

Schul Ausbildung

09/1981-07/1985 Grundschule Poxdorf
09/1985-07/1994 Herder-Gymnasium Forchheim
(Humanistisches Gymnasium)

Zivildienst

07/1994-09/1995 Städtisches Krankenhaus Forchheim

Hochschulausbildung

11/1995-09/1997 Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
11/1997-10/2002 Klinisches Studium an der Universität Würzburg
29.10.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04/2001-06/2001 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin,
Medizinische Universitätsklinik Würzburg
06/2001-08/2001 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin,
Kantonsspital Laufen, Schweiz
08/2001-11/2001 2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie,
Father Muller's Hospital Mangalore, Indien

12/2001-02/2002 3. Tertial des Praktischen Jahres, Orthopädie,
Kantonsspital Bruderholz, Schweiz

Ärztliche Tätigkeit

01/2003-06/2004 Arzt im Praktikum im Fachgebiet Innere Medizin,
Klinikum Kulmbach

07/2004-12/2004 Assistenzarzt im Fachgebiet Innere Medizin,
Klinikum Kulmbach

01/2005-06/2005 Assistenzarzt im Fachgebiet Anästhesie,
Praxis Dres. med. Gatzemberger und Kollegen, Würzburg

09/2005-08/2006 Assistenzarzt im Fachgebiet Chirurgie,
Krankenhaus Wertheim

11/2006-12/2006 Assistenzarzt im Fachgebiet Allgemeinmedizin,
Praxis Dr. med. Hoffmeister, Kunreuth

01/2007-09/2007 Assistenzarzt im Fachgebiet Allgemeinmedizin,
Praxis Dres. med. Brunner/Wiedemann, Kreuzwertheim

seit 10/2007 Assistenzarzt im Fachgebiet Allgemeinmedizin,
Praxis Dr. med. Hoffmeister, Kunreuth

Reinhard Wübli

