

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Kardiale und muskuläre Phänotypisierung von Creatinkinasedefizienz

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Veronika Katharina Posch

aus Prien am Chiemsee

Würzburg, April 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. S. Maier

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. E. Wischmeyer

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

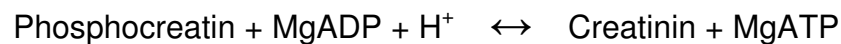
1	Einleitung	1
1.1	Das Creatinkinase-System	1
1.2	Creatinkinase-defiziente Mäuse	2
1.3	Muskelfasertypen	4
1.4	Trainingsbedingte Adaptation von Skelett- und Herzmuskel	7
1.5	Differentielle Verminderung von Belastungs- und Ausdauertraining bei verschiedenen Creatinkinase-defizienten Mäusen	8
2	Material	11
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Isolierung adulter Kardiomyozyten	11
2.2.1	Chemikalien	11
2.2.2	Geräte	12
2.2.3	Lösungen	13
2.3	Ruhe- und Stress-EKG	16
2.3.1	Chemikalien	16
2.3.2	Geräte	16
2.4	Skelettmuskelquerschnitte	16
2.4.1	Chemikalien	16
2.4.2	Geräte	17
2.4.3	Antikörper	17
2.4.4	Lösungen	18
3	Methoden	19
3.1	Isolierung adulter Kardiomyozyten zur Größenbestimmung	19
3.1.1	Präparation und Isolierung	19
3.1.2	Auswertung	20
3.2	Ruhe- und Stress-EKG	21
3.2.1	Aufzeichnung	21
3.2.2	Auswertung	21
3.3	Skelettmuskelquerschnitte	22
3.3.1	Gewinnung der Muskelquerschnitte	22

3.3.2	Immunhistochemische Färbungen	23
3.3.3	Auswertung	23
4	Ergebnisse	25
4.1	Kardiomyozyten	25
4.2	Ruhe- und Stress-EKG	27
4.2.1	Ruhe-EKG	28
4.2.2	Dobutamin-Stress-EKG	31
4.3	Skelettmuskelquerschnitte	33
4.3.1	Größe der Muskelfasern	34
4.3.2	Verteilung der Muskelfasertypen	41
5	Diskussion	50
5.1	Zellgrößen adulter Kardiomyozyten	50
5.2	Ruhe- und Stress-EKG	53
5.3	Skelettmuskel	57
5.3.1	Größe der Muskelfasern	57
5.3.2	Verteilung der Muskelfasertypen	59
6	Zusammenfassung	63
	Literaturverzeichnis	65

1 Einleitung

1.1 Das Creatinkinase-System

Das Creatinkinase-System ist ein für die Energiegewinnung bedeutender Mechanismus in Skelett- und Herzmuskel. Die Creatinkinase (CK) katalysiert den reversiblen Transport von energiereichen Phosphatgruppen zwischen Adenosindiphosphat (ADP) und Creatinin:



Säugetiere und Vögel besitzen fünf verschiedene CK Isoenzyme. Diese Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert und unterscheiden sich zusätzlich in ihrer intrazellulären Lokalisation [24].

Drei der fünf CK Isoenzyme sind zytosolische Enzyme, die aus je zwei Untereinheiten gebildet werden. Es gibt zwei Homodimere, die sich aus je zwei Untereinheiten M (muscle) oder B (brain) zusammensetzen und das heterodimere Isoenzym CK MB [48]. Das CK MM Isoenzym findet sich vor allem im reifen Skelettmuskel und im Herzmuskel, während die Aktivität der CK BB in Gehirn, neuronalem Gewebe und in embryonalem Herz- und Skelettmuskelgewebe am höchsten ist. Zusätzlich zeigt sich die CK BB in hochspezialisiertem Gewebe und Zellen wie den Photorezeptoren der Retina, den Spermatozoen, der Plazenta und dem Uterusepithel. Ein Teil der CK MM ist strukturell mit kardialen und skelettalen Myofilamenten an der M-Bande assoziiert oder locker an sarkomere Aktinfilamente gebunden [40][24], wodurch eine funktionelle Kopplung an die Myosin-ATPase entsteht [47]. Eine ähnliche funktionelle Bindung besteht zur Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums und der Na^+ - K^+ -ATPase des Sarkolemms [22][31][33].

Die heterodimere Isoform CK MB findet man während der Embryonalentwicklung quergestreifter Muskulatur und im adulten Herzmuskel.

Die verbleibenden zwei Isoformen sind getrennte Subtypen, die sich im intramembranösen Raum der Mitochondrien befinden [49]. Typischerweise wird die sarkomere Mito-CK (Sc mito CK) im quergestreiften Muskel meist in Verbindung mit der M-CK Untereinheit exprimiert, wohingegen die ubiquitäre Mito-CK (Ub mito CK) in den Geweben mit hoher B-CK-Aktivität exprimiert wird. Generell gilt, dass Gewebe mit einer hohen aeroben Kapazität einen höheren Anteil mitochondrialer CK an der CK-Gesamtaktivität haben. Die mitochondrialen Isoformen sind in der Nähe der Adenosinnukleotidtranslokase an die Außenseite der inneren Mitochondrienmembran gebunden und unterstützen so die mitochondriale Atmung und die reversible CK-Reaktion [24].

Das Creatinkinasesystem hat mehrere Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase im Körper. Zum einen stellt das Creatinkinasesystem einen temporären Energiespeicher und ein Energietransportsystem dar. Zum anderen minimiert es einen intrazellulären ADP-Anstieg und verhindert so eine Inaktivierung zellulärer ATPasen und einen Nettoverlust an Adenosinnukleotiden. Des Weiteren dient das Creatinkinasesystem als Protonenpuffer und wirkt dadurch einer Übersäuerung der Zelle vor allem am Beginn der körperlichen Belastung, wenn die Glykogenolyse noch nicht angelaufen ist, entgegen [48].

1.2 Creatinkinase-defiziente Mäuse

Um die Bedeutung des CK-Systems näher untersuchen zu können, wurden Mäuse gezüchtet, denen entweder die sarkomere mitochondriale CK (Mito-CK), die zytosolische CK (M-CK) oder beide Isoenzyme (Double-CK) fehlen.

Dazu wurden die jeweiligen CK-Null-Allele durch Gentransfer in von 129SvE abgeleiteten embryonalen Stammzellen der Linie AB-1 erzeugt. Diese rekombinanten Stammzellen wurden in C57BL/6 Blastozysten injiziert und einer pseudoschwangeren Leihmutter in den Uterus eingebracht. Die chimären Tiere wurden an Hand der Fellfarbe identifiziert. Nun wurden die chimären Männchen mit C57BL/6 Weibchen gekreuzt, wobei einige Chimäre die Mutation an ihre Nachkommen weitergaben. Nach Kreuzung heterozygoter Tiere erhielt man nun die homozygoten knockout-Tiere.

Zur Züchtung von Double-CK^{-/-}-Mäusen wurden homozygote Mito-CK^{-/-}-Tiere mit homozygoten M-CK^{-/-}-Tieren gekreuzt. Die Typisierung erfolgte durch Southern Blots aus Schwanzbiopsien [8][38].

Die Creatinkinase-defizienten Mäuse erscheinen normal und lebensfähig. Wobei die Skelettmuskeln der M-CK^{-/-}-Tiere eine verminderte Schnellkraft und eine reduzierte Kraftentwicklung aufweisen. Des Weiteren entspannen sich die Muskeln langsamer, zeigen eine veränderte Reaktion auf Ca²⁺ und sind langsamer ermüdbar. In Skelettmuskeln wurde neben einem hyperproliferativen sarkoplasmatischen Retikulum ein höherer Gehalt an Mitochondrien, besonders in schnellen Muskeln, und zusätzliche Veränderungen der Mitochondrien in deren Morphologie und Zusammensetzung nachgewiesen [8][38]. Es konnten keine grundlegenden Umbauvorgänge in den Muskelfasern der M-CK^{-/-}- und Mito-CK^{-/-}-Tiere nachgewiesen werden. Die Anpassung betraf hauptsächlich die Regulierung der Mitochondrien und die Glykolyse, was zeigt, dass der durch das Fehlen des CK-Systems verminderte Energiepuffer durch eine Steigerung der Energieproduktion kompensiert wird [3][43][45]. Zum Anderen legen die Vergrößerung des Mitochondrienvolumens und der Umbau der Zytoarchitektur die Vermutung nahe, dass es so zu einer lokalen Kontrolle der Adenosinnukleotidkonzentration kommt [39]. Die Veränderungen der Zytoarchitektur zeigen die Bedeutung des Zusammenspiels der Organelle bei Energiegewinnung und Signaltransduktion. So kann die kontraktile Funktion und die Ca²⁺-Homöostase bei den CK-knockout-Tieren aufrechterhalten werden.

Das CK-System ist Bestandteil eines Netzwerks aus sich ergänzenden enzymatischen Wegen, die die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase und der physiologisch effizienten Energiegewinnung gewährleisten. In CK-knockout-Tieren wird ein großer Teil des gesamten Umsatzes an Adenosintriphosphat durch alternative Stoffwechselwege wie die Adenylatzyklase, die Glykolyse und den Guanylatphosphat-Transfer übernommen, um den Energiemangel zu minimieren [24].

1.3 Muskelfasertypen

Ein besonderes Merkmal der quergestreiften Skelettmuskulatur ist ihre Faserarchitektur. Die hochorganisierte Anordnung der Muskelfasern gewährleistet eine Vielzahl funktioneller Möglichkeiten. Die Existenz verschiedener Muskelfasertypen führt dazu, dass die Skelettmuskulatur ein sehr heterogenes Gewebe darstellt. Die Muskelfasertypen können im Bezug auf verschiedene strukturelle und funktionelle Eigenschaften unterschieden werden. Aus einer Vielzahl in der Literatur beschriebener Klassifikationsschemata hat sich heute die Klassifikation der Muskelfasertypen nach den spezifischen Myosinprofilen, besonders der Myosinschwerketten (MHC) durchgesetzt [28].

Myosin ist ein bedeutendes Strukturprotein des kontraktiven Apparates der quergestreiften Skelettmuskulatur. Das stabförmige Myosinmolekül ist aus zwei Peptid-Helices gewunden und kann proteolytisch in eine leichte (MLC) und eine schwere Kette (MHC) gespalten werden. Die leichte Kette bildet den größten Teil des Stabes, wohingegen der globuläre Kopf mit der ATP-Bindungsstelle und ein kleiner Teil des Stabes von der Myosinschwerkette gebildet werden. Die stabförmigen Teile der Myosinmoleküle überlappen sich gegenseitig und bilden so das Myosinfilament. Die Kopf- und Halsteile bilden die Querbrücken zwischen Myosin- und Aktinfilamenten und sind direkt an der Umwandlung von chemischer in mechanische Energie beteiligt [17].

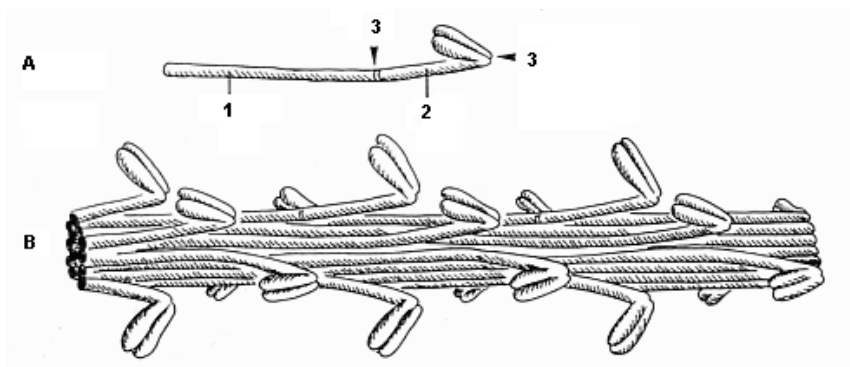


Abbildung 1: Myosinstruktur, Quelle: [17]
A: Myosinmolekül 1- Myosinleichtkette,
2- Myosinschwerkette,
3-„Scharnierstellen“
B: Myosinfilament

Heute sind insgesamt elf verschiedene Myosinschwerketten bekannt (s. Tabelle 1), von denen jede einzelne ein eigenständiges Mitglied einer Multigenfamilie ist. Einige dieser MHC-Isoformen werden muskelspezifisch exprimiert (MHCII_m, MHC_{eom}, MHCII_{ton}, MHCII_α, MHCII_a, MHC_{emb}, MHC_{neo}), wohingegen andere (MHCII_β, MHCII_a, MHCII_{d/x}, MHCII_b) in mehreren Skelettmuskeln verteilt sind. Des Weiteren gibt es bei der Expression einiger Isoformen Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies. So zeigt sich, dass Menschen und andere große Säugetiere unter normalen Bedingungen in ihren Muskeln MHCII_b nicht exprimieren.

Designation	Nomenclature	Muscel/fiber location
Fast-twitch	MHCII _b	Fiber types IIB, IIBD, IIAB
Fast-twitch	MHCII _{d/x}	Fiber types IID, IIBD, IIDA
Fast-twitch	MHCII _a	Fiber types IIA, IIAB, IIDA, IIC, IC
Fast-twitch	MHC _{eom}	Extraocular and laryngeal muscles
Fast-twitch	MHCII _m	Masticarory muscles
Slow-twitch	MHCII _β	Fiber types I, IC, IIC
Slow-twitch	MHCII _α	Extraocular, diaphragm, masseter muscles
Slow-twitch	MHCII _a	Plantaris, soleus
Slow-tonic	MHCII _{ton}	Extraocular, laryngeal and tensor tympani muscle
Embryonic	MHC _{emb}	Extraocular muscle
Neonatal	MHC _{neo}	Extraocular, masseter muscle

*Tabelle 1: Muskelfasertypen und ihre Lokalisation
Quelle: [29]*

Methoden, wie die histochemische Untersuchung der myofibrillären Adenosintriphosphatase, die Verwendung von MHC-isoformspezifischen Antikörpern und die elektrophoretische Analyse der MHC-Isoformen führten zur zunehmenden Aufklärung über die Vielfältigkeit der Muskelfasertypen und ihrer Plastizität. All diese Methoden weisen darauf hin, dass es Muskelfasern gibt, die entweder nur eine MHC-Isoform (pure fiber types) oder mehrere MHC-Isoformen (hybrid fiber types) exprimieren.

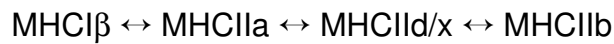
Entsprechend der hauptsächlich in Skelettmuskeln von ausgewachsenen Säugtieren gefundenen MHC-Isoformen, werden folgende reine Muskelfasern (pure fiber types) beschrieben: Langsame Muskelfasern vom Typ I mit der Myosinschwerkette I β und drei verschiedene schnelle Muskelfasertypen, nämlich Typ IIa mit der Myosinschwerkette IIa, Typ II d/x mit der Myosinschwerkette II d/x und Typ IIb Muskelfasern mit der Myosinschwerkette IIb. Die Koexpression von zwei MHC-Molekülen führt zur Bildung von Hybridmuskelfasern, die durch die vorherrschende MHC-Isoform wie folgt unterteilt werden können: Typ I/IIa auch Typ Ic genannt (MHC I β >MHC IIa), Typ IIa/I auch Typ IIc genannt (MHC IIa>MHC I β), Typ IIad (MHC IIa>MHC II d/x), Typ II d/a (MHC II d/x >MHC IIa), Typ IIbd (MHC II d/x >MHC IIb) und Typ IIbd (MHC IIb>MHC II d/x) [29]. Möglicherweise befinden sich Hybridmuskelfasern gerade in der Umwandlung von einem in einen anderen Muskelfasertyp.

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den auf der MHC-Klassifikation basierenden Muskelfasertypen und der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit. Die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit ist, im Vergleich zu allen Typ II-Fasern, bei Typ I-Fasern am geringsten. Typ IIb-Muskelfasern haben die höchste Verkürzungsgeschwindigkeit, wohingegen sich Typ IIa und Typ II d/x -Fasern ungefähr gleich schnell verkürzen [4].

Auch bei dem Quotienten aus der ATPase-Aktivität und der isometrischen Spannung zeigt sich der gleiche Zusammenhang wie schon bei der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit: Typ IIb Muskelfasern weisen den größten Quotienten auf, Typ IIa und II d/x mittlere Werte und die Muskelfasern des Typ I den kleinsten Quotienten.

Muskelfasern sind dynamische Strukturen, die ihren Phänotyp unter verschiedenen Bedingungen, wie zum Beispiel durch Zu- oder Abnahme der neuromuskulären Aktivität, Veränderung der hormonellen Situation (vor allem im Bezug auf die Schilddrüsenhormone), mechanischer Be- und Entlastung oder durch Alterungsprozesse, verändern können. Die Wechsel zwischen den verschiedenen MHC-Isoformen folgen meist einem generellen Schema. Es kommt zu ei-

nem schrittweisen und reversiblen Übergang von schnellen zu langsamen oder von langsamen zu schnelleren Fasertypen [5].



Die Muskelfasertypen unterscheiden sich in ihrer Energieversorgung. So verbrauchen schnelle Muskelfasern ihre Energiereserven aus Phosphocreatin und ATP um schnelle Kontraktionen über einen kurzen Zeitraum ausüben zu können. Da die Energiereserven nur begrenzt sind, ermüden sie schnell und müssen ihre Energiereserven durch anaerobe Glykolyse und oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien wieder erneuern. Langsame Muskelfasern haben dagegen - bei geringerer kontraktile Kraft - eine ausgeprägte oxydative Funktion, die basierend auf oxydativer Phosphorylierung, eine ausdauernde kontraktile Leistung gewährleistet. Langsame Muskelfasern passen somit ihre Energieproduktion dem Energiebedarf an. Eng damit verbunden ist das Creatinkinase-system, das die lokalen ADP- und ATP-Konzentrationen kontrolliert und so eine wichtige Verbindung zwischen der Energieproduktion und der Energieverwertung darstellt [44].

1.4 Trainingsbedingte Adaptation von Skelett- und Herzmuskel

Vermehrte Muskelaktivität, wie sie zum Beispiel bei Ausdauertraining auftritt, führt bei Mäusen zu schneller und bedeutender Adaptation des kardiovaskulären und muskulären Systems. Diese physiologische Anpassung bewirkt eine verbesserte Freisetzung, Aufnahme und Nutzung energiereicher Substrate, um nachhaltig physikalische Arbeit zu leisten.

Im freiwilligen Laufradtraining, das in etwa einer Ausdauertrainingsleistung entspricht, zeigt sich ein Anstieg sowohl der gelaufenen Strecke pro Tag als auch der Durchschnittsgeschwindigkeit. Eine signifikante Veränderung des Körpergewichts ergab sich nach vierwöchigem Laufradtraining nicht, so dass der Anstieg des absoluten Herzgewichts als eine physiologische Hypertrophie des Herzmuskels zu werten ist. Diese These wird durch die im Vergleich zu nicht

trainierten Tieren gesteigerte Expression kardialer Hypertrophiemarker, wie ANF und BNP, untermauert [1].

Auch die Skelettmuskeln adaptieren sich an die gesteigerte Beanspruchung durch eine veränderte Expression der Muskelfasertypen und einer Veränderung der Fasergröße. So kommt es zu einer gesteigerten Expression von Typ IIa-Fasern und einer Abnahme von Typ IIb-Fasern. Sowohl Typ I- als auch Typ IIa-Muskelfasern des M. gastrocnemius sind nach vierwöchigem Laufradtraining signifikant größer als die Fasern der Kontrollgruppe. Im M. tibialis anterior zeigt sich dagegen keine bedeutende Veränderung der Typ IIa-Fasergröße [1].

1.5 Differentielle Verminderung von Belastungs- und Ausdauertraining bei verschiedenen Creatinkinase-defizienten Mäusen

Um die *in vivo*-Konsequenz einiger oben beschriebener *in vitro*-Phänomene zu finden, wurde das Verhalten von M-CK^{-/-}, Mito-CK^{-/-} und Double-CK^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen bei Ausdauer- und Belastungstraining untersucht. Für das Ausdauertraining wurden männliche Tiere der verschiedenen Linien einem dreiwöchigen freiwilligen Laufradtraining unterzogen, wobei täglich die Zeit und die gelaufene Strecke aufgezeichnet wurden. Als Maß für den Trainingseffekt diente die Durchschnittsgeschwindigkeit. Am Ende der Trainingsperiode wurden die Herzen entnommen und gewogen. Anzumerken ist, dass sich nur zwei von insgesamt 22 Double-CK^{-/-} Mäusen dem freiwilligen Laufradtraining (definiert als >30 min/d) unterzogen. Somit können diese Zahlen nur als Trend gewertet werden. Eine andere Gruppe wurde nach einer Eingewöhnungsphase auf einem Laufband täglich über 60 Minuten oder bis zur Erschöpfung, mit kontrollierter Geschwindigkeit und Anstiegssteilheit trainiert. Das Belastungstraining auf dem Laufband wurde durch elektrische Stimulation motiviert. Untrainierte Geschwistertiere wurden als Kontrollgruppe verwendet und werden im Folgenden als Schläfer bezeichnet.

Im freiwilligen Laufradtraining zeigte sich, dass M-CK^{-/-}-Mäuse in etwa der gleichen Zeit kürzere Strecken laufen als Wildtypen. Mito-CK^{-/-}-Tiere unterscheiden sich dagegen im Bezug auf die gelaufene Zeit beziehungsweise Strecke nicht

signifikant von der Kontrollgruppe. Der Trainingseffekt, gemessen anhand der Durchschnittsgeschwindigkeit, ist bei M-CK^{-/-}-Mäusen signifikant geringer als bei Wildtypmäusen. Demgegenüber trainieren Mito-CK^{-/-}-Mäuse effektiver als Wildtypen (s. Abbildung 2).

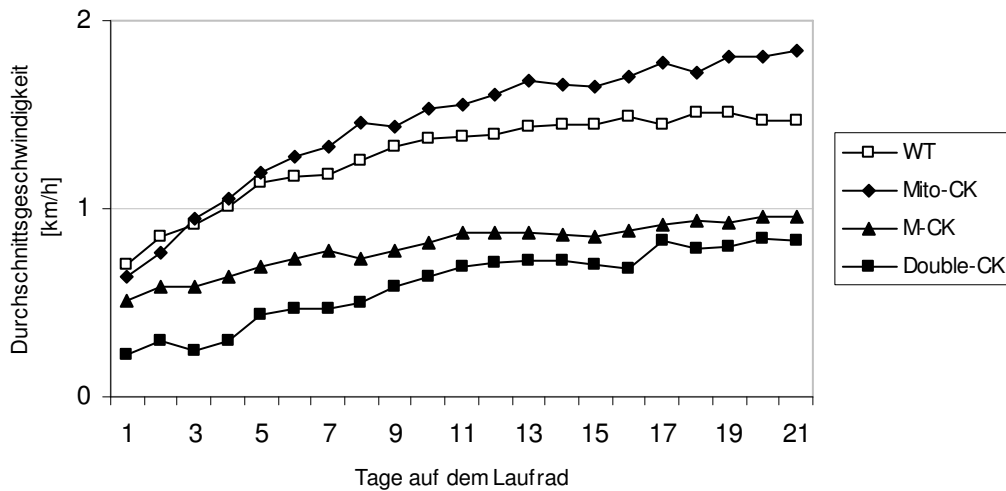


Abbildung 2: Trainingseffekt während dreiwöchigem freiwilligem Laufradtraining [19]

Die Herzen der Mito-CK^{-/-}- und Double-CK^{-/-}-Tiere sind basal hypertrophiert. Nach dreiwöchigem Laufradtraining wiesen Mito-CK^{-/-}-Mäuse im Gegensatz zu Wildtypen und M-CK^{-/-}-Mäusen keine adaptive physiologische Hypertrophie auf (s. Abbildung 4).

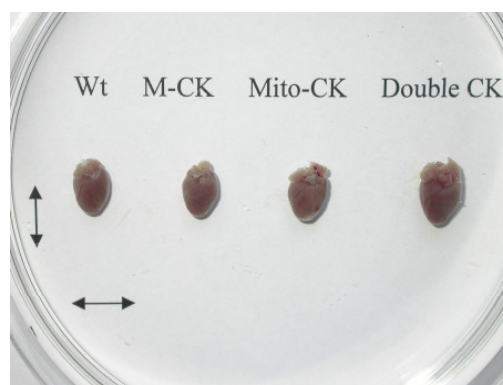


Abbildung 3: Isolierte Mäuseherzen; Herzen von Mito-CK^{-/-}- und Double-CK^{-/-}-Mäusen weisen eine basale Hypertrophie auf

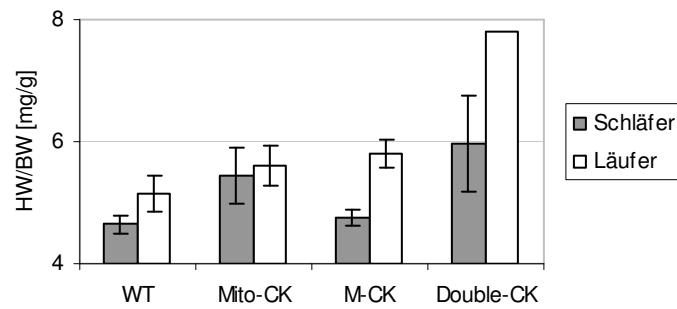


Abbildung 4: Zunahme von Herzgewicht (HW) zu Körpergewicht (BW) während dreiwöchigem freiwilligen Laufradtraining [19]

Bei forciertem Belastungstraining auf dem Laufband zeigte sich ein völlig anderes Bild als im Laufradtraining. Mito-CK^{-/-} und Double-CK^{-/-}-Mäuse wiesen eine schlechtere Belastbarkeit im Kurzzeittraining auf als Wildtypen, während M-CK^{-/-}-Tiere effizienter trainierten (s. Abbildung 5) [19].

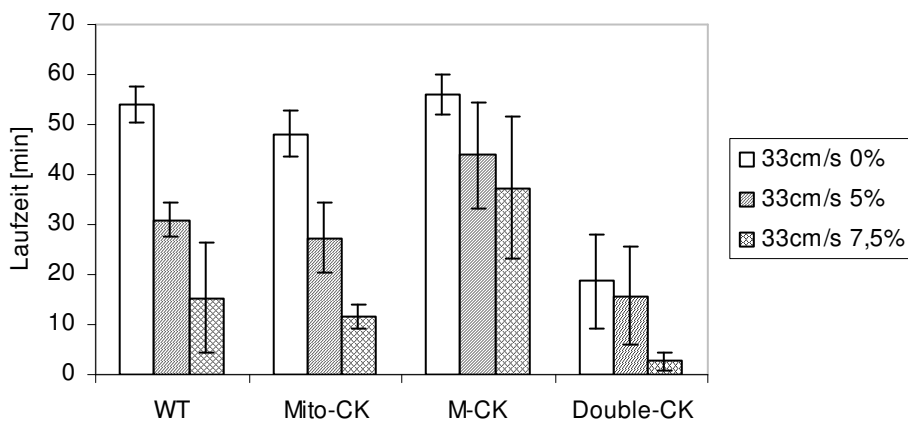


Abbildung 5: Forciertes Laufbandtraining der Mäuse für 60min/Tag mit ansteigender Laufbandsteilheit [19]

Ob es sich eher um einen kardialen oder einen muskulären Phänotyp handelt, der als Ursache oben genannter Daten aus dem Ausdauer- und Belastungstraining in Frage kommt, soll mit dieser Arbeit geklärt werden.

2 Material

Dieses Kapitel beinhaltet die Beschreibung der verwendeten Versuchstiere einschließlich deren Haltung und Versorgung sowie eine tabellarische Auflistung der verwendeten Chemikalien, Gerätschaften und der Software.

2.1 Versuchstiere

- Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57/BL6
- M-CK^{-/-}-Mäuse
- Sc Mito-CK^{-/-}-Mäuse
- Double-CK^{-/-}-Mäuse

Die Tiere wurden in Käfigen zu maximal fünf Mäusen gehalten. Sie hatten einen festen 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus und freien Zugang zu Wasser und Futter.

Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere zwischen zwei und drei Monaten alt.

Es wurden nur männliche Tiere verwendet.

Für die Skelettmuskelquerschnitte wurde ein Teil der männlichen Mäuse der verschiedenen Linien über drei Wochen einem Laufradtraining unterzogen. Da die Double-CK^{-/-}-Mäuse im freiwilligen Laufradmodell nicht laufen, entfällt hier die Läufer-Gruppe.

2.2 Isolierung adulter Kardiomyozyten

2.2.1 Chemikalien

Insulin	Sigma I-1882
200 mM L-Glutamin	Gibco 21051-024
100 x MEM Vitamine	Gibco 11120-052
50 x Aminosäuren	Gibco 11130-051
D-Mannitol	Sigma M-9546

Taurin	Sigma T-8691
Creatinin	Sigma C-0780
Kollagenase Typ 2	Worthington LS004176
Heparin	Sigma H-3393
BDM	Sigma B-0753
MEM	Sigma M-1018
HEPES	Sigma H-3375
D(+)-Glucose	Merck 1.08342
Phenol Rot	Sigma P-5530
MgCl ₂ – H ₂ O	Roth 2189.2
NaHCO ₃	Merck 1.06329
KH ₂ PO ₄	Merck 1.04873
NaOH	Merck 1.06498
CaCl ₂ – H ₂ O	Merck 1.02382
KCl	Merck 1.04936
HCl	Merck 1.00317
NaCl	Merck 1.06404
NAH ₂ PO ₄ – H ₂ O	Merck 1.06346
Penicillin G	Sigma PEN-K
Streptomycin Sulfat	Sigma S-9137
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA A15-043

2.2.2 Geräte

2.2.2.1 Großgeräte

Langendorff-Apparatur	Eigenbau, siehe Abbildung
Geheiztes Wasserbad	WTE var 3185, Assistent
Zentrifuge	Universal 32, Hettich
Auflichtmikroskop	Olympus
Mikroskop	Olympus, CK2
Digitalkamera	Nikon Coolpix 4500
Computer	DELL

2.2.2.2 Kleingeräte und Zubehör

Präparationsbesteck	Aesculap
Präparationskammer	Eigenbau
Petrischalen Ø 5 cm	Cell Star
Tubes, verschiedene Größen	Eppendorf
Eppendorff Caps	Eppendorf
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf
Cell Strainer, 100 µm	Becton Dickinson #352360
Perma-HandR Seide	Ethicon EH6761H
Rasierklinge	z.B. Gillette
Objektträger mit Maßstab	Menzel-Gläser

2.2.2.3 Software

Auswertung	Sigma Scan Pro5, SPSS Inc.
------------	----------------------------

2.2.3 Lösungen

Die für die Isolierung der Kardiomyozyten benötigten Lösungen wurden für mehrere Versuche angesetzt und portioniert bei unten angegebenen Lagerungsbedingungen aufbewahrt. Am Tag der Präparation wurden aus unten genannten Lösungen die Isolationslösungen A bis E angesetzt.

SKGMEM

1 l MEM
350 mg NaHCO₃
1ml Penicillin Stock (50000 U/ml H₂O dest)
1ml Streptomycin Stock (50 mg/ml H₂O dest)
2,5% FCS (Fetal Calf Serum)

Insulin

1 mg/ml
Ansatz 10 ml in HCl
Einfrieren in 125 µl Aliquots bei -20° C

Kardioplege Lösung

HEPES	5,84 g
NaHCO ₃	0,323 g
Dextrose	30 g
Mannitol	6,25 g
Heparin	110,0 mg
KCl	1,5 g
H ₂ O (steril)	820 ml
pH 7,4, 300-310 mOsm	
Einfrieren in 10ml Aliquots bei -20 °C	

10 x EBSS – verändert, 1000ml

KCl	4 g
NaCl	68 g
NaH ₂ PO ₄ – H ₂ O	1,4 g
Glucose	10 g
Phenol Rot	0,1 g

Wittenberg Isolations Medium (WIM, Ca²⁺ frei), ca 2000 ml

10 x EBSS (verändert)	200 ml
1 M MgCl ₂	3,44 ml
30 % Glucose	7,3 ml
1 M NaHCO ₃	8,8 ml
1 M HEPES	42,2 ml
1 M KH ₂ PO ₄	2,94 ml
5 M NaOH	3,2 ml
200 mM L-Glutamin	20 ml
100 x MEM Vitamine	20 ml
50 x MEM Aminosäuren	40 ml
BDM	2,022 g
Taurin	1,251 g
H ₂ O (steril)	1640 ml
pH 7,4; steril gefiltert bei 4 °C aufbewahren	

Am Tag der Präparation wurden aus oben genannten Lösungen die Isolationslösungen A bis E angesetzt. Dazu wurden zunächst als Grundlage für die Lösungen 125 µl Insulin in 250 ml Ca^{2+} freiem WIM gelöst. Die Isolationslösungen wurden bis zu ihrer Verwendung in einem 37°C warmen Wasserbad aufbewahrt.

Lösung A

50 ml WIM/Insulin
250 µl 1 M MgCl_2

Lösung B

50 ml WIM/Insulin
40 mg Collagenase Typ 2
50 µl 10 mM CaCl_2
250 µl 1 M MgCl_2
CAVE: Collagenase erst kurz vorher zufügen, da sie ihre Aktivität schnell verliert

Lösung C

50 ml WIM/Insulin
250 mg Albumin
750 µl 10 mM CaCl_2
250 µl 1 M MgCl_2

Lösung D

15 ml Lösung C
150 µl 10 mM CaCl_2

Lösung E

15 ml Lösung C
562 µl 10 mM CaCl_2

2.3 Ruhe- und Stress-EKG

2.3.1 Chemikalien

2,2,2 Tribromomethanol 97%	Aldrich Cat T4,840-2
2-Methyl-2-butanol 99%	Aldrich Cat 15,246-3
Dobutamin 250mg/50ml	Solvay
NaCl	Merck 1.06404

2.3.2 Geräte

2.3.2.1 Großgeräte

Power Lab 4/25	ML 845; AD Instruments
Bio Amplifier	ML 136; AD Instruments
Computer	DELL
Temperatur-Kontroll-Modul	TKM-0902; Föhr Medical Instruments
Heizplatte, 24 V, 37 W	EHE-3501/140; Föhr Medical Instruments

2.3.2.2 Kleingeräte und Zubehör

Nervnadeln, Länge 021, Size 460	Antaeos
Insulinspritzen	Omnifix F 1 ml, Braun
Koaxialkabel	

2.3.2.3 Software

Aufzeichnung	Chart 5 for Windows, AD Instruments
Auswertung	ECG Auto Version 1.5.12.33, EMKA-Technologies

2.4 Skelettmuskelquerschnitte

2.4.1 Chemikalien

Isopentan	Sigma-Aldrich 270342
Tissue Tek	Sakura 4583

NaH ₂ PO ₄ – H ₂ O	Sigma S-9638
Na ₂ HPO ₄ – H ₂ O	Sigma S-9390
Triton-X	Sigma T-8787
BSA-Albumin, bovine	Sigma A-4919
Normal Goat Serum (NGS)	Sigma G-9023
Vectashield	Vector H-1000
Trockenmilch	Töpfer
Nagellack, farblos	Nivea

2.4.2 Geräte

2.4.2.1 Großgeräte

Mikrotom	CM 3000, Jung
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135, Zeiss
Kamera	Axio Cam MRm, Zeiss

2.4.2.2 Kleingeräte und Zubehör

Präparationsbesteck	Aesculap
Mikrotomklingen	C35, Feather
Objektträger	Super Frost, Menzel-Gläser
Deckgläschen	Menzel-Gläser
DAKO Cytomation Pen	S-2002, Daco Cytomation
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorff
Tubes, verschiedene Größen	Eppendorf
Feuchte Kammer	Eigenbau

2.4.2.3 Software

Auswertung	Axio Vision 40LE V.4.4, Zeiss
------------	-------------------------------

2.4.3 Antikörper

MHC	Typ I
SC-71	Typ IIa
BF-35	Typ II d/x

GAMP/GAMF IgG

Molekular Probes Alexa Fluor,
A11001

2.4.4 Lösungen

PBS-Lösung; 0,4 M

NaH ₂ PO ₄ – H ₂ O	10,5 g
Na ₂ HPO ₄ – H ₂ O	86,6 g
H ₂ O destilliert	960 ml

P/BS-Lösung

0,1 M PBS	50 ml
Triton-X	50 µl
BSA-Albumin	0,06 g
Trockenmilch	0,06 g

3 Methoden

Die Isolierung von adulten Kardiomyozyten zur Größenbestimmung, die Aufzeichnung von Ruhe- und Belastungs-Elektrokardiogrammen und die Anfertigung und Färbung von Muskelquerschnitten zur Auswertung der Muskelfasertypen sind Gegenstand dieses Kapitels.

3.1 Isolierung adulter Kardiomyozyten zur Größenbestimmung

3.1.1 Präparation und Isolierung

Zur Isolierung der Kardiomyozyten kam eine modifizierte Langendorff-Apparatur zur Anwendung, die während der Perfusion eine in etwa konstante Temperatur von 37°C und einen konstanten Perfusionsdruck gewährleistet. Der Versuchsaufbau geht auf O. Langendorff zurück, der diesen 1895 erstmalig beschrieb [41].

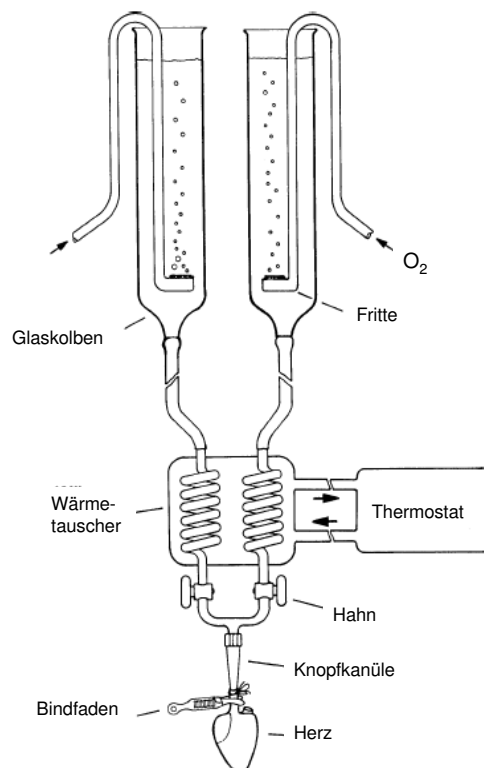


Abbildung 6: Aufbau der Langendorff-Apparatur

Den mit Diethyläther narkotisierten Tieren wurde mit einigen Scherenschnitten der Thorax eröffnet und 10 ml der eisgekühlten kardioplegen Lösung in den rechten Ventrikel des schlagenden Herzens injiziert. Das Herz wurde mit Hilfe einer Schere vom Gefäßstiel abgetrennt, in eine mit eisgekühltem WIM/Insulin gefüllte Petrischale überführt und dort von Thymus und Fettgewebe befreit. Danach erfolgte die Kanülierung der Aorta in der mit eiskaltem WIM/Insulin gefüllten Präparationskammer. Nach Fixierung mit Handseide wurde das kanülierte Herz an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und für ca. fünf bis zehn Minuten mit vorgewärmter und oxygenierter Lösung A perfundiert, bis es trocken zu werden schien. Danach erfolgte der Wechsel auf die ebenfalls vorgewärmte und oxygenierte Perfusionslösung B, bis sich die Tropfgeschwindigkeit ungefähr verdoppelt hatte. In einer frischen Petrischale wurde das Herz nach Entfernung der Vorhöfe mit Hilfe einer Rasierklinge in kleine Stücke zerhackt. Diese wurden in 10 ml der Lösung C für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und während der ersten zehn Minuten mehrmals geschwenkt. In der zweiten Hälfte ließ man das Gewebe absetzen. Nachdem der Überstand abpipettiert war, wurden 15 ml der Lösung D hinzugefügt und wie oben inkubiert. Nach 20 Minuten wurde der Überstand wiederum abpipettiert und 15 ml der Lösung E hinzugefügt. Nach dem oben beschriebenen Inkubationsprozess von 20 Minuten wurde die Suspension nun durch einen 100 µm Zellfilter gefiltert. Das Filtrat wurde dann bei 500 rpm für maximal drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zell-Pellet mit 7 ml SKGMEM wieder in Lösung gebracht. Unter dem Mikroskop erfolgte eine Kontrolle der Zellen [51].

3.1.2 Auswertung

Die Zellen wurden unter dem Mikroskop mit einer Digitalkamera fotografiert. Bei den so gewonnenen Bildern wurden mittels SigmaScan durch Umfahren der Kardiomyozyten mit dem Mauszeiger deren Länge, Breite und Fläche ermittelt.

Die Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung und Varianz erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Studentischen t-Test für ungepaarte Stichproben. Das Signifikanzniveau wird bei p-

Werten kleiner als 0,05 erreicht. Bei $p < 0,01$ wird von hoher Signifikanz ausgegangen.

3.2 Ruhe- und Stress-EKG

3.2.1 Aufzeichnung

Anhand des aktuellen Körpergewichts erfolgte die Narkose mit 100 μl 2,5% Avertin pro 10 g Körpergewicht. Auf einer Heizplatte, die mittels einer Rektalsonde reguliert wird, wurden die Tiere mit Hilfe von Klebestreifen auf dem Rücken liegend fixiert. Der Anschluß an das Aufzeichnungsgerät erfolgte durch subcutan eingeführte Nadeln. Die Ableitung erfolgte nach den Extremitätenableitungen I und II nach Einthoven.

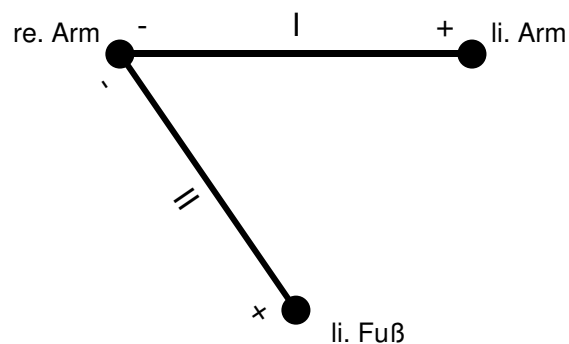


Abbildung 7: Extremitätenableitung I und II nach Einthoven

Zunächst wurde über fünf Minuten ein Ruhe-EKG aufgezeichnet. Nach intraperitonealer Injektion von 1,5 μg Dobutamin pro Gramm Körpergewicht wurden weitere fünf Minuten aufgezeichnet [20].

3.2.2 Auswertung

Aus den so erfassten EKGs wurden je vier Teilstücke a zehn Sekunden ausgewertet. Das erste wurde aus dem Ruhe-EKG ausgewählt, die weiteren drei jeweils ein, zwei beziehungsweise drei Minuten nach der Dobutamininjektion.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ECG Auto, Version 1.5.12.33.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Sie sind als Mittelwerte der einzelnen Tiere, beziehungsweise der jeweiligen Gruppe zu sehen.

Die QT-Zeiten wurden nach der Formel von Bazett frequenzkorrigiert. Die frequenzkorrigierte QT-Zeit berechnet sich aus dem Quotienten der QT-Zeit und der Wurzel des RR-Abstandes in ms. Eine weitere Frequenzkorrektur wurde mit Hilfe der von Mitchell et al. speziell für Mäuse entwickelten Formel $Q-T_c = Q-T_0 / (R-R_0/100)^{1/2}$ vorgenommen. Nach Auftragen des natürlichen Logarithmus der QT-Zeit gegen den natürlichen Logarithmus des RR-Abstandes durch 100 wird eine Regressionsgerade gebildet. Die korrigierte QTc berechnet sich nun aus e^x , wobei x den Schnittpunkt der Gerade mit der Y-Achse darstellt [23].

Nach Berechnung der statistischen Kenngrößen mit Microsoft Excel erfolgte die statistische Analyse mit dem Studentschen t-Test für gepaarte, beziehungsweise ungepaarte Stichproben. Bei $p < 0,05$ wird von einem signifikanten Unterschied ausgegangen.

3.3 Skelettmuskelquerschnitte

3.3.1 Gewinnung der Muskelquerschnitte

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach Darstellung des M. tibialis anterior und des M. gastrocnemius wurden diese vorsichtig im Ganzen entfernt und in vorgekühltes Isopentan gegeben. Bei -80°C wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Die in Isopentan gefrorenen Muskeln wurden mittels Tissue Tek senkrecht auf dem Mikrotompilz befestigt. Anschließend wurden aus der Mitte der Muskeln Gefrierschnitte von je $7\ \mu\text{m}$ angefertigt. Diese wurden nach dem Trocknen bei -20°C bis zur immunhistochemischen Färbung aufbewahrt [1].

3.3.2 Immunhistochemische Färbungen

Nachdem die Schnitte für 30 Minuten an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit einem Dako Cytomation Pen umrandet. Zunächst wurden sie für eine Stunde bei 4°C mit P/BS und 5%igem Normal Goat Serum inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte über Nacht mit dem ersten Antikörper, der mit P/BS auf die gewünschte Konzentration verdünnt war, bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Objektträger wurden zweimal mit PBS gewaschen und für zweimal fünf Minuten mit PBS inkubiert.

4 µl des zweiten Antikörpers wurde in 6000 µl PBS gelöst. Bei Raumtemperatur wurden nun die Schnitte mit diesem Antikörper für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Bevor die Schnitte zum Schluss mit Vectashield eingedeckt, mit einem Deckgläschen versehen und dieses mit Nagellack versiegelt wurde, wurden sie nochmals für zweimal fünf Minuten mit PBS inkubiert [1].

MyHC Isoform	1. Antikörper	Konzentration	2. Antikörper	Konzentration
Typ I	MHC	1 : 20	GAMP/GAMF IgG	1 : 200 / 1 : 1500
Typ IIa	SC-71	unverdünnt	GAMP/GAMF IgG	1 : 200 / 1 : 1500
Typ IIb/x	BF-35	unverdünnt	GAMP/GAMF IgG	1 : 200 / 1 : 1500

Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Anfärbung der verschiedenen Muskelfasertypen und deren Konzentration

3.3.3 Auswertung

Die Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Axio Cam MRm fotografiert.

Die Querschnittsflächen der einzelnen Muskelfasern wurden durch das Programm Axio Vision 40LE ermittelt, indem die immunhistochemisch positiv gefärbten Zellen mit dem Mauszeiger umfahren wurden [1].

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Studentschen t-Tests. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$ und ist mit [*] in den Tabellen und Abbildungen gekennzeichnet.

Die Anteile der einzelnen Muskelfasern am Gesamtmuskel wurden durch Auszählen von ca. 650 Fasern in zwölf randomisierten Feldern pro Muskel und Maus ermittelt. Da eine Färbung mit dem für Typ IIb spezifischen Antikörper BFF-3 aus technischen Gründen nicht möglich war, ergibt sich der prozentuale Anteil der Typ IIb Fasern aus der Differenz von 1 und der Summe der anderen Muskelfasern.

Die Ergebnisse sind in Prozent angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Kardiomyozyten

Um die Größen der Kardiomyozyten zu ermitteln, wurden Kardiomyozyten aus je fünf Tieren pro Gruppe wie oben beschrieben isoliert. Es wurden 794 Wildtyp-, 675 M-CK^{-/-}-, 351 Mito-CK^{-/-}- und 744 Double-CK^{-/-}-Kardiomyozyten vermessen (s. Tabelle 3).

Die durchschnittliche Fläche der Wildtyp-Kardiomyozyten beträgt 2482 μm^2 . Somit ist die Fläche der Wildtyp-Kardiomyozyten signifikant kleiner als die der Mito-CK^{-/-}-Kardiomyozyten (4646 μm^2). M-CK^{-/-}-Kardiomyozyten und Double-CK^{-/-}-Kardiomyozyten unterscheiden sich, mit einer Fläche von 2322 μm^2 beziehungsweise 2375 μm^2 , nicht signifikant von den Wildtypmäusen (s. Abbildung 8).

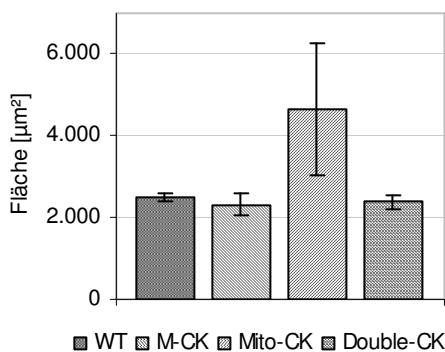


Abbildung 8: Fläche der isolierten Kardiomyozyten; Werte in μm^2 \pm Standardabweichung

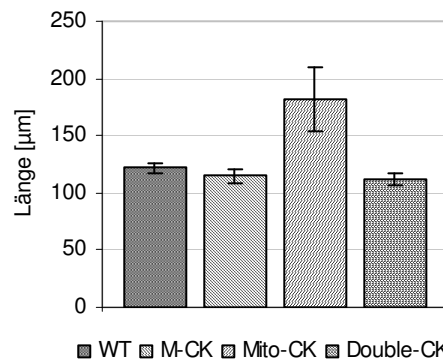


Abbildung 9: Länge der isolierten Kardiomyozyten [μm] \pm Standardabweichung

Die Kardiomyozyten aller vier untersuchten Gruppen sind in etwa gleich breit.

Die Kardiomyozyten der Wildtypmäuse sind im Durchschnitt 121,6 μm lang und somit signifikant länger als die der Double-CK^{-/-}-Mäuse. Auch die M-CK^{-/-}-Kardiomyozyten sind mit 114,6 μm zwar deutlich kürzer als die Wildtypkardiomyozyten, aber im zweiseitigen Studentschen-t-Test wird das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,075$). Die längsten Kardiomyozyten in den untersuchten

Gruppen haben, wie auf Grund der Daten für die Fläche schon zu vermuten war, mit einer durchschnittlichen Länge von 181,2 μm , die Mito-CK^{-/-}-Mäuse. Die Länge der Mito-CK^{-/-}-Kardiomyozyten unterscheidet sich hoch signifikant von der der Wildtypmäuse (s. Abbildung 9).

Abbildung 10A: WT

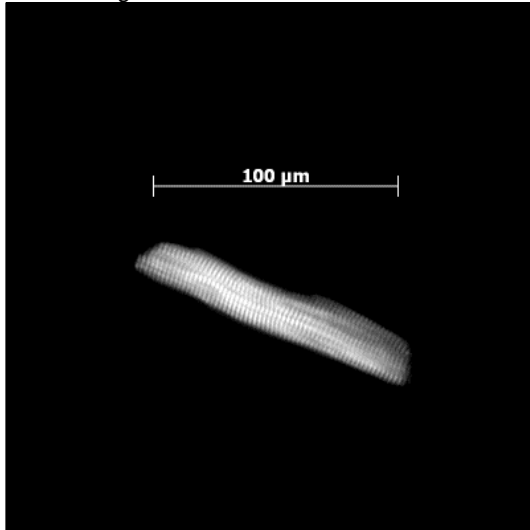


Abbildung 10B: M-CK

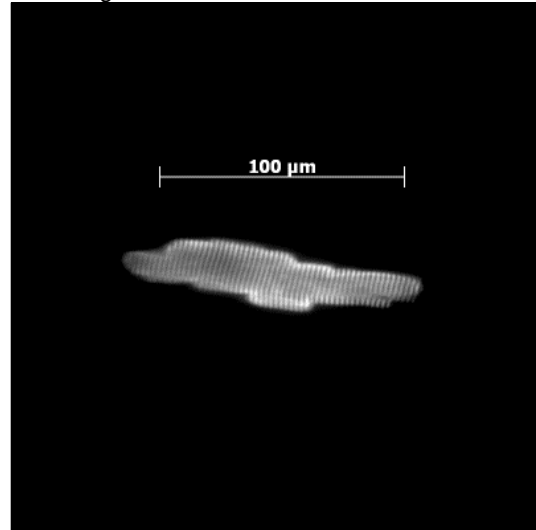


Abbildung 10C: Mito-CK

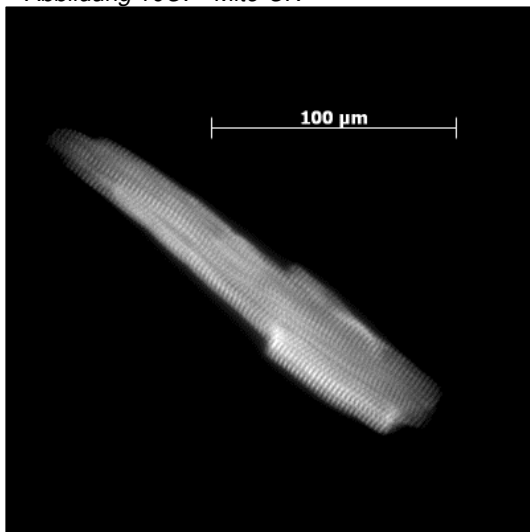


Abbildung 10D: Double-CK

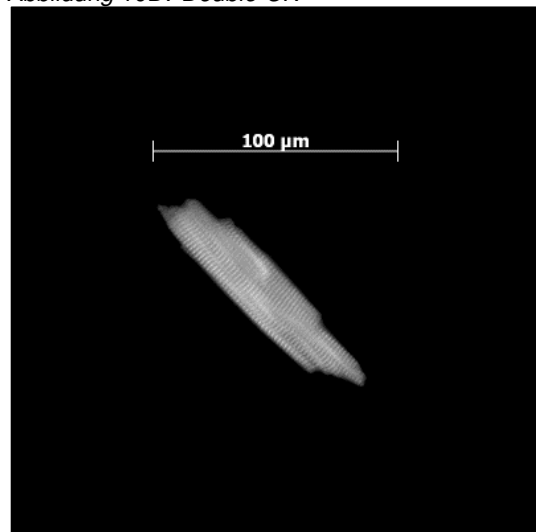


Abbildung 10: Isolierte Kardiomyozyten

	Fläche [μm^2]	Länge [μm]	Breite [μm]
Wildtyp	2482 \pm 96	121,6 \pm 5,0	21,3 \pm 1,1
M-CK^{-/-}	2322 \pm 248	114,6 \pm 5,8	20,6 \pm 1,3
Mito-CK^{-/-}	*4646 \pm 1601	**181,2 \pm 28,1	25,9 \pm 5,2
Double-CK^{-/-}	2375 \pm 184	*111,2 \pm 5,1	21,6 \pm 1,5

Tabelle 3: Größenbestimmung der isolierten Kardiomyozyten
* $p < 0,05$ vs WT; ** $p < 0,01$ vs WT

4.2 Ruhe- und Stress-EKG

Für die Aufzeichnung der Ruhe- und Stress-EKGs wurden Wildtypmäuse (n=10), Mito-CK^{-/-}-Mäuse (n=8), M-CK^{-/-}-Mäuse (n=9) und Double-CK^{-/-}-Mäuse (n=10), wie oben beschrieben, mit Avertin narkotisiert und anschließend kontinuierlich über zehn Minuten ein EKG aufgezeichnet. Nach fünf Minuten wurde den Tieren intraperitoneal Dobutamin injiziert. Für das Stress-EKG wurde eine Sequenz drei Minuten nach der Dobutamingabe ausgewertet.

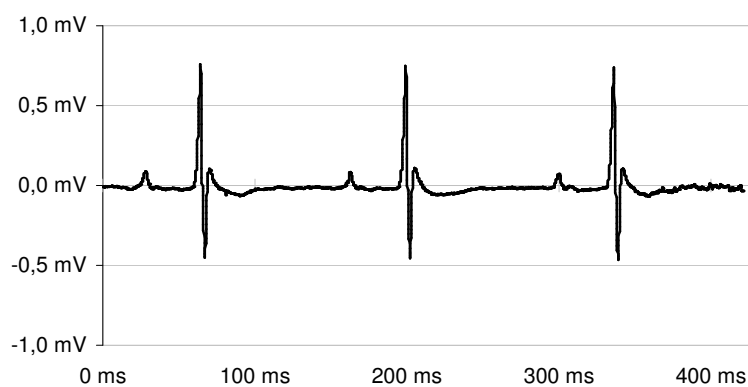


Abbildung 11: Ruhe-EKG Wildtyp

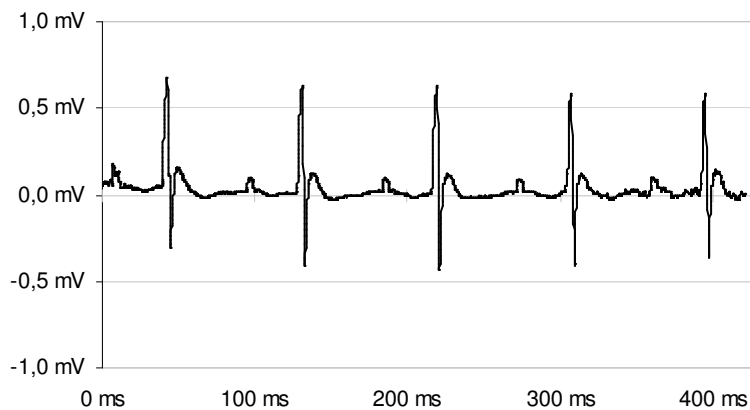


Abbildung 12: Streß-EKG Wildtyp, 3 min. nach Dobutamingabe

4.2.1 Ruhe-EKG

Die Ruheherzfrequenz der untersuchten Wildtypmäuse liegt bei 455 bpm. M-CK^{-/-}-Mäuse und Double-CK^{-/-}-Mäuse unterscheiden sich mit 468 bpm beziehungsweise 436 bpm nicht nennenswert von den Wildtypen. Dagegen haben Mito-CK^{-/-}-Mäuse (404 bpm) eine signifikant niedrigere Ruheherzfrequenz (s. Tabelle 4).

In Analogie dazu ist auch die RR-Dauer der Mito-CK^{-/-}-Mäuse signifikant länger als bei Wildtypmäusen und es besteht kein Unterschied zwischen Wildtypen und M-CK^{-/-}-Mäusen beziehungsweise Double-CK^{-/-}-Mäusen (s. Tabelle 4).

Die P-Welle ist bei Wildtypen und Mito-CK^{-/-}-Mäusen annähernd gleich lang. Bei Double-CK^{-/-}-Mäusen und M-CK^{-/-}-Mäusen hingegen kürzer. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich mit einem p-Wert von 0,023 allerdings nur für M-CK^{-/-}-Mäuse (s. Tabelle 4).

Bei M-CK^{-/-}-Mäusen ist die QT-Zeit mit 28,94 ms signifikant kürzer als die der Kontrollgruppe (34,49 ms). Auch die, nach der Formel von Bazett frequenzkorrigierte QT-Zeit der M-CK^{-/-}-Mäuse erreicht das Signifikanzniveau. Die frequenzkorrigierte QT-Zeit berechnet sich aus dem Quotienten der QT-Zeit und der Wurzel des RR-Abstandes in ms. Mito-CK^{-/-}-Mäuse und Double-CK^{-/-}-

Mäuse unterscheiden sich dagegen weder in der unkorrigierten, noch in der nach Bazett korrigierten QT-Zeit von Wildtypmäusen (s. Tabelle 4).

Bei der QT-Zeit Korrektur nach Mitchell, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde, ergab sich für Wildtypen eine QTc-Dauer von 29,13 ms. M-CK^{-/-}-Mäuse haben mit 24,19 ms eine kürzere QTc-Dauer, wohingegen Mito-CK^{-/-}-Mäuse mit 39,04 ms und Double-CK^{-/-}-Mäuse mit 32,90 ms ein längeres QTc-Intervall aufweisen (s. Abbildung 13).

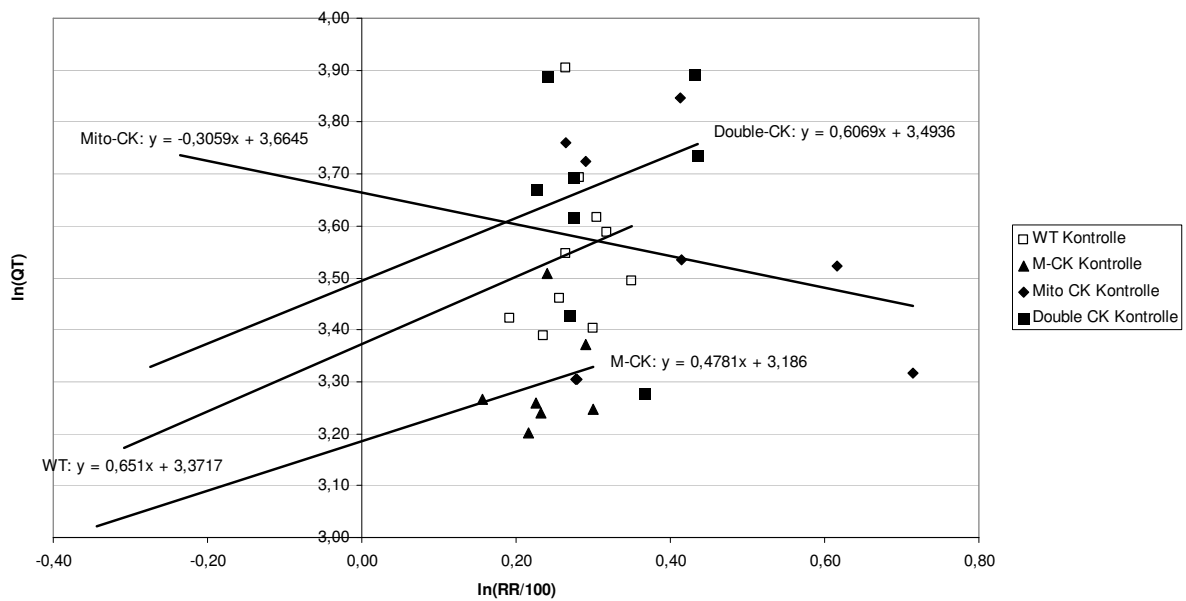


Abbildung 13: QT-Zeit-Korrektur nach Mitchell [23]

Die QRS-Dauer bei Wildtypmäusen beträgt 8,81 ms. Bei Mito-CK^{-/-}, M-CK^{-/-} und Double-CK^{-/-}-Mäusen ist die QRS-Dauer signifikant länger als bei Wildtypen (s. Tabelle 4). Nur bei Double-CK^{-/-}-Mäusen unterscheidet sich die Größe der R-Amplitude von der der Wildtyp-Kontrollgruppe (s. Tabelle 4).

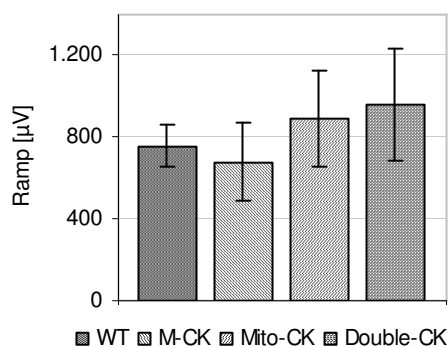
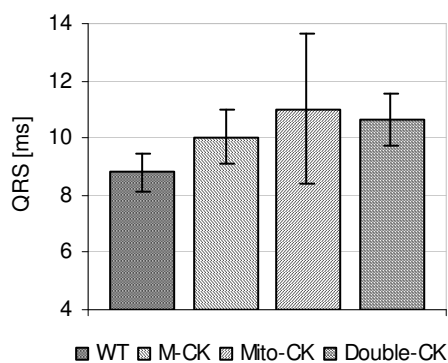


Abbildung 14: QRS-Dauer im Ruhe-EKG [ms] ± Standardabweichung

Abbildung 15: R-Amplitude im Ruhe-EKG [µV] ± Standardabweichung

Das Produkt aus QRS-Dauer und R-Amplitude ist bei Mito-CK^{-/-}-Mäusen (9,67 mV*ms) und bei Double-CK^{-/-}-Mäusen (10,20 mV*ms) signifikant größer als das der Wildtypen (6,65 mV*ms). Da ein vergrößertes QRS-Produkt als Hypertrophiemarker gilt, kann eine Hypertropie der Mito-CK^{-/-}- und Double-CK^{-/-}-Herzen angenommen werden.

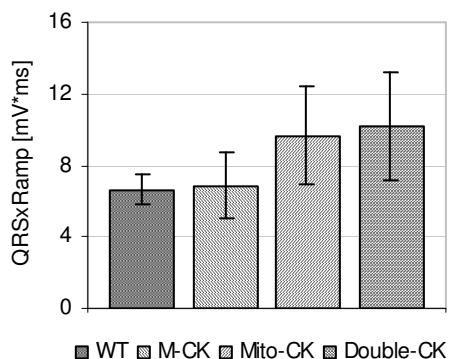


Abbildung 16: QRS-Produkt (QRS-Dauer x R-Amplitude) des Ruhe-EKG [mV ms]

	Wildtyp	M-CK ^{-/-}	Mito-CK ^{-/-}	Double-CK ^{-/-}
Herzfrequenz [bpm]	455 ± 20	468 ± 29	*404 ± 65	436 ± 33
P-Welle [ms]	13,28 ± 1,54	*11,46 ± 1,83	13,16 ± 2,51	11,94 ± 1,76
QT-Zeit [ms]	34,49 ± 4,22	*28,94 ± 5,28	35,19 ± 7,77	38,77 ± 9,44
QTcMitchell [ms]	29,13	24,19	39,04	32,90
QTcBZ [ms]	95,92 ± 13,44	*79,23 ± 11,16	91,37 ± 23,08	105,03 ± 23,51
RR-Dauer [ms]	132,01 ± 5,85	128,63 ± 8,05	*152,52 ± 27,83	138,64 ± 10,88
R-Amplitude [µV]	757,97 ± 101,64	678,06 ± 192,96	893,53 ± 232,54	*960,44 ± 277,12
QRS-Dauer [ms]	8,81 ± 0,66	**10,04 ± 0,92	*11,02 ± 2,60	**10,64 ± 0,94
QRS-Produkt [mV*ms]	6,65 ± 0,80	6,85 ± 1,86	**9,67 ± 2,79	**10,20 ± 3,01

Tabelle 4: EKG-Parameter im Ruhe-EKG
* $p < 0,05$ vs. WT; ** $p < 0,01$ vs. WT

4.2.2 Dobutamin-Stress-EKG

Durch die intraperitoneale Gabe von Dobutamin steigt die Herzfrequenz in allen untersuchten Gruppen und unterscheidet sich hoch signifikant von den Herzfrequenzwerten der Ruhe-EKG-Aufzeichnung. Auch drei Minuten nach der Dobutamingabe schlugen die Herzen der Mito-CK^{-/-}-Mäuse (574 bpm) signifikant langsamer als die der Wildtypmäuse (655 bpm). Ein weiterer Unterschied zeigt sich darin, dass es bei Wildtypmäusen zu einer Herzfrequenzsteigerung um 44% kommt, bei M-CK^{-/-}-Mäusen dagegen nur zu einer Steigerung um 31% ($p=0,0119$) (s. Abbildung 17).

In Analogie zu den Herzfrequenzdaten verkürzt sich auch die RR-Dauer aller Gruppen signifikant (s. Tabelle 5). Anders als noch im Ruhe-EKG ist die RR-Dauer im Stress-EKG bei allen CK-Mäusen deutlich länger als bei der Ver-

gleichsgruppe (s. Tabelle 5). Der RR-Abstand verkürzt sich bei Wildtypmäusen mit 30% am stärksten von allen untersuchten Gruppen. Ein signifikanter ($p=0,0329$) Unterschied besteht aber nur zu M-CK^{-/-}-Mäusen, deren RR-Dauer sich nur um 24% verringert.

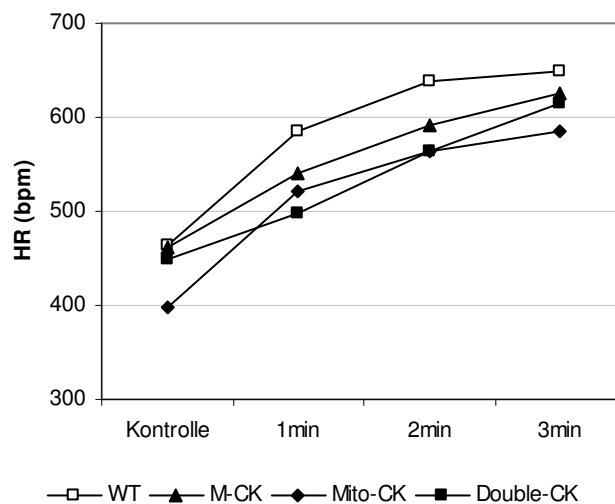


Abbildung 17: Herzfrequenzvariation im Dobutamin-Stress-EKG [bpm]

War die P-Welle vor der Dobutamingabe bei M-CK^{-/-}-Mäusen noch signifikant kürzer, so sind drei Minuten nach der Dobutamingabe die P-Wellen von Wildtypmäusen, M-CK^{-/-}-Mäusen und Mito-CK^{-/-}-Mäusen ungefähr gleich lang. Die P-Wellen der Double-CK^{-/-}-Mäuse sind signifikant kürzer als die der Wildtypen (s. Tabelle 5).

Die QT-Zeiten aller untersuchten Gruppen unterscheiden sich nach der Dobutamingabe nicht. Nur die QT-Zeit der Double-CK^{-/-}-Mäuse verkürzt sich signifikant von 40,95 ms auf 29,67 ms.

Die QRS-Dauer ist, wie auch schon vor der Dobutamingabe, bei allen CK-Mäusen hoch signifikant länger als bei Wildtypmäusen (s. Tabelle 5). Zu erwähnen ist, dass sich die QRS-Dauer der Wildtypmäuse, der Mito-CK^{-/-}-Mäuse und der Double-CK^{-/-}-Mäuse zwar verringert, aber es nur bei Wildtypen zu einer

signifikanten Veränderung kommt. Die QRS-Dauer der M-CK^{-/-}-Mäuse bleibt konstant (s. Tabelle 5).

Die Amplitude der R-Zacke wird in allen vier Gruppen signifikant kleiner. Doch auch nach der Gabe von Dobutamin ist die R-Amplitude der Double-CK^{-/-}-Mäuse weiterhin signifikant größer als die von Wildtypmäusen (s. Tabelle 5).

3min	Wildtyp	M-CK ^{-/-}	Mito-CK ^{-/-}	Double-CK ^{-/-}
Herzfrequenz [bpm]	°650 ± 45	°625 ± 22	°*585 ± 78	°615 ± 44
P-Welle [ms]	13,32 ± 2,59	13,49 ± 2,92	13,78 ± 2,35	*10,50 ± 2,96
QT-Zeit [ms]	30,70 ± 7,09	30,62 ± 6,62	32,25 ± 3,70	°29,676 ± 6,76
QTcBZ [ms]	104,94 ± 25,28	97,14 ± 21,24	100,02 ± 14,72	96,13 ± 20,92
RR-Dauer [ms]	°91,65 ± 5,41	°*96,49 ± 3,46	°*98,94 ± 10,11	°*98,93 ± 6,98
R-Amplitude [µV]	°586,42 ± 173,65	°611,33 ± 239,75	°652,11 ± 110,71	°*809,87 ± 191,08
QRS-Dauer [ms]	°8,13 ± 0,74	*10,05 ± 0,95	*10,64 ± 0,95	*10,15 ± 0,55

Tabelle 5: EKG-Parameter nach intraperitonealer Gabe von 1,5 µg/gKG Dobutamin
*p<0,05 vs. WT; °p<0,05 vs. Kontrolle

4.3 Skelettmuskelquerschnitte

Die Muskelquerschnitte wurden von je zwei Mäusen pro Gruppe, wie im Methodenteil beschrieben, angefertigt. Nach der Färbung mit für die einzelnen Myosinschwerketten spezifischen Antikörpern wurden die Schnitte unter dem Mikroskop fotografiert. Da Double-CK^{-/-}-Mäuse im freiwilligen Laufradtraining nicht laufen, entfällt die jeweilige Läufergruppe.

4.3.1 Größe der Muskelfasern

Zur Ermittlung der Fasergröße wurden einzelne Muskelfasern mit einer Computermaus umfahren. Mittels der AxioVision Software wurde daraus die Fasergröße der einzelnen Muskelfasern im Querschnitt berechnet. Aus genannten Gründen war die Ermittlung der Fasergröße für Typ IIb-Muskelfasern nicht möglich.

4.3.1.1 Musculus Gastrocnemius

Im M. gastrocnemius von Wildtypmäusen ergab sich eine durchschnittliche Größe von $1240 \mu\text{m}^2$ für Typ I-, $1300 \mu\text{m}^2$ für Typ IIa- und von $1300 \mu\text{m}^2$ für Typ IIb/x-Muskelfasern (s. Abbildung 18). Nach dreiwöchigem freiwilligen Lauf- radtraining kommt es zu einer signifikanten Hypertrophie der Typ I-Muskelfasern auf $1460 \mu\text{m}^2$ und gleichzeitig zu einer signifikanten Hypotrophie der Muskelfasern vom Typ IIa und Typ IIb/x (s. Abbildung 19, Tabelle 6).

Die Typ I-Muskelfasern der M-CK^{-/-}-Mäuse sind zwar größer als die der Wildtypen, erreichen aber mit einem p-Wert von 0,061 das Signifikanzniveau nicht. Das dreiwöchige Training verändert die Muskelfasergröße nicht, und auch nach dem Training zeigt sich verglichen mit Typ I-Fasern der Wildtypmäuse kein signifikanter Effekt (s. Tabelle 6). Sowohl Typ IIa- als auch Typ IIb/x-Muskelfasern der M-CK^{-/-}-Mäuse sind signifikant kleiner als die Muskelfasern der untrainierten Kontrollgruppe. Während sich der Faserquerschnitt der Typ IIb/x-Fasern durch das Lauf- radtraining nicht ändert, verkleinert sich der Querschnitt der Typ IIa-Fasern noch weiter auf durchschnittlich $980 \mu\text{m}^2$. Somit sind die Typ IIa-Fasern nicht nur im Vergleich zu den untrainierten M-CK^{-/-}-Mäusen, sondern auch im Vergleich zu trainierten Wildtypmäusen hoch signifikant kleiner (s. Abbildung 18, Abbildung 19, Tabelle 6).

Mito-CK^{-/-}-Mäuse haben im Vergleich zu Wildtypmäusen eine basale Hypertrophie der Typ I- und Typ IIb/x-Muskelfasern, die bei trainierten Mito-CK^{-/-}-Mäusen rückläufig ist. Die Typ IIa-Muskelfasern der Mito-CK^{-/-}-Mäuse sind signifikant kleiner als die der Wildtypen (s. Abbildung 18). Die Größe der Typ IIa-

Muskelfasern bleibt auch bei trainierten Tieren konstant. Vergleicht man trainierte Wildtypmäuse mit trainierten Mito-CK^{-/-}-Mäusen, unterscheidet sich nur die Größe der Typ I-Muskelfasern signifikant (s. Tabelle 6, Abbildung 19).

Double-CK^{-/-}-Mäuse haben mit 1190 μm^2 eine den Wildtypmäusen vergleichbare Typ I-Fasergröße. Dagegen sind die Typ IIa- und Typ II d/x-Muskelfasern der Double-CK^{-/-}-Mäuse stark hypertrophiert. Sie unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe (s. Abbildung 18, Tabelle 6).

Abbildung 18A: Typ I

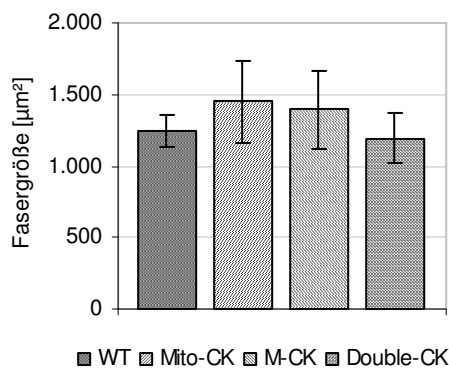


Abbildung 18B: Typ IIa

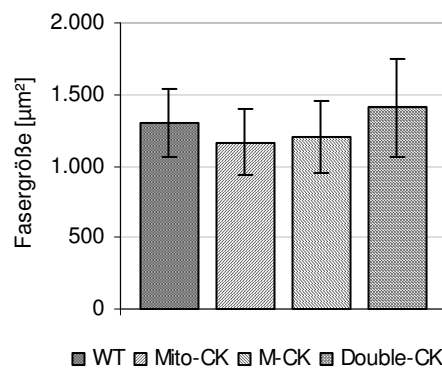


Abbildung 18C: Typ II d/x

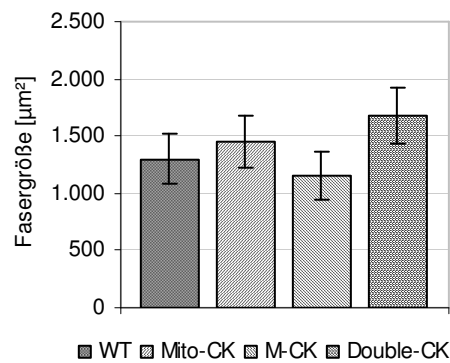


Abbildung 18: Querschnittsfläche der Muskelfasern im *M. gastrocnemius* [μm^2] vor Laufradtraining

Fasergröße [μm^2]	Typ I	Typ IIa	Typ IIb/x
Wildtyp	1243 ± 116	1303 ± 241	1299 ± 216
Wildtyp Läufer	^o 1458 ± 298	^o 1165 ± 174	^o 1150 ± 219
M-CK^{-/-}	1392 ± 271	*1200 ± 252	*1156 ± 206
M-CK^{-/-} Läufer	1351 ± 281	* ^o 983 ± 143	1179 ± 280
Mito-CK^{-/-}	*1448 ± 284	*1163 ± 229	*1447 ± 232
Mito-CK^{-/-} Läufer	* ^o 1225 ± 196	1151 ± 246	^o 1132 ± 166
Double-CK^{-/-}	1191 ± 281	*1406 ± 340	*1678 ± 245

*Tabelle 6: Querschnittsfläche der Muskelfasern im M. gastrocnemius vor bzw. nach dreiwöchigem Laufradtraining [μm^2]
* $p < 0,05$ vs. WT, ^o $p < 0,05$ vs. Schläfer*

Abbildung 19A: Typ I

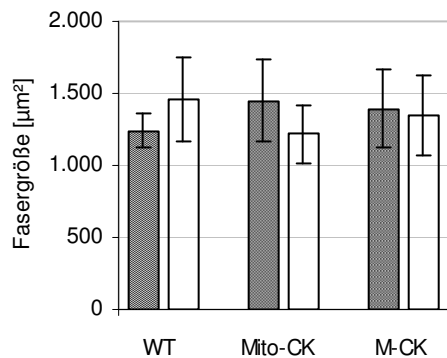


Abbildung 19B: Typ IIa

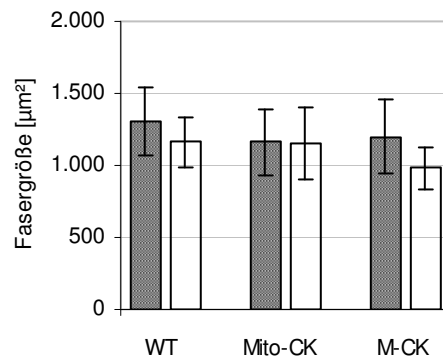


Abbildung 19C: Typ II d/x

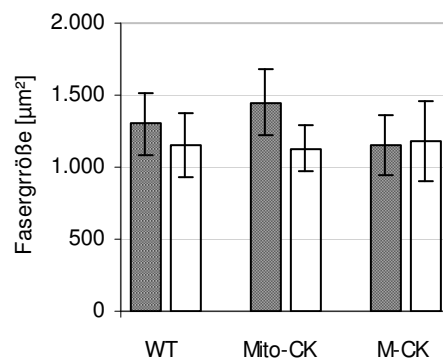


Abbildung 19: Veränderung der Muskelfaserquerschnittsfläche im *M. gastrocnemius* nach dreiwöchigem Laufradtraining im Vergleich Schläfer vs. Läufer [μm^2]

4.3.1.2 Musculus Tibialis anterior

Bei untrainierten Wildtypmäusen sind die Typ I-Muskelfasern des *M. tibialis anterior* $730 \mu\text{m}^2$ groß und damit kleiner als Typ IIa- und Typ II d/x-Muskelfasern des gleichen Muskels. Durch dreiwöchiges Training kommt es zu einer starken Hypertrophie der Typ I-Fasern um fast das Doppelte. Die Muskelfasern der Typen IIa und II d/x werden dagegen signifikant kleiner (s. Tabelle 7, Abbildung 20, Abbildung 21).

Eine isolierte Hypertrophie der Typ I-Muskelfasern zeigt sich im *Musculus tibialis anterior* der *M-CK^{-/-}*-Mäuse. Die Größe der anderen Muskelfasertypen unterscheidet sich nicht von der bei Wildtypmäusen (s. Abbildung 20). Durch den Trainingsreiz ist die Hypertrophie der Typ I-Fasern rückläufig, im Gegenzug

kommt es aber zu einer ausgeprägten Vergrößerung der Faserquerschnittsfläche der Typ IIa- und IIb/x-Fasern. Alle drei Fasertypen unterscheiden sich bei trainierten M-CK^{-/-}-Mäusen signifikant von trainierten Wildtypmäusen. Die Typ I-Fasern sind kleiner, wohingegen die Typ IIa- und Typ IIb/x-Fasern deutlich größer sind (s. Tabelle 7, Abbildung 21).

Mito-CK^{-/-}-Mäuse zeigen schon vor dem Laufradtraining eine Hypertrophie aller drei untersuchten Fasertypen. Es unterscheiden sich aber nur die Fasern der Typen I und IIa signifikant von denen der untersuchten Wildtypmäuse (s. Tabelle 7, Abbildung 20). Die Hypertrophie der Typ I- und Typ IIa-Muskelfasern vermindert sich durch das Training im Laufrad signifikant. Auf die Größe der Muskelfasern des Typs IIb/x hat das Training keinen nennenswerten Effekt. Im Vergleich mit trainierten Wildtypmäusen sind die Muskelfasern der Typen IIa und IIb/x signifikant größer. Typ I-Muskelfasern der trainierten Mito-CK^{-/-}-Mäuse sind in etwa so groß wie die der untrainierten Wildtypen und somit viel kleiner als die der trainierten Wildtypen (s. Tabelle 7, Abbildung 21).

Wie schon bei den Mito-CK^{-/-}-Mäusen zeigt sich auch für die Muskelfasern der Double-CK^{-/-}-Mäuse eine Hypertrophie aller drei untersuchten Fasertypen. Der p-Wert im Studentschen t-Test erreicht jedoch nur für die Typen I und IIa das Signifikanzniveau (s. Tabelle 7, Abbildung 20).

Abbildung 20A: Typ I

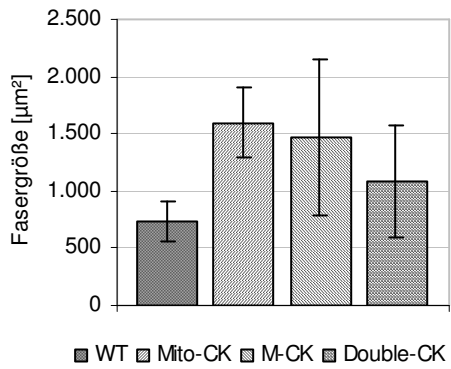


Abbildung 20B: Typ IIa

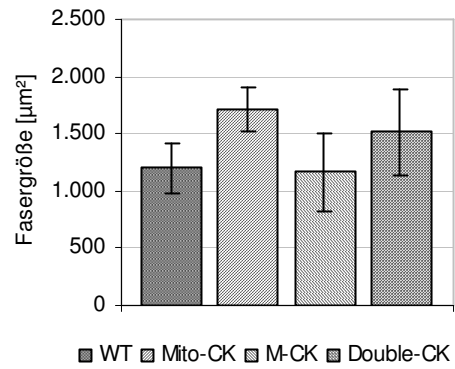


Abbildung 20C: Typ IIb/x

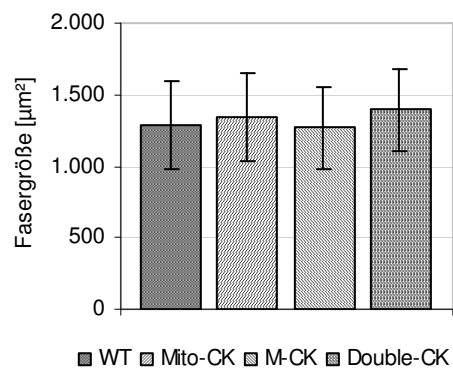


Abbildung 20: Querschnittsfläche der Muskelfasern im *M. tibialis anterior* [μm^2] vor Lauftradtraining

Fasergröße [μm^2]	Typ I	Typ IIa	Typ IIb/x
Wildtyp	731 ± 170	1199 ± 225	1286 ± 306
Wildtyp Läufer	^o 1319 ± 383	^o 1119 ± 229	^o 1140 ± 240
M-CK^{-/-}	*1466 ± 679	1164 ± 343	1266 ± 284
M-CK^{-/-} Läufer	^o *1006 ± 182	^o *1969 ± 353	^o *2053 ± 408
Mito-CK^{-/-}	*1596 ± 307	*1717 ± 193	1348 ± 309
Mito-CK^{-/-} Läufer	^o *740 ± 155	^o *1271 ± 286	*1389 ± 325
Double-CK^{-/-}	*1084 ± 494	*1514 ± 376	1396 ± 289

*Tabelle 7: Querschnittsfläche der Muskelfasern im M. tibialis anterior vor bzw. nach dreiwöchigem Lauftraining [μm^2]
* $p < 0,05$ vs. WT, ^o $p < 0,05$ vs. Schläfer*

Abbildung 21A: Typ I

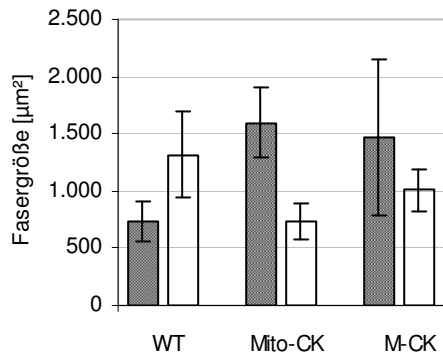


Abbildung 21B: Typ IIa

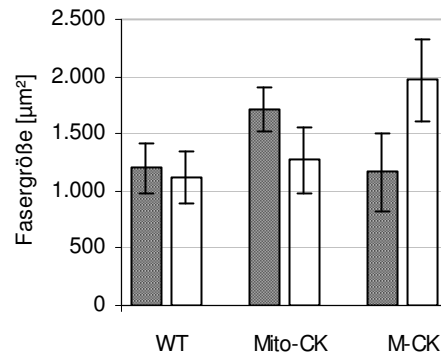


Abbildung 21C: Typ IIb/x

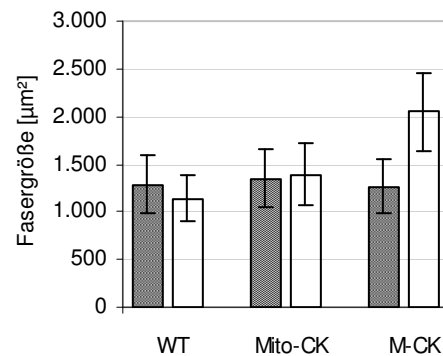


Abbildung 21: Veränderung der Muskelfaserquerschnittsfläche im *M. tibialis anterior* nach dreiwöchigem Laufradtraining im Vergleich Schläfer vs. Läufer [μm^2]

4.3.2 Verteilung der Muskelfasertypen

Auf den mit für die einzelnen Myosinschwerketten spezifischen Antikörpern gefärbten und dann fotografierten Bildern wurden je sechs randomisierte Felder festgelegt. In diesen wurde die prozentuale Verteilung der Muskelfasertypen ermittelt. Die Prozentangabe für IIb-Fasern errechnet sich aus den Faseranteilen der anderen Muskelfasertypen.

Abbildung 22A: WT Typ I Schläfer

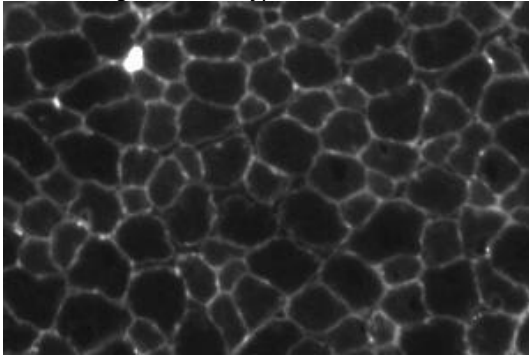


Abbildung 22B: WT Typ I Läufer

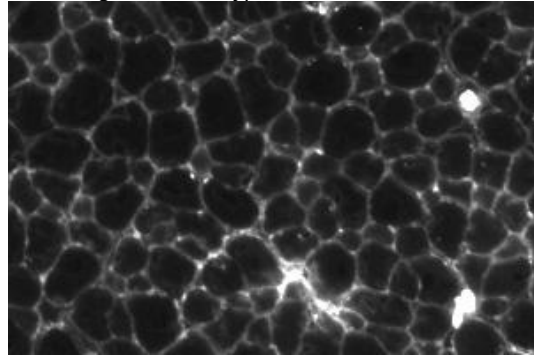


Abbildung 22C: WT Typ IIa Schläfer

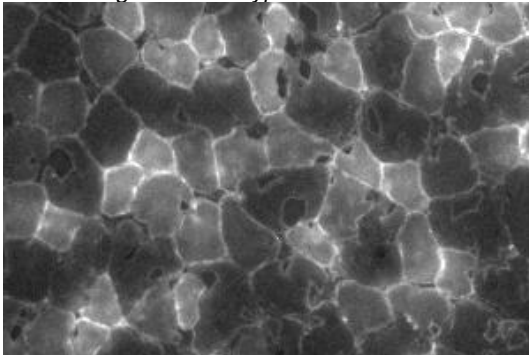


Abbildung 22D: WT Typ IIa Läufer

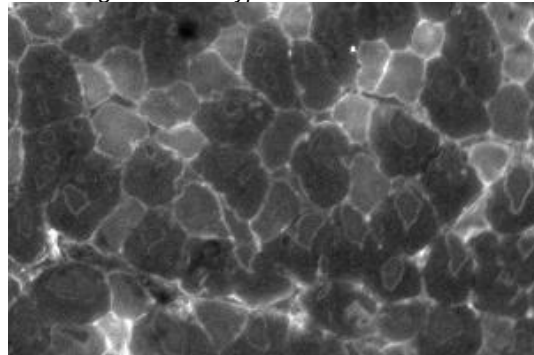


Abbildung 22E: WT Typ IIc/x Schläfer

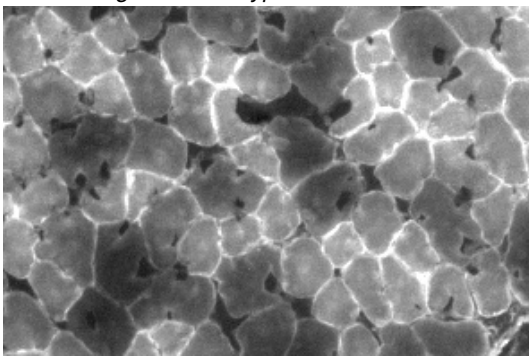


Abbildung 22F: WT Typ IIc/x Läufer

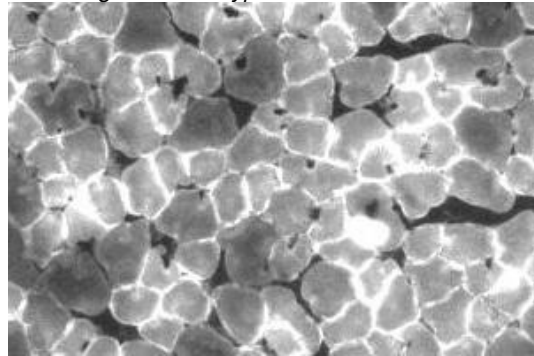


Abbildung 22: Muskelquerschnitte aus dem *M. gastrocnemius* von Wildtypmäusen - vor (Schläfer) bzw. nach (Läufer) dreiwöchigem Laufradtraining

Abbildung 23A: M-CK Typ I Schläfer

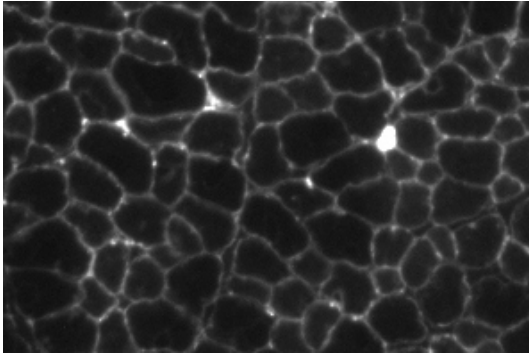


Abbildung 23B: M-CK Typ I Läufer

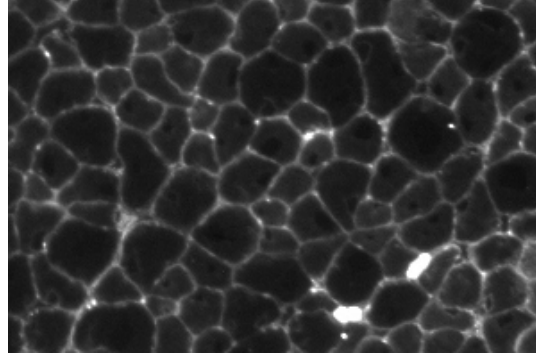


Abbildung 23C: M-CK Typ IIa Schläfer

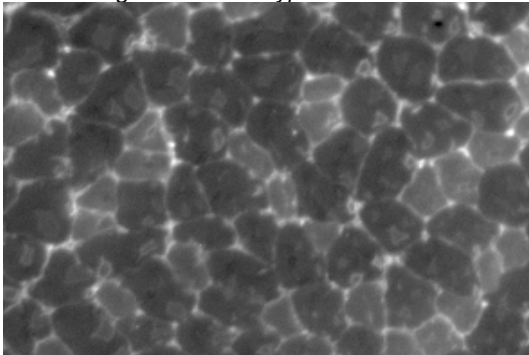


Abbildung 23D: M-CK Typ IIa Läufer

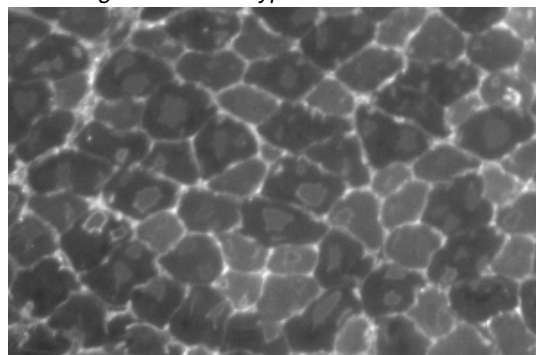


Abbildung 23E: M-CK Typ IIa/x Schläfer

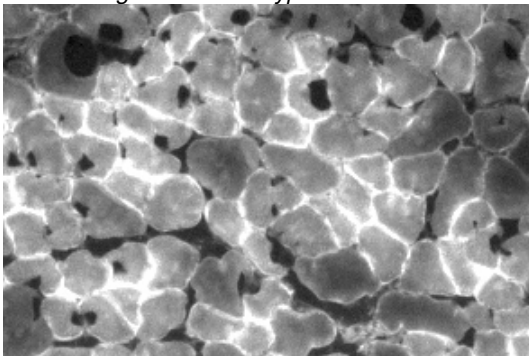


Abbildung 23F: M-CK Typ IIa/x Läufer

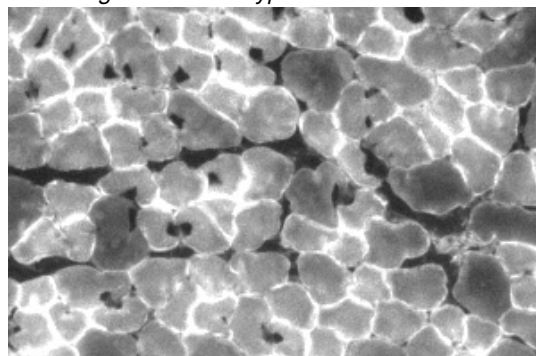


Abbildung 23: Muskelquerschnitte aus dem *M. gastrocnemius* von M-CK^{-/-}-Mäusen - vor (Schläfer) bzw. nach (Läufer) dreiwöchigem Lauftraining

Abbildung 24A: Mito-CK Typ I Schläfer

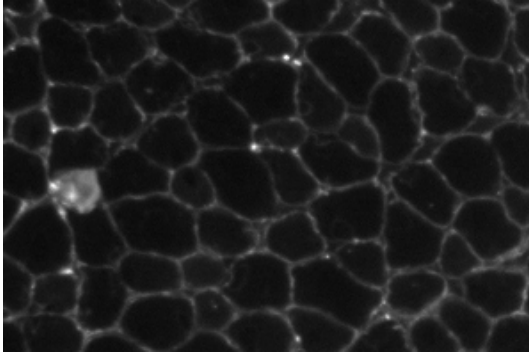


Abbildung 24B: Mito-CK Typ I Läufer

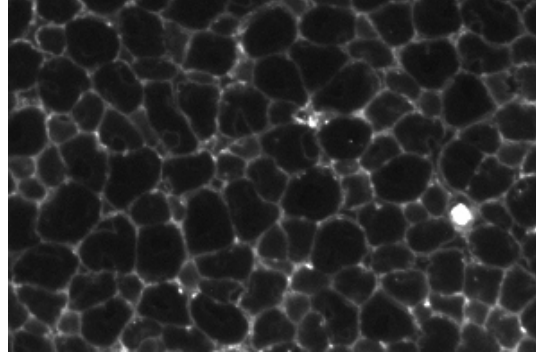


Abbildung 24C: Mito-CK Typ IIa Schläfer

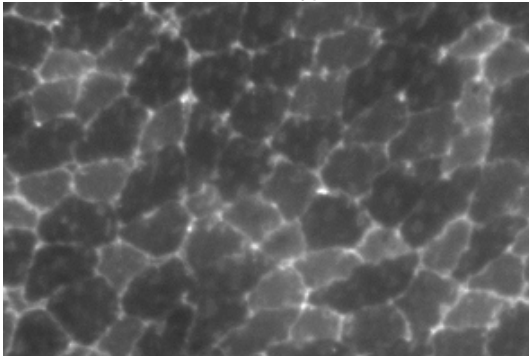


Abbildung 24D: Mito-CK Typ IIa Läufer

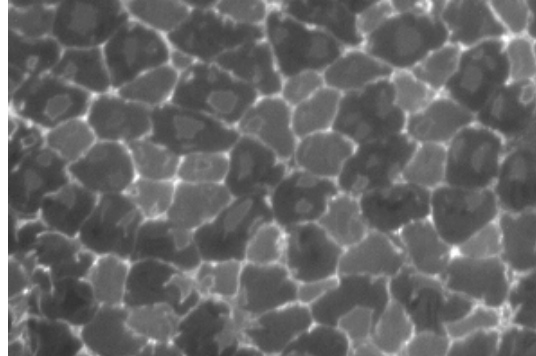


Abbildung 24E: Mito-CK Typ II d/x Schläfer

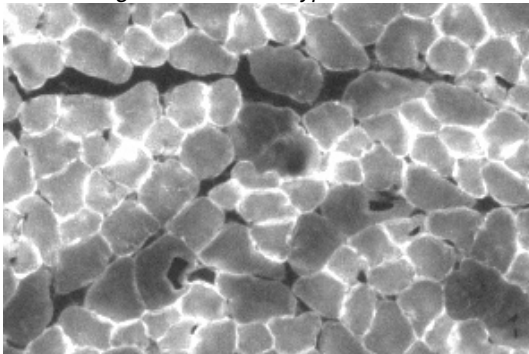


Abbildung 24F: Mito-CK Typ II d/x Läufer

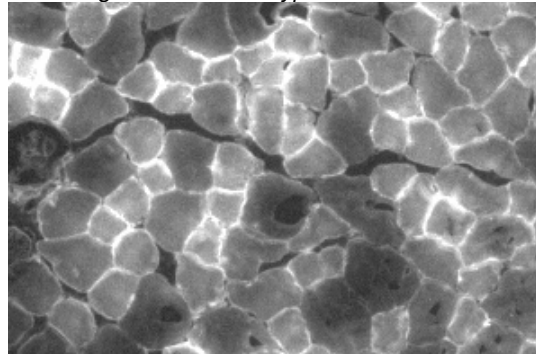


Abbildung 24: Muskelquerschnitte aus dem *M. gastrocnemius* von Mito-CK^{-/-}-Mäusen - vor (Schläfer) bzw. nach (Läufer) dreiwöchigem Laufradtraining

Abbildung 25A: Double-CK Typ I Schläfer

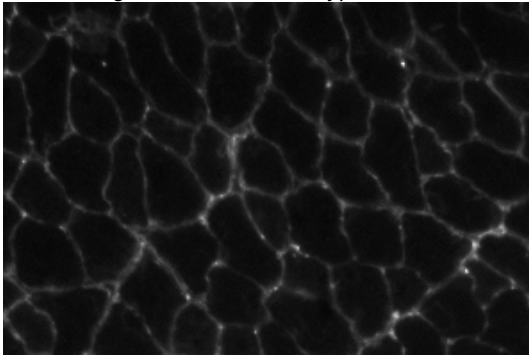


Abbildung 25B: Double-CK Typ IIa Schläfer

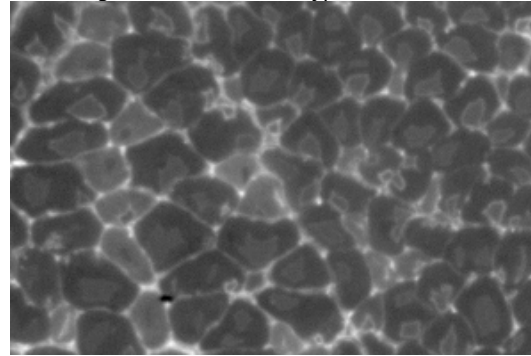


Abbildung 25C: Double-CK Typ II d/x Schläfer

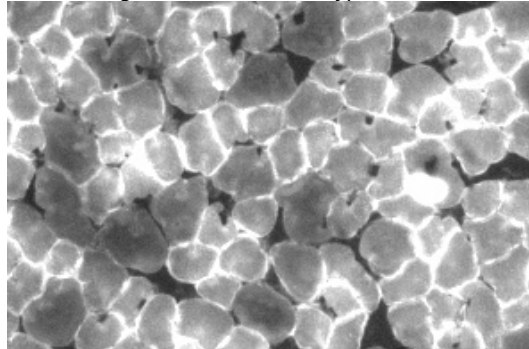


Abbildung 25: Muskelquerschnitte aus dem M. gastrocnemius von Double-CK^{-/-}-Mäusen (Schläfer)

4.3.2.1 Musculus Gastrocnemius

Untrainierte Wildtypmäuse haben im M. gastrocnemius <1% Typ I-, 22% Typ IIa-, 27% Typ II d/x- und 50% Typ IIb-Fasern. Nach einem dreiwöchigen freiwilligen Laufradtraining steigt der Fasergehalt der Typen I und IIb, und es sinkt der Fasergehalt der Typen IIa und II d/x (s. Tabelle 8, Abbildung 26A).

M-CK^{-/-}-Mäuse weisen im untrainierten Stadium mit 1% Typ I-, 22% Typ IIa-, 24% Typ II d/x- und 53% Typ IIb-Fasern eine den Wildtypmäusen vergleichbare Faserverteilung auf. Durch das Laufradtraining steigt bei M-CK^{-/-}-Mäusen, wie auch bei Wildtypmäusen, der Gehalt der Typ I-Muskelfasern an und es sinkt der Gehalt der Typ IIa-Fasern. Anders als bei Wildtypmäusen sinkt der Typ II d/x-Faseranteil auf 17% und der Typ IIb-Faseranteil bleibt mit 53% fast gleich (s. Abbildung 26B, Tabelle 8).

Untrainierte Mito-CK^{-/-}-Mäuse haben einen geringeren Anteil Typ IIa- und Typ IIb-Fasern und prozentual mehr Typ IIc-Fasern als Wildtypmäuse. Der Gehalt an Typ I-Fasern ist mit 0,5% dem bei Wildtypen vergleichbar. Durch Training steigt der Anteil von Typ IIa- und Typ IIc-Muskelfasern jeweils auf 26% an, und der Anteil der Typ IIb-Fasern sinkt auf 48%. Keine nennenswerte Veränderung zeigt sich bei den Typ I-Muskelfasern (s. Tabelle 8, Abbildung 26C).

Double-CK^{-/-}-Mäuse weisen mit <1% Typ I-, 13% Typ IIa-, 5% Typ IIc- und 81% Typ IIb-Fasern eine ganz andere Muskelfaserverteilung als Wildtypmäuse auf (s. Tabelle 8, Abbildung 26D).

Abbildung 26A: Wildtyp

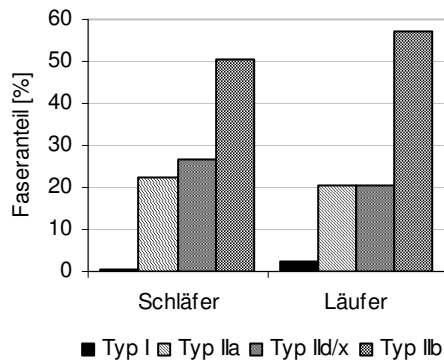


Abbildung 26B: M-CK

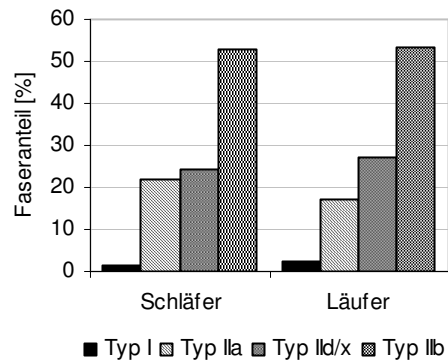


Abbildung 26C: Mito-CK

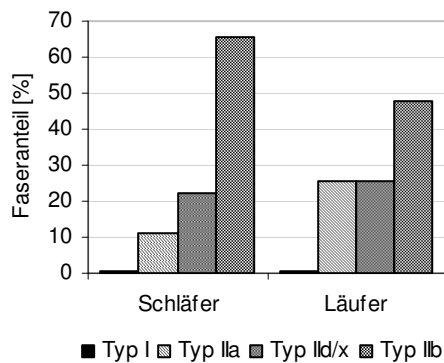


Abbildung 26D: Double-CK

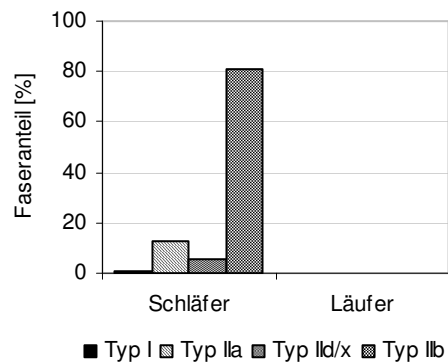


Abbildung 26: Muskelfaseranteile im *M. gastrocnemius* vor bzw. nach dreiwöchigem Lauftraining [%]

Faseranteil [%]	Typ I	Typ IIa	Typ IIb	Typ IIc/x
Wildtyp	0,5	22,5	50,5	26,6
Wildtyp Läufer	2,4	20,4	56,9	20,3
M-CK^{-/-}	1,2	21,7	52,9	24,2
M-CK^{-/-} Läufer	2,5	17,1	53,3	27,1
Mito-CK^{-/-}	0,5	11,3	65,8	22,4
Mito-CK^{-/-} Läufer	0,6	25,6	48,0	25,8
Double-CK^{-/-}	0,4	13,1	81,1	5,4

Tabelle 8: Muskelfaseranteile im *M. gastrocnemius* [%]

4.3.2.2 Musculus Tibialis anterior

Bei untrainierten Wildtypmäusen finden sich im *M. tibialis anterior* 1% Muskelfasern vom Typ I, 18% vom Typ IIa, 38% vom Typ IIc/x und 43% vom Typ IIb (s. Abbildung 27A). Durch dreiwöchiges Laufradtraining steigt der Fasergehalt der Typ I- und Typ IIa-Fasern an. Im Gegenzug verringert sich der Anteil der Typ IIc/x- und der Typ IIb-Fasern um 8% bzw. 7%.

M-CK^{-/-}-Mäuse haben mit 3% Typ I-, 24% Typ IIa-, 28% Typ IIc/x- und 45% Typ IIb-Muskelfasern unter allen CK-Mäusen die Muskelfaserverteilung, die der Verteilung in Wildtypmäusen am nächsten kommt (s. Abbildung 27B). Wie bei Wildtypen steigt durch die Trainingsbelastung der Gehalt der Typ IIa-Fasern und der Gehalt an Typ IIc/x-Muskelfasern sinkt. Der Anteil der Typ I-Fasern bleibt dagegen konstant und der Anteil der Typ IIb-Muskelfasern steigt im Gegensatz zu den Wildtypen um 7% an (s. Tabelle 9).

Mit einem Fasergehalt von 0,1% Typ I-, 3% Typ IIa- und 20% Typ IIc/x-Fasern haben Mito-CK^{-/-}-Mäuse einen deutlich geringeren Anteil genannter Fasern im *M. tibialis anterior* als Wildtypmäuse. Demzufolge liegt der Anteil der Typ IIb-

Muskelfasern mit 77% deutlich über dem der Wildtypen. Abbildung 27C zeigt den Anstieg des Fasergehalts der Typ I-, Typ IIa- und Typ IIb-Fasern und den Abfall des Typ IIb-Fasergehalts durch das Laufradtraining bei Mito-CK^{-/-}-Mäusen (s. Tabelle 9).

Auch im M. tibialis anterior unterscheidet sich die Faserverteilung der Double-CK^{-/-}-Mäuse mit 1% Typ I-, 34% Typ IIa-, 9% Typ IIb/x- und 56% Typ IIb-Muskelfasern erheblich von der Faserverteilung bei Wildtypmäusen (s. Tabelle 9, Abbildung 27D).

Abbildung 27A: Wildtyp

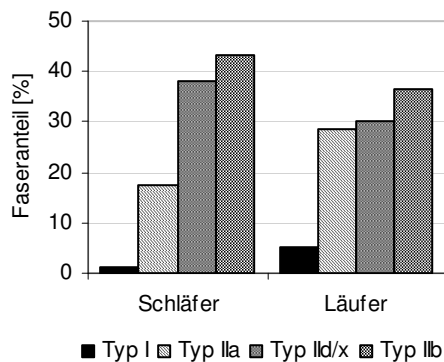


Abbildung 27B: M-CK

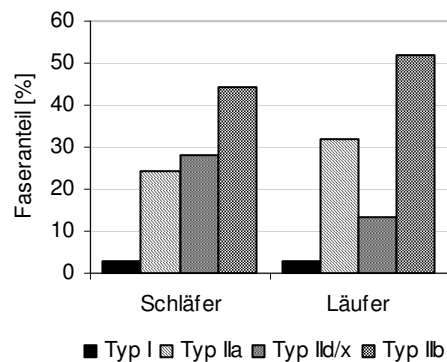


Abbildung 27C: Mito-CK

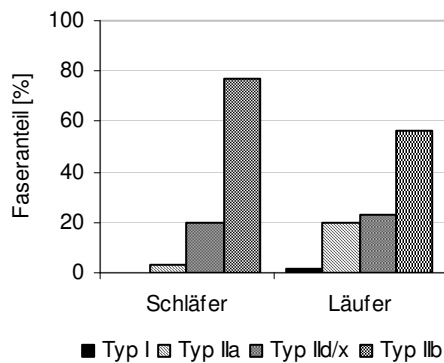


Abbildung 27D: Double-CK

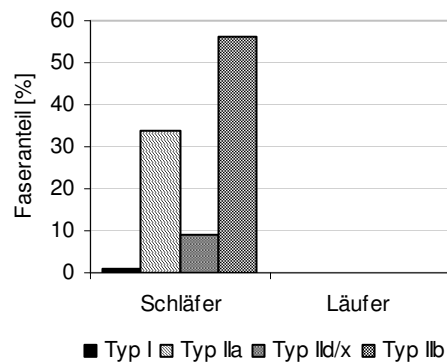


Abbildung 27: Muskelfaseranteile im M. tibialis anterior vor bzw. nach dreiwöchigem Laufradtraining [%]

Faseranteil [%]	Typ I	Typ IIa	Typ IIb	Typ IIc/x
Wildtyp	1,0	17,6	43,3	38,0
Wildtyp Läufer	5,2	28,4	36,3	30,1
M-CK^{-/-}	2,9	24,5	44,5	28,2
M-CK^{-/-} Läufer	2,9	32,1	51,7	13,4
Mito-CK^{-/-}	0,1	3,4	76,8	19,7
Mito-CK^{-/-} Läufer	1,5	19,6	56,2	22,7
Double-CK^{-/-}	1,0	33,9	56,1	9,0

Tabelle 9: Muskelfaseranteile im M. tibialis anterior [%]

5 Diskussion

Creatinkinase-defiziente Mäuse zeigen in Ausdauer- und Belastungstraining ein im Vergleich zu Wildtypen unterschiedliches Verhalten. Während M-CK^{-/-}-Mäuse im Ausdauertraining auf dem Laufrad schlechter als Wildtypmäuse trainieren, zeigen sie im Belastungstraining eine bessere Trainingsleistung. Bei Mito-CK^{-/-}-Mäusen zeigt sich dagegen ein umgekehrtes Bild. Sie weisen im freiwilligen Laufradtraining einen deutlich besseren Trainingseffekt als Wildtypmäuse auf, wogegen dieser im forcierten Belastungstraining auf dem Laufband deutlich schlechter ist als der der Kontrollgruppe. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sowohl eine kardiale als auch eine muskuläre Ursache haben, da das Creatinkinasesystem für die Energiebereitstellung in beiden Bereichen eine entscheidende Rolle spielt.

5.1 Zellgrößen adulter Kardiomyozyten

Bei der Untersuchung der Größe von adulten Herzmuskelzellen von M-CK^{-/-}-, Mito-CK^{-/-}-, Double-CK^{-/-}- und Wildtypmäusen zeigte sich, dass die Kardiomyozyten von M-CK^{-/-}-, Double-CK^{-/-}-Mäusen und Wildtypmäusen in etwa gleich groß sind. Die Kardiomyozyten von Mito-CK^{-/-}-Mäusen sind dagegen eineinhalb Mal so lang wie die der Wildtypen.

Die myokardiale Hypertrophie ist eine Anpassungsreaktion auf Grund einer vermehrten kardialen Arbeitsbelastung. Makroskopisch zeigt sich eine Hypertrophie des Herzens als Zunahme der ventrikulären und septalen Wandstärke. Auf zellulärer Ebene entspricht dies einer Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten mit gesteigerter Proteinsynthese und einem Umbau der sarcolemmalen Struktur [7]. Es werden zwei grundlegende Typen der Hypertrophie unterschieden: zum einen die physiologische Hypertrophie, die durch das Wachstum während der Entwicklung oder durch körperliches Training induziert wird. Zum anderen die pathologische Hypertrophie, welche sich bei Druck- oder Volumenbelastung des Herzens entwickelt. Die physiologische Hypertrophie ist durch eine harmonische Erweiterung der Herzhöhlen sowie der zu- und abfüh-

renden Gefäße, eine Größenzunahme der myokardialen Wandstärke und normale Kontraktilität gekennzeichnet. Bei der pathologischen Hypertrophie ist der Stimulus dafür verantwortlich, ob sich eine konzentrische oder eine exzentrische Hypertrophie ausbildet. Eine konzentrische Hypertrophie entsteht unter vermehrter Druckbelastung durch eine Zunahme der parallelen Sarkomere. Dadurch ergibt sich eine myokardiale Wandverdickung ohne Erweiterung der Ventrikel. Unter Volumenbelastung bildet sich durch einen Zuwachs der in Serie geschalteten Sarkomere eine exzentrische Hypertrophie mit einer Vergrößerung der Ventrikelhöhlen sowie einer ausgewogenen Zunahme der ventrikulären und septalen Wandstärke [2] [32] [33].

Wie in Abbildung 2 (s. Seite 9) zu sehen, weisen Mito-CK^{-/-}-Mäuse und Double-CK^{-/-}-Mäuse eine basale Hypertrophie ihrer Herzen auf, wohingegen M-CK^{-/-}-Mäuse normal große Herzen haben. Die Untersuchung von histologischen Schnitten der Herzen zeigt, dass es im histologischen Aufbau keinen Unterschied zwischen CK-Mäusen und Wildtypen gibt [19]. Erwähnenswert ist, dass die Kardiomyozyten verschiedener Spezies, wie zum Beispiel von Pferd, Kaninchen und Maus bei sehr unterschiedlichen absoluten Herzgewichten in etwa gleich groß sind. Es scheint also ein energetisches Optimum zu geben und somit könnte eine davon abweichende Kardiomyozytengröße einen Hinweis auf eine veränderte energetische Situation geben [18]. Die Hypertrophie der Mito-CK^{-/-}-Herzen kann somit allein durch die größeren und längeren Zellen erklärt werden, vergleichbar der myokardialen Hypertrophie des transgenen Mausmodells mit aktiviertem α_{1B} -Adrenorezeptor [21]. Aber auch eine kombinierte Hypertrophie und Hyperplasie, vergleichbar dem Calmodulin transgenen Mausmodell, bei dem durch eine erhöhte Calmodulinkonzentration ein proliferatives und hypertrophes Wachstum der Kardiomyozyten induziert wird, ist denkbar [11]. Mit oben verwendeten Methoden kann eine genaue Festlegung aber nicht erfolgen.

M-CK^{-/-}-Mäuse weisen den Wildtypmäusen vergleichbare Herzgewichte und Kardiomyozytengrößen auf. Das Fehlen der muskulären Creatinkinase scheint daher kein Stimulus für die Ausbildung einer Hypertrophie zu sein. Dies paßt zu

den Ergebnissen von Saupe et al, die keine Veränderungen im Energiestoffwechsel und der kontraktilen Funktion von M-CK^{-/-}-Mäusen feststellen konnten [34].

Da die Kardiomyozyten der Double-CK^{-/-}-Mäuse in etwa so groß sind wie Wildtypkardiomyozyten und eine Fibrose der Herzen durch die histologische Untersuchung ausgeschlossen wurde, kann man die Hypertrophie der Double-CK^{-/-}-Herzen nur durch eine größere Anzahl an Kardiomyozyten erklären. Es liegt somit eine echte Hyperplasie vor. Diese Hyperplasie der Kardiomyozyten ist denen des IGF-1 transgenen Mausmodells vergleichbar. Dort kommt es durch eine Stimulation des IGF-1 Rezeptors zu gesteigerter DNA-Synthese und der Ausbildung einer Kardiomyozytenhyperplasie. [15]. Der Stimulus für die Ausbildung der Hyperplasie bei Double-CK^{-/-}-Mäusen ist unklar. Auffallend ist, dass sich nicht wie bei Mito-CK^{-/-}-Mäusen eine Kardiomyozytenhypertrophie entwickelt, obwohl ja auch Double-CK^{-/-}-Mäusen das Gen für die mitochondriale Creatinkinase fehlt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es bei fehlender muskulärer und mitochondrialer Creatinkinase ein energetisches Optimum bei kleineren Kardiomyozyten gibt, das eine Hypertrophie verhindert. Fehlen beide Isoformen der Creatinkinase, was einer Abnahme der totalen CK-Aktivität um 96% entspricht, kann die normale Konzentration an ADP und die durch die Hydrolyse von ATP freigesetzte Energie bei steigender Belastung nicht aufrecht erhalten werden [34]. Dadurch wird die kardiale Belastung zu einem energieaufwändigeren Prozess, was wiederum ein möglicher Stimulus für die Hyperplasie sein könnte, um dadurch die kontraktile Kraft zu gewährleisten.

Die Herzen der Mito-CK^{-/-}-Mäuse sind dem Modell eines Sportlerherzens bei Ausdauersport vergleichbar [2][30], was die guten Leistungen im freiwilligen Laufradtraining erklären kann. Eine pathologische Hypertrophie konnte bei fehlenden Markern für die selbige ausgeschlossen werden [19]. Warum eine weitere hypertrophische Anpassung der Herzen bei steigendem Trainingseffekt nicht nachzuweisen ist, liegt möglicherweise daran, dass ein für die Maus kritisches Herzgewicht erreicht ist und bei weitergehender Hypertrophie die koronare Sauerstoffversorgung nicht mehr gewährleistet wäre.

Mito-CK^{-/-}- und Double-CK^{-/-}-Mäuse sind bei forciertem Laufbandtraining schlechter belastbar als Wildtypmäuse. Eine Erklärung hierfür könnte die verminderte Energiebereitstellung bei starker körperlicher Belastung sein, da auch keine Anpassungen bei anderen ATP-bildenden Prozessen gefunden wurden, die den Mangel an Creatinkinase ausgleichen könnten. Der für die kardiale Funktion entscheidende Faktor scheint der Mangel an mitochondrialer Creatinkinase zu sein [34].

Bei M-CK^{-/-}-Mäusen können die unterschiedlichen Ergebnisse im freiwilligen Laufrad- sowie im forcierten Laufbandtraining nicht durch kardiale Ursachen erklärt werden. Die M-CK^{-/-}-Mäuse weisen keine basale Hypertrophie auf, die Größe der Kardiomyozten ist der von Wildtypen vergleichbar und es bildet sich durch Laufradtraining eine angemessene physiologische Hypertrophie der Herzen aus. Auch zeigen sich keine Unterschiede in der kontraktilen oder energetischen Reaktion bei steigender kardialer Belastung im Vergleich zu Wildtypen [34].

Eine mögliche Limitation der Aussagen über trainierte Mäuse stellt die Tatsache dar, dass für die Untersuchung der Kardiomyozytengröße nur untrainierte Tiere verwendet wurden. Eine weitere Untersuchung von Herzen nach dreiwöchigem Training auf dem Laufrad könnte zusätzliche Aussagen liefern.

5.2 Ruhe- und Stress-EKG

Die Elektrokardiographie ist das wohl am weitesten verbreitete diagnostische Verfahren zur Untersuchung des Herzrhythmus, der Erregungsleitung sowie einer möglichen Ischämie. Des Weiteren können Aussagen über eine Rechts- oder Linksherzhypertrophie getroffen werden. EKG-Untersuchungen mit medikamentös ausgelöstem Stress dienen der Beurteilung einer Anpassung an vermehrte Belastung. Multipliziert man die Herzfrequenz mit dem Schlagvolumen, erhält man das Herzzeitvolumen. Das Herzzeitvolumen gilt als ein aussagekräftiger Parameter für die kardiale Funktion. Veränderungen des Herzzeitvolumens könnten als Erklärung für das unterschiedliche Abschneiden der CK-Mäuse bei Belastungs- und Ausdauertraining dienen. Eine ausreichende Energiebereitstel-

lung in den Herzmuskelzellen ist für eine gute kardiale Funktion unerlässlich. Die benötigte Energie, in Form von ATP, wird in der Herzmuskelzelle laufend durch oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien gebildet. Die anaerobe, glykolytische ATP-Synthese sowie das in Form von Phosphokreatin gespeicherte ATP - der ATP-Vorrat in den Kardiomyozyten reicht nur für wenige Schläge aus - spielen nur eine untergeordnete Rolle [16]. Das Fehlen der muskulären Creatinkinase scheint dabei keine schwerwiegenden Konsequenzen auf den Energiestoffwechsel zu haben, da der Herzmuskel durch die im Vergleich zum Skelettmuskel höhere Anzahl an Mitochondrien eine größere oxydative ATP-Synthesekapazität und kürzere Diffusionsstrecken zwischen Mitochondrien und den cytoplasmatischen ATPasen aufweist. Ganz im Gegensatz dazu ist die mitochondriale Creatinkinase für den myokardialen Energiestoffwechsel von außerordentlicher Bedeutung. Die mitochondriale Creatinkinase ist auf der äußeren Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und bildet dort eine funktionelle Einheit mit Porinen und der Adenosinnukleotid-Translokase. Der „CK-Shuttle“ verbindet so die Seite der Energieproduktion mit der des Energieverbrauchs. Phosphokreatin dient dabei als Energietransportmolekül [25][34][36].

Mito-CK^{-/-}-Mäuse weisen im Ruhe-EKG und im Stress-EKG, anders als M-CK^{-/-}- und Double-CK^{-/-}-Mäuse, eine signifikant niedrigere Herzfrequenz als Wildtypmäuse auf. In allen Mauslinien kommt es nach der Injektion von Dobutamin zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz. Auch nach Dobutamingabe schlagen die Herzen der Mito-CK^{-/-}-Mäuse langsamer.

M-CK^{-/-}-Mäuse weisen den Wildtypmäusen vergleichbare Daten im Ruhe- und Stress-EKG auf. Ein vermindertes Herzzeitvolumen, welches das im Vergleich zu Wildtypmäusen schlechtere Abschneiden der M-CK^{-/-}-Mäuse im Ausdauertraining erklären könnte, kann somit nur durch ein vermindertes Schlagvolumen bedingt sein. Doch Nahrendorf et al. konnten mittels EKG-gesteuerter Magnetresonanztomographie keinen Unterschied des Herzzeitvolumens, der Ejektionsfraktion und des enddiastolischen Volumens zwischen M-CK^{-/-}-Mäusen

und Wildtypen nachweisen. Der Mangel an M-CK hat somit keinen bedeutenden funktionellen Einfluss im Herzen [25][36].

In der Echokardiographie von Mito-CK^{-/-}-Mäusen zeigt sich ein leicht vergrößertes Cavum und eine dickere Wand [19]. Bei niedrigerer Frequenz haben Mito-CK^{-/-}-Mäuse somit eine den Wildtypen vergleichbare Auswurfleistung. Die Herzen der Mito-CK^{-/-}-Mäuse sind dem Bild eines Sportlerherzens vergleichbar, bei dem es durch den Trainingsreiz zu einer Zunahme der enddiastolischen Ausdehnung des linken Ventrikels, einer partiellen Zunahme der Wandstärke, einer Verbesserung der diastolischen Füllung sowie zu einer Abnahme der Herzfrequenz kommt [10]. Hierdurch wird ein erhöhtes Schlagvolumen gewährleistet, was unter Belastung ein deutlich erhöhtes maximales Herzzeitvolumen ermöglicht [2]. Dies könnte die gute Leistung der Mito-CK^{-/-}-Mäuse im Ausdauertraining erklären, liefert aber keine Erklärung für das schlechte Abschneiden beim forcierten Laufbandtraining.

Auch Double-CK^{-/-}-Mäuse weisen sowohl in Ruhe als auch nach Dobutamininjektion eine im Vergleich zu Wildtypmäusen langsamere Herzfrequenz auf, jedoch erreicht der Unterschied das Signifikanzniveau nicht. Vergleichbar den Mito-CK^{-/-}-Mäusen, wurde ein vergrößertes Herzzeitvolumen sowie eine basale Hypertrophie beschrieben. All dies kann als Anpassung an die veränderte Energiehomöostase gewertet werden [25][36].

Im 12-Kanal-EKG bei Menschen gibt es einige Marker, die Hinweise auf eine Herzhypertrophie liefern können, so zum Beispiel die 12-Kanal-Summe der Potentiale (Summe der Q-, R-, S-Amplituden in allen zwölf Ableitungen), der Sokolow-Lyon Index (Summe der S-Amplitude in Ableitung V₁ und der R-Amplitude in Ableitung V₅ oder V₆), der Cornell Index (Summe der R-Amplitude in Ableitung aVL und der S-Amplitude in Ableitung V₃), die QRS-Dauer oder das Produkt aus QRS-Dauer und der R-Amplitude in Ableitung V₅ [6][26][27]. Da bei Mäusen die Ableitung eines 12-Kanal-EKGs auf Grund der Größe nicht möglich ist, können nur das Produkt aus QRS-Dauer und R-Amplitude oder die QRS-Dauer allein als mögliche Hypertrophiemarker dienen.

Das QRS-Produkt ist bei Mito-CK^{-/-}-Mäusen und Double-CK^{-/-}-Mäusen größer als bei Wildtypen. Bei M-CK^{-/-}-Mäusen entspricht es in etwa dem der Wildtypmäuse. Diese Ergebnisse korrelieren mit den gemessenen Herzgewichten. Diese zeigen eine basale Hypertrophie von Mito-CK^{-/-}- und Double-CK^{-/-}-Herzen und ein den Wildtypen vergleichbares Herzgewicht der M-CK^{-/-}-Mäuse (s. Abbildung 4, Seite 10). Die QRS-Dauer ist bei allen CK-Mäusen signifikant länger als bei Wildtypen und korreliert somit nicht mit der Herzhypertrophie, von der, wie aus Abbildung 4 ersichtlich, nur Mito-CK^{-/-}-Mäuse und Double-CK^{-/-}-Mäuse betroffen sind. Somit ist es möglich, das QRS-Produkt, einen im EKG beim Menschen verwendeten Hypertrophiemarker, auch bei Mäusen zu nutzen. Ausgehend von diesen Daten erfolgte eine weitergehende systematische Untersuchung von EKG-Markern für kardiale Hypertrophie bei Mäusen, welche oben genannte Ergebnisse bestätigte [19].

Das unterschiedliche Verhalten der CK-Mäuse im Ausdauer- und Belastungstraining kann durch eine kardiale Ursache nur zum Teil erklärt werden. Im EKG zeigt sich eine normale Anpassung der Herzfunktion an die Belastung mit adäquatem Frequenzanstieg in allen untersuchten Gruppen. Eine Aussage über die kardiale Funktion und das Herzzeitvolumen kann mit der Elektrokardiographie allerdings nicht getroffen werden. Die Echokardiographie oder die EKG-gesteuerte Magnetresonanztomographie in Ruhe und unter medikamentösem Stress mit Dobutamin könnten Hinweise über die kardiale Pumpfunktion liefern. Möglicherweise könnte auch eine Untersuchung der CK-Mäuse mit eingebauten Telemetriesendern noch einen Hinweis auf eine kardiale Ursache geben. Unter Narkose weisen die Tiere eine verminderte Herzfrequenz auf und erreichen auch mittels Dobutamininjektion nicht ihre tatsächliche Belastungsherzfrequenz. Mit Telemetriesendern ist eine EKG-Aufzeichnung ohne Narkose während der Trainings- und Ruhephasen möglich.

5.3 Skelettmuskel

Das dreiwöchige Laufradtraining der Mäuse führte zu einer Veränderung der Verteilung der einzelnen Muskelfasertypen, wie auch zu Größenänderungen der Muskelfaserquerschnitte.

5.3.1 Größe der Muskelfasern

In der Literatur läßt sich keine einheitliche Aussage über trainingsinduzierte Veränderungen des Muskelfaserquerschnittes finden. Bei Menschen scheint die Art des Trainingsreizes eine entscheidende Rolle zu spielen. So zeigten Trappe et al. eine Abnahme der Querschnittsfläche von Typ I- und Typ IIa-Fasern bei Marathontraining [42]. Wohingegen Hostler et al. eine Zunahme der Muskelfaserquerschnittsfläche durch dynamisches Krafttraining feststellen konnten [13]. Bei Nagetieren stellen sich die Ergebnisse uneinheitlich dar. In Ratten wiesen Fitts et al. keine Veränderungen der Fasergröße bei Ausdauer- und Belastungstraining nach [9]. Wohingegen Allen et al. bei Mäusen eine durch Ausdauertraining induzierte Zunahme der Muskelfaserquerschnittsfläche publizierten [1]. Betrachtet man die Energieversorgung der unterschiedlichen Muskelfasertypen, kann man vereinfacht sagen: Schnelle Muskelfasern sind auf ihre Energiereserven aus Phosphocreatin und ATP angewiesen und können schnelle Kontraktionen unter Aufwendung der selben über einen kurzen Zeitraum ausüben. Sie ermüden schnell und erneuern ihre Energiereserven durch anaerobe Glykolyse und oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien. Langsame Muskelfasern haben dagegen bei geringerer kontraktile Kraft eine ausgeprägte oxydative Funktion, die, basierend auf oxydativer Phosphorylierung, eine ausdauernde kontraktile Leistung gewährleistet. So passen langsame Muskelfasern ihre Energieproduktion dem Energiebedarf an. Das Creatinkinasesystem ist an der Kontrolle der lokalen ADP- und ATP-Konzentrationen beteiligt und stellt so eine wichtige Verbindung zwischen der Energieproduktion und der Energieverwertung dar [44]. Fehlen Isoenzyme der Creatinkinase, wie bei oben verwendeten Creatinkinase-defizienten Mäusen ist eine Anpassung der Muskelfasern denkbar.

Im M. tibialis anterior und im M. gastrocnemius der Wildtypen kommt es durch den Trainingsreiz zu einer signifikanten Vergrößerung des Faserquerschnittes der Typ I-Fasern, wohingegen sich die Querschnittsfläche der Typ IIa- und Typ IIb/x-Fasern verringert. Die Größenzunahme der Muskelfasern vom Typ I entspricht den Daten von Allen et al., wohingegen sie sich bei Typ IIa-Fasern widersprechen [1]. Ein Grund für die Abnahme der Querschnittsfläche der schnellen Muskelfasern (Typ IIa; Typ IIb/x) könnte die bei Ausdauerleistung bessere Energieversorgung der Muskelfasern sein, die durch eine verkürzte Diffusionsstrecke für Sauerstoff und andere Substrate gewährleistet wird [42].

Die Typ I-Fasern der M-CK^{-/-}-Mäuse sind im untrainierten Zustand größer als die der Wildtypmäuse, wohingegen Typ IIa- und Typ IIb/x-Fasern kleiner sind. Durch das Laufradtraining kommt es im M. tibialis anterior zu einer den Wildtypen entgegengesetzten Reaktion. Die Typ I-Fasern werden kleiner und die Querschnittsfläche der Typ IIa- und Typ IIb/x-Fasern nimmt zu. Eine mögliche Ursache für die Abnahme des Faserquerschnittes der Typ I-Fasern könnte die bei Ausdauerleistung verbesserte Energiebereitstellung sein. Bei Fehlen der muskulären Creatinkinase können die Muskelfasern nicht auf Ihre Energiereserven zurückgreifen, sondern müssen ATP ständig neu produzieren, was bei verkürzter Diffusionsstrecke erleichtert wird [43][44]. Bei der Bewertung der Typ IIa- und Typ IIb/x-Fasern kann kein einheitlicher Trend festgestellt werden, da sich diese Fasern – bei sehr hohen Standardabweichungen - im M. tibialis anterior und M. gastrocnemius unterschiedlich verhalten.

Ganz anders verhalten sich hingegen die Typ I-Fasern im M. Tibialis anterior der Mito-CK^{-/-}-Mäuse. Im untrainierten Zustand weisen Mito-CK^{-/-}-Mäuse nur sehr wenige Typ I-Fasern mit einer sehr großen Querschnittsfläche auf. Durch das dreiwöchige Laufradtraining kommt es zu einem Anstieg des Typ I-Faseranteils. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die neu gebildeten Typ I-Muskelfasern eine nur etwa halb so große Querschnittsfläche haben wie die Typ I-Fasern der untrainierten Mäuse. Eine Erklärung hierfür könnte die bessere Versorgung der Muskelfasern mit Sauerstoff sein, da sie durch das Fehlen der mitochondrialen Creatinkinase auf aerobe Energiegewinnung angewiesen

sind und bei kleinerem Querschnitt die Diffusionsstrecke kürzer ist [42]. Diese Veränderungen sind bei schnellen Muskelfasern weniger ausgeprägt, da der Gehalt an mitochondrialer Creatinkinase in diesen Fasern nur sehr gering ist und die Energiebereitstellung hauptsächlich über die muskuläre Creatinkinase gewährleistet wird [44].

Double-CK^{-/-}-Mäuse weisen sowohl im M. tibialis anterior als auch im M. gastrocnemius eher größere Muskelfasern auf als Wildtypmäuse. Im strukturellen Aufbau von Muskelfasern der Double-CK^{-/-}-Mäuse konnten tiefgreifende Veränderungen festgestellt werden. Besonders hervorzuheben sind die komplett veränderten Interaktionen zwischen Mitochondrien und anderen subzellulären Organellen. Es kommt zu einer Zunahme der Anzahl und des Volumens der Mitochondrien sowie zu einer örtlichen Umverteilung hin zu den M-Banden der Myofilamente, was auf eine vermehrte Interaktion mit anderen Organellen schließen lässt. Somit weisen die schnellen Muskelfasern der Double-CK^{-/-}-Mäuse eine tiefgreifende Veränderung der Energiebereitstellung von der Nutzung gespeicherter Energie hin zu einer an den Bedarf ausgerichteten Neubildung energiereicher Substrate in den Mitochondrien auf [14][44]. Diese strukturellen Veränderungen könnten eine Erklärung für die Vergrößerung der Muskelfaserquerschnitte sein.

Abschließend ist zu erwähnen, dass sich die Bewertung der Muskelfasergrößen auf Grund der hohen Standardabweichungen, die sich durch die mit n=2 recht kleine Gruppengröße ergaben, schwierig darstellte (s. Tabelle 6, Tabelle 7).

5.3.2 Verteilung der Muskelfasertypen

Bei den Wildtypmäusen kommt es zu einer prozentualen Verschiebung der Muskelfasertypen hin zu mehr langsamen Muskelfasern (s. Tabelle 8, Tabelle 9, Abbildung 26, Abbildung 27). Auch Momken et al. [24] und Allen et al. [1] publizierten eine, durch Ausdauertraining initiierte Verschiebung der Muskelfasertypen von schnelleren hin zu langsameren Fasern.

Momken et al. [24] weisen im M. gastrocnemius allerdings nur Typ IIb- und Typ IIc/x- Fasern nach. Dies widerspricht sowohl den Daten von Allen et al. als auch den oben aufgeführten Daten.

Vergleicht man die absoluten Zahlen der Muskelfaserverteilung im M. gastrocnemius als auch im M. tibialis anterior, so zeigt sich, dass die Wildtypmäuse bei Allen et al. sowohl vor als auch nach dem Training einen größeren Anteil an langsamen Fasern aufweisen. Ein Grund für diesen Umstand kann das unterschiedliche Alter der Versuchstiere sein. Während Allen et al. Tiere mit einem Alter von sechs Wochen verwendeten, wurden bei oben genannten Versuchen nur vollständig ausgewachsene Tiere im Alter von zwei bis vier Monaten untersucht. Eine altersbezogene Veränderung der Muskelfaserverteilung wurde in Quer- und Längsschnittuntersuchungen an Rattenmuskeln nachgewiesen und kann auch bei Mäusen angenommen werden [29]. Eine weitere Erklärung für die abweichenden Zahlen können die unterschiedlichen Außenbedingungen liefern, insbesondere der unterschiedliche Sauerstoffpartialdruck, bei dem das Training der Tiere durchgeführt wurde. Die Tiere in Würzburg trainierten auf 208 m über Normalnull, wohingegen die Mäuse in Boulder, Colorado auf 1655 m über dem Meeresspiegel trainierten.

M-CK^{-/-}-Mäuse weisen vor dem Training im Laufrad eine den Wildtypen vergleichbare Muskelfaserverteilung auf. Durch das Training kommt es bei M-CK^{-/-}-Mäusen zu keiner Verschiebung hin zu langsameren Muskelfasertypen (s. Tabelle 8, Tabelle 9). Des Weiteren kommt es auch in Bezug auf die Muskelfaserquerschnitte nicht zu bedeutenden Veränderungen (s. Tabelle 6, Tabelle 7). Die im Vergleich zu Wildtypen schlechteren Ergebnisse im Laufradtraining könnten dadurch gut erklärt werden. Eine andere Ursache der fehlenden Verschiebung hin zu langsameren Muskelfasertypen sowie der unveränderten Muskelfaserquerschnitte könnte aber auch der unzureichende Trainingsreiz bei M-CK^{-/-}-Mäusen sein, wenn man annimmt, dass ein nicht-muskulärer Defekt für die schlechte Trainingsleistung verantwortlich ist.

Mito-CK^{-/-}-Mäuse trainieren im Laufrad besser, wohingegen sie im Belastungstraining auf dem Laufband schlechter trainieren als Wildtypmäuse. Eine Erklä-

rung für diese Ergebnisse liefert die Untersuchung der Muskelfasern. Wie auch bei Wildtypmäusen zeigt sich eine Verschiebung der Muskelfaserverteilung hin zu mehr langsamen Muskelfasern. Doch auch nach dem Training weisen Mito-CK^{-/-}-Mäuse noch mehr schnelle Muskelfasern auf als Wildtypmäuse. Den Mito-CK^{-/-}-Mäusen fehlt, wie im Kapitel 1 beschrieben, die mitochondriale Creatinkinase. Dieses Enzym ist im Muskel für die Regeneration des Creatinphosphats zuständig, welches essentiell für die schnelle Energiebereitstellung ist [12]. Fehlt dieses Enzym, muss der Organismus auf andere Wege, wie zum Beispiel die aerobe Oxidation, zur Energiebereitstellung zurückgreifen. Ein an das Fehlen der mitochondrialen Creatinkinase adaptierter Organismus hat so möglicherweise schon bessere Voraussetzungen für das Ausdauertraining. Auf dem Laufband ist dagegen eine schnelle Energiebereitstellung notwendig. Die Aktivität der mitochondrialen Creatinkinase korreliert mit dem aerob-oxidativen Potential der Muskeln [50]. Das schlechte Abschneiden der Mito-CK^{-/-}-Mäuse lässt sich also dadurch erklären, dass der Organismus unter der Belastung mit der Energiebereitstellung nicht nachkommt.

Die bei Double-CK^{-/-}-Mäusen gefundene Muskelfaserverteilung im M. gastrocnemius (s. Tabelle 8) entspricht in etwa der bei Momken et al. [24], wobei sie, wie oben schon erwähnt, nur Muskelfasern der Typen IIb und IIc/x nachweisen konnten. Im Vergleich zu Wildtypen ließen sich deutlich mehr Typ IIb-Fasern nachweisen. Des Weiteren fällt sowohl im M. gastrocnemius als auch im M. tibialis anterior die stark verminderte Anzahl an Typ IIc/x-Fasern auf. Eine Bewertung von trainierten Double-CK^{-/-}-Mäusen war unter oben genannten Versuchsbedingungen nicht möglich, da sich die Tiere dem freiwilligen Laufradtraining nicht unterzogen hatten. Eine Erklärung hierfür könnte eine Veränderung im Gehirn der Double-CK^{-/-}-Mäuse sein, die die Mäuse daran hindert, freiwillig das Laufrad zu benutzen. Eine Bestätigung dieser Theorie liefert der Umstand, dass Double-CK^{-/-}-Mäuse durchaus körperlich in der Lage sind zu trainieren, wie das Laufbandtraining zeigt. Zu erwähnen ist, dass Momken et al. Daten von Double-CK^{-/-}-Mäusen publizierten, die im freiwilligen Laufradmodell liefen. Diese Double-CK^{-/-}-Mäuse nutzten das Laufrad nur ein Viertel so oft wie Wildtypmäuse und legten dabei nur ein Zehntel der Strecke zurück [24]. Somit ist es

durchaus möglich, dass diese Double-CK^{-/-}-Mäuse täglich weniger als 30 Minuten im Laufrad verbrachten, was das Ausschlusskriterium bei oben beschriebenen Versuchen darstellte.

6 Zusammenfassung

Das Creatinkinase-System ist ein für die Energiegewinnung bedeutender Mechanismus im Herz- und Skelettmuskel. Um die Bedeutung dieses Systems näher untersuchen zu können, wurden CK-knock-out Tiere (M-CK^{-/-}, Mito-CK^{-/-} bzw. Double-CK^{-/-}-Mäuse) und als Kontrollgruppe C 57 Wildtyp Black Six Mäuse verwendet. In der Arbeit vorgeschalteten Versuchen zeigten sich im Ausdauertraining unterschiedliche Trainingseffekte zwischen den Gruppen. Während M-CK^{-/-}-Mäuse schlechter als Wildtypen trainierten, wiesen Mito-CK^{-/-}-Mäuse einen besseren Trainingseffekt auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Belastungstraining auf dem Laufband ein umgekehrtes Bild. Durch das Laufradtraining kam es zu einer adaptiven Hypertrophie der Herzen von Wildtyp- und M-CK^{-/-}-Mäusen, nicht dagegen bei Mito-CK^{-/-}-Mäusen, welche, wie auch Double-CK^{-/-}-Mäuse, eine basale Herzhypertrophie aufwiesen.

Um die Hypertrophie näher untersuchen zu können, wurden Kardiomyozyten isoliert und deren Größe bestimmt. Es zeigte sich, dass die Kardiomyozyten der Mito-CK^{-/-}-Mäuse bei vergleichbarer Breite etwa doppelt so groß wie Wildtyp-Kardiomyozyten waren. So ist die Hypertrophie der Mito-CK^{-/-}-Herzen durch die größeren Zellen bedingt. Die basale Vergrößerung der Double-CK^{-/-}-Herzen kann auf Grund der Kardiomyozytengröße nicht erklärt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich die Herzhypertrophie auf eine erhöhte Anzahl von Herzmuskelzellen zurückführen lässt.

Die Bedeutung eines möglichen kardialen Phänotyps wurde durch Ruhe-EKGs und Dobutamin-Stress-EKGs untersucht. Es zeigte sich, dass Mito-CK^{-/-}-Mäuse eine um 10% niedrigere Ruheherzfrequenz aufwiesen. Durch die Dobutamingabe stiegen die Herzfrequenzen in allen Gruppen signifikant an, wobei die Herzfrequenz der Mito-CK^{-/-}-Mäuse auch nach der Dobutamingabe 10% niedriger war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das QRS-Produkt, ein beim Menschen verwendeter Hypertrophiemarker im EKG, auch bei Mäusen einen Hinweis auf die Hypertrophie der Herzen geben kann.

Zuletzt wurde die Muskelfaserverteilung sowie die Größe der Muskelfaserquerschnittsfläche vor beziehungsweise nach dreiwöchigem freiwilligen Laufradtraining in Querschnitten des M. tibialis anterior und M. gastrocnemius bestimmt. In den Muskeln der Wildtypmäuse kam es durch den Trainingsreiz zu einer Verschiebung hin zu mehr langsamen Fasertypen. Der gleiche Effekt zeigte sich auch bei Mito-CK^{-/-}-Mäusen, wobei diese sowohl vor als auch nach dem Training mehr schnelle Muskelfasern aufwiesen als Wildtypen. Bei M-CK^{-/-}-Mäusen konnte keine Anpassung der Muskeln an das Training nachgewiesen werden. Eine Bewertung der Double-CK^{-/-}-Mäuse ist im Bezug auf die Muskeln nicht möglich, da sie sich dem freiwilligen Laufradtraining nicht unterzogen.

Ein kardialer Phänotyp kann die Unterschiede im Laufband- und Laufradtraining der CK-knock-out Tiere nur zum Teil erklären, da sich in allen Gruppen eine normale Anpassung der Herzfunktion an die Belastung mit adäquatem Frequenzanstieg. Da mit der Elektrokardiographie keine Aussage über die kardiale Funktion und das Herzzeitvolumen getroffen werden kann, könnte die Echokardiographie oder die EKG-gesteuerte Magnetresonanztomographie in Ruhe und unter medikamentösem Stress mit Dobutamin weitere Hinweise liefern. Auch eine Untersuchung ohne Narkose, in Ruhe und während der Trainingsphasen mittels Maus-Telemetrie könnte zusätzliche Aussagen liefern.

Bei den Double-CK^{-/-}-Mäusen ist möglicherweise eine Veränderung im Gehirn dafür verantwortlich, dass sie sich dem freiwilligen Laufradtraining nicht unterziehen. Körperlich wären Double-CK^{-/-}-Mäuse durchaus fähig im Laufrad zu trainieren, da sie ja auch auf dem Laufband laufen.

Die Unterschiede im Laufband- und Laufradtraining sind wahrscheinlich durch einen muskulären Phänotyp zu erklären. Erste Hinweise darauf liefern oben aufgeführte Ergebnisse, die eine unterschiedliche Anpassung der Muskelfasertypen an das Training zeigen. Weitergehende Untersuchungen mit größeren Gruppen und die Untersuchung der Muskeln von auf dem Laufrad trainierten Mäusen könnten dazu weitere Anhaltspunkte liefern.

Literaturverzeichnis

- [1] Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand L (2001): Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* 90(5), 1900-1908
- [2] Braumann KM, Ziegler M, Reer R (2003): The heart of the athlete. *Dtsch Med Wochenschr* 128(12), 625-629
- [3] Boehm E, Ventura-Clapier R, Mateo P, Lechene P, Veksler V (2000): Glycolysis supports calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in skinned ventricular fibers of mice deficient in mitochondrial and cytosolic creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 32, 891-902
- [4] Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C (1994a): Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *J Physiol* 478, 341-349
- [5] Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ (1994b): Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J Physiol* 481, 663-675
- [6] Calsson MB, Tragardh E, Engbolm H, Hedstrom E, Wagner G, Pahlm O, Arheden H (2005): Left ventricular mass by 12-lead electrocardiogram in healthy subjects: comparison to cardiac magnetic resonance imaging. *J Electrocardiol.* 39(1), 67-72
- [7] Carreño JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE (2006): Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Rev Esp Cardiol* 59(5), 473-486
- [8] Deursen J van, Heerschap A, Oerlemans F, Ruitenbeek W, Jap P, Laak H ter, Wieringa B (1993): Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell* 74, 621-631
- [9] Fitts RH, Widrick JJ (1996): Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exerc Sport Sci Rev* 24, 427-473

- [10] Ghorayeb N, Batlouni M, Pinto IM, Dioguardi GS (2005): Left ventricular hypertrophy of athletes: adaptative physiologic response of the heart. *Arq Bras Cardiol* 85(3), 191-197
- [11] Gruver CL, DeMayo F, Goldstein MA, Means AR (1993): Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology*. 133(1), 376-388
- [12] Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl Ch, Berghold S, Schneider N, Münster B (2002), *Biochemie des Menschen, Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 1. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 549-551
- [13] Hostler D, Schwirian CI, Campos G, Toma K, Crill MT, Hagerman GR, Hagerman FC, Staron RS (2001): Skeletal muscle adaptations in elastic resistance-trained young men and women. *Eur J Appl Physiol* 86(2), 112-118
- [14] Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Ventura-Clapier R (2003): From energy store to energy channeling: a study in creatine kinase deficient fast skeletal muscle. *Faseb J* 17, 708-710
- [15] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Anversa P (1994): The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy *in vitro*. *Exp Cell Res* 215(2), 273-283
- [16] Klinke R, Silbernagel S (2001), *Lehrbuch der Physiologie*, 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 126-142
- [17] Leonhardt H (1990), *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie Band 3*, 8. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 202-213

- [18] Loughrey CM, Smith GL, MacEachern KE (2004): Comparison of Ca²⁺ release and uptake characteristics of the sarcoplasmic reticulum in isolated horse and rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(3), H1149-H1159
- [19] Maass AH, Maier SK (2007): Publikation in Vorbereitung
- [20] Maass AH, Ikeda K, Oberdorf-Maass S, Maier SK, Leinwand LA (2004): Hypertrophy, fibrosis, and sudden cardiac death in response to pathological stimuli in mice with mutations in cardiac troponin T. *Circulation* 110(15), 2102-2109
- [21] Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, Lefkowitz RJ (1994): Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(21), 10109-10113
- [22] Minajeva A, Ventura-Clapier R, Veksler V (1996): Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase. *Pflugers Arch* 432, 904-912
- [23] Mitchell GF, Jeron A, Koren G. (1998): Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 274, H747-751
- [24] Momken I, Lechêne P, Koulmann N, Fortin D, Mateo P, Doan BT, Hoerter J, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R (2005): Impaired voluntary running capacity of creatine kinase-deficient mice. *J Physiol* 565.3: 951-964
- [25] Nahrendorf M, Spindler M, Hu K, Bauer L, Ritter O, Nordbeck P, Quaschnig T, Hiller KH, Wallis J, Ertl G, Bauer WR, Neubauer S (2005): Creatine kinase knockout mice show left ventricular hypertrophy and dilatation, but unaltered remodeling post-myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 65(2), 419-27

- [26] Okin PM, Roman MJ, Devereux RB, Kligfield P (1995): Electrocardiographic identification of increased left ventricular mass by simple voltage-duration products. *J Am Coll Cardiol* 25(2), 417-423
- [27] Okin PM, Roman MJ, Devereux RB, Kligfield P (1996): Time-voltage area of the QRS for the identification of left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 27(2), 251-258
- [28] Pette D, Staron RS (1990): Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 116, 1-76
- [29] Pette D, Staron RS (2000): Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech.* 50, 500-509
- [30] Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE (2000): The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 101(3), 336-344
- [31] Rossi AM, Eppenberger HM, Volpe P, Cotrufo R, Wallimann T (1990): Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Bio Chem* 265, 5258-5266
- [32] Rossi MA, Carillo SV (1991): Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: distinctly different biological phenomena?. *Int J Cardiol* 31(2), 133-141
- [33] Saks VA, Ventura-Clapier R, Khuchua ZA, Preobrazhensky AN, Emelin IV (1984): Creatine kinase in regulation of heart function and metabolism 1. Further evidence for compartmentation of adenine nucleotides in cardiac myofibrillar and sarcolemmal coupled ATPase-creatine kinase systems. *Biochem Biophys Acta* 803, 254-264
- [34] Saupe KW, Spindler M, Tian R, Ingwall JS (1998): Impaired cardiac energetics in mice lacking muscle-specific isoenzymes of creatine kinase. *Circ Res* 82(8), 898-907

- [35] Simko F (2002): Physiologic and pathologic myocardial hypertrophy--physiologic and pathologic regression of hypertrophy?. *Med Hypotheses* 58(1),11-14
- [36] Spindler M, Niebler R, Remkes H, Horn M, Lanz T, Neubauer S (2002): Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H680-H687
- [37] Steeghs K, Benders A, Oerlemans F, Haan A de, Heerschap A, Ruitenbeek W, Jost C, Deursen J van, Perryman B, Pette D, Bruckwilder M, Koudijs J, Jap P, Veerkamp J, Wieringa B (1997): Altered Ca²⁺ responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Cell* 89, 93-103
- [38] Steeghs K, Heerschap A, Haan A de, Ruitenbeek W, Oerlemans F, Deursen J van, Perryman B, Pette D, Bruckwilder M, Koudijs J, Jap P, Wieringa B (1997): Use of gene targeting for compromising energy homeostasis in neuro-muscular tissues: the role of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Neurosci Methods* 71(1), 29-41
- [39] Steeghs K, Oerlemans F, Haan A de, Heerschap A, Verdoodt L, Bie M de, Ruitenbeek W, Benders A, Jost C, Deursen J van, Tullson P, Terjung R, Jap P, Jacob W, Pette D, Wieringa B (1998): Cytoarchitectural and metabolic adaptations in muscles with mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Mol Cell Biochem* 184(1-2),183-94
- [40] Stolz M, Wallimann T (1998): Myofibrillar interaction of cytosolic creatine kinase (CK) isoenzymes: allocation of N-terminal binding epitope in MM-CK and BB-CK. *J Cell Sci* 111, 1207-1216
- [41] Sutherland FJ, Hearse DJ (2000): The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* 41(6): 613-627

- [42] Trappe S, Harber M, Creer A, Gallagher P, Slivka D, Minchev K, Whitsett D (2006): Single muscle fiber adaptations with marathon training. *J Appl Physiol* 101(3), 721-727
- [43] Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, Deursen J van, Wieringa B, Ventura-Clapier R (1995): Muscle creatine kinase-deficient mice. 2. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaption on the mitochondrial funktion. *J Biol Chem* 270, 19921-19929
- [44] Ventura-Clapier R, Kaasik A, Veksler V (2004): Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency. *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2), 29-41
- [45] Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, d'Albis A, Deursen J van, Wieringa B, Veksler VI (1995): Muscle creatine kinase-deficient mice. 1. Alterations in myofibrillar function. *J Biol Chem* 270, 19914-19920
- [46] Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anflous K (1998): Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem*. 184(1-2), 231-247
- [47] Ventura-Clapier R, Veksler V, Hoerter JA (1994): Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Mol Cell Biochem* 133, 125-144
- [48] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992): Intracellular compartmentation, structure and function of creatin kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands – the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281, 21-40
- [49] Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T (1992): Mitochondrial creatine kinase – a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1102, 119-166

- [50] Yamashita K, Yoshioka T (1991): Profiles of creatine kinase isoenzyme compositions in single muscle fibres of different types. *J Muscle Res Cell Motil* 12(1), 37-44
- [51] Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, Xiao RP (2000): Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H429-H436

Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Maier für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung während der gesamten Zeit, die zahlreichen Anregungen, sowie für die zur Verfügung gestellten Arbeitsmittel.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Alexander Maass für die hervorragende Betreuung, die konstruktive Kritik und die ständigen Ermutigungen. Vielen Dank, dass sich daran auch nach dem Umzug nach Groningen nichts geändert hat.

Frau Jenny Muck, Herrn Marco Abesser und Herrn Dr. med. Christoph Zechner danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Einarbeitung im Labor und die tatkräftige Mithilfe bei der Durchführung der Experimente, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ganz besonders hervorheben möchte ich das angenehme Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund Martin für die Unterstützung während allen Phasen der Arbeit. Ohne Eure Hilfe und Eure unermüdlichen Ermunterungen wäre diese Arbeit wahrscheinlich noch nicht fertig.