

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

Die Rolle der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase im Herzen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Martin Benedikt Link

aus München

Würzburg, April 2011

Referent: Prof. Dr. O. Ritter - Medizinische Klinik und Poliklinik I

Koreferent: Prof. Dr. K. Schuh - Lehrstuhl für Physiologie I

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2011

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) | 1 |
| 1.1.1 Genlokalisierung und -aufbau | 1 |
| 1.1.2 Proteinstruktur | 1 |
| 1.1.3 Lokalisation innerhalb der Zelle | 1 |
| 1.1.4 Regulation der nNOS-Aktivität | 2 |
| 1.1.5 Reaktionsformen | 2 |
| 1.1.6 Intrazelluläre Signalwege | 3 |
| 1.1.7 Myokardiale Kontraktilität | 3 |
| 1.1.8 Myokardialer Sauerstoffverbrauch (MVO_2) | 3 |
| 1.1.9 Mitochondriale Atmungskette | 4 |
| 1.1.10 Klinische Bedeutung | 4 |
| 1.2 Fragestellung | 4 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 5 |
| 2.1 Kraft- und Sauerstoffmessung | 5 |
| 2.1.1 Versuchstiere | 5 |
| 2.1.2 Lösungen | 5 |
| 2.1.3 Präparation | 6 |
| 2.1.4 Versuchsaufbau | 6 |
| 2.1.5 Versuchsvorbereitung | 8 |
| 2.1.6 Versuchsprotokoll | 9 |
| 2.1.7 Schlagkraft und geleistete Arbeit | 9 |
| 2.1.8 Sauerstoffverbrauch | 10 |
| 2.1.8.1 Clarksche Sonde | 10 |
| 2.1.8.2 Rühreffekt | 11 |
| 2.1.8.3 Messvorgang und Datenauswertung | 12 |
| 2.1.9 Pharmaka | 12 |
| 2.2 Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität | 13 |
| 2.2.1 Versuchstiere | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.2 Tiermodell | 13 |
| 2.2.3 Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität | 14 |
| 2.2.4 Versuchsdurchführung | 14 |
| 2.3 Statistik | 15 |
| 3. Ergebnisse | 16 |
| 3.1 Kraftamplitude | 16 |
| 3.2 Kraft-Zeit-Integral | 17 |
| 3.3 Sauerstoffverbrauch des schlagenden Muskelstreifens | 18 |
| 3.4 Sauerstoffverbrauch des ruhenden Muskelstreifens | 19 |
| 3.5 Sauerstoffverbrauch bezogen auf das Kraft-Zeit-Integral | 20 |
| 3.6 Cytochrom c-Oxidase-Aktivität | 21 |
| 4. Diskussion | 22 |
| 4.1 Myokardiale Kontraktilität | 23 |
| 4.1.1 Unspezifische Hemmung der NO-Synthasen | 23 |
| 4.1.2 Neuronale NO-Synthase | 24 |
| 4.2 Myokardialer Sauerstoffverbrauch | 25 |
| 4.2.1 Unspezifische Hemmung der NO-Synthasen | 25 |
| 4.2.2 Neuronale NO-Synthase | 26 |
| 4.3 Myokardiale Ökonomie | 27 |
| 4.3.1 Unspezifische Hemmung der NO-Synthasen | 27 |
| 4.3.2 Neuronale NO-Synthase | 27 |
| 4.4 Cytochrom c-Oxidase | 28 |
| 4.5 Synthese | 29 |
| 5. Zusammenfassung | 32 |
| 6. Literatur | 33 |

1. Einleitung

Der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Regulation der kardialen Funktion ist seit circa 15 Jahren Gegenstand intensiver Forschung^{1,2}. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid die Kontraktilität, den Sauerstoffverbrauch und die Reaktion des Herzens auf adrenerge Stimulation beeinflusst³. Mit wachsender Erkenntnis um die immense Bedeutung von NO für die Steuerung der Herzfunktion wuchs auch das Interesse an den Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), von denen bis heute drei Isoformen bekannt sind: die neuronale (nNOS), die induzierbare (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS)⁴. Während die nNOS und die eNOS im Myokard konstitutiv exprimiert werden, wird die iNOS durch Entzündungsprozesse induziert.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die neuronale NO-Synthase und ihren Einfluss auf die Kontraktilität, den Sauerstoffverbrauch und die Ökonomie des Herzens.

1.1 Die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS)

1.1.1 Genlokalisierung und -aufbau

Das humane nNOS-Gen befindet sich auf Bande 24 des langen Arms von Chromosom 12 (12q24)^{5,6}. Bei der Maus ist ein homologes Gen auf Chromosom 5 zu finden⁷. Mit 29 Exons und 28 Introns, verteilt über 200 kb, ist das nNOS-Gen äußerst komplex aufgebaut.

1.1.2 Proteinstruktur

Die aktive Form der neuronalen NO-Synthase ist ein Tetramer bestehend aus zwei nNOS-Monomeren und zwei Calmodulin-Molekülen. Hinzu kommen die Cofaktoren 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄), FAD, FMN und Häm⁴.

1.1.3 Lokalisation innerhalb der Zelle

In Kardiomyozyten wurde die neuronale NO-Synthase am Sarkolemm⁸⁻¹¹, an der SERCA2a (Sarko(Endo)plasmatische Retikulum Calcium ATPase) des

sarkoplasmatischen Retikulum¹⁰⁻¹³ und an der inneren Mitochondrienmembran^{14,15} gefunden. Bei nNOS-überexprimierenden Mäusen gelang der gekoppelte Nachweis der nNOS und L-Typ-Kalziumkanälen¹⁰. Zudem konnte bei Ratten nach Induktion eines Myokardinfarkts eine Translokation der neuronalen NO-Synthase vom sarkoplasmatischen Retikulum zum Sarkolemm nachgewiesen werden¹¹.

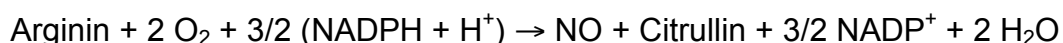
1.1.4 Regulation der nNOS-Aktivität

Die Aktivität der neuronalen NO-Synthase wird über die Beeinflussung der Gen-Expression^{16,17}, durch posttranskriptionale Modifikation¹⁸⁻²⁰ und mittels posttranslationaler Veränderungen¹⁵ reguliert. Phosphorylierungen²¹ und freie Radikale wie H₂O₂, NO⁻ und ONOO⁻, welche auch potentielle Produkte der nNOS²² sind, reduzieren die Aktivität des Enzyms. Des Weiteren spielen Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der nNOS-Aktivität. So hemmt Caveolin-1 die neuronale NO-Synthase²³, wohingegen Caveolin-3 die nNOS-Aktivität bei Ratten mit Herzinsuffizienz²⁴ oder nach induziertem Myokardinfarkt¹¹ steigert.

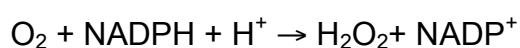
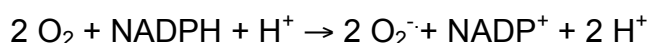
1.1.5 Reaktionsformen

Man unterscheidet eine gekoppelte und eine ungekoppelte Reaktionsform der neuronalen NO-Synthase. Bei der gekoppelten Reaktion werden alle Elektronen von NADPH für die Produktion von Citrullin, NO und H₂O verwendet, während es bei der ungekoppelten Form unter Bildung von Superoxid-Anionen und anderer reaktiver Sauerstoffspezies zu einer direkten Übertragung der Elektronen auf O₂ kommt.

Die Reaktionsgleichung für die gekoppelte Form lautet:



Für die ungekoppelten Reaktionen gilt:



Das Verhältnis von gekoppelter zu ungekoppelter Reaktion ist abhängig vom verfügbaren Substrat und den Cofaktoren^{4,25,26}.

1.1.6 Intrazelluläre Signalwege

Über welche intrazellulären Signalwege die neuronale NO-Synthase Einfluss auf die Zellfunktion nimmt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Es ist bekannt, dass NO die lösliche Guanylat-Zyklase aktiviert und so zu erhöhten cGMP-Spiegeln führt. cGMP kann die Kontraktilität von Kardiomyozyten je nach Konzentration steigern oder abschwächen. Dies geschieht entweder über eine Modulation der cAMP-Phosphodiesterase und somit der cAMP-Spiegel oder über die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG)²⁷.

Stickstoffmonoxid kann jedoch auch direkt mit reaktiven Thiolen vieler Proteine reagieren und so ihre Funktion verändern. Gezeigt wurde, dass über eine S-Nitrosylierung die Offenwahrscheinlichkeit von Ryanodinrezeptoren erhöht wird²⁸⁻³⁰ und L-Typ-Kalziumkanäle inhibiert^{31,32} werden können. In welchem Verhältnis die Aktivierung der löslichen Guanylat-Zyklase und die S-Nitrosylierung Einfluss auf die myokardiale Funktion haben, bleibt offen.

1.1.7 Myokardiale Kontraktilität

Über den Einfluss der neuronalen NO-Synthase auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten herrscht in der Literatur nach wie vor keine Einigkeit^{3,27}. So findet sich in der Literatur sowohl eine Reduktion^{10,33,34} als auch eine Verstärkung^{35,36} der kardialen Schlagkraft durch die nNOS. Keine Veränderungen der myokardialen Kontraktilität zeigten Barouch et al. und Khan et al.^{30,37}.

1.1.8 Myokardialer Sauerstoffverbrauch (MVO₂)

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass NO in vitro wie auch in vivo den myokardialen Sauerstoffverbrauch senkt³⁸⁻⁴¹. Die bedeutendste NO-Quelle soll hierbei die endotheliale NO-Synthase sein^{40,42}. Aber auch nNOS scheint bei der Reduktion des MVO₂ eine Rolle zu spielen. So konnte beobachtet werden,

dass eine homozygote nNOS-Deletion das Absinken des myokardialen Sauerstoffverbrauchs durch eNOS abschwächt⁴³.

1.1.9 Mitochondriale Atmungskette

Die Art und Weise wie die neuronale NO-Synthase den myokardialen Sauerstoffverbrauch beeinflusst, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Eine mögliche Erklärung liefert die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch Stickstoffmonoxid. Inwieweit die in den Mitochondrien lokalisierte nNOS^{14,15,44} die Atmungskette beeinflusst, ist umstritten⁴⁵⁻⁴⁸.

1.1.10 Klinische Bedeutung

Unbestritten ist mittlerweile, dass Stickstoffmonoxid und damit auch die NO-Synthasen eine wichtige schützende Rolle bei Schädigung des Herzens spielen⁴⁹. Neben der endothelialen und der induzierbaren NOS scheint dabei auch die neuronale Isoform von Bedeutung zu sein. So konnte gezeigt werden, dass nNOS-Deletion zu verstärktem Remodeling und Funktionsverlust sowie zu erhöhter Mortalität nach Myokardinfarkt führt^{50,51}. Eine nNOS-Überexpression kann hingegen bei Druckbelastung die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verzögern³⁵ und zudem Ischämie-/Reperfusionsschäden abmildern⁵². Die ursächlichen Mechanismen dieser Beobachtungen und ihre relative Bedeutung sind nicht abschließend geklärt.

1.2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand muriner Herzmuskelstreifen, die Bedeutung der neuronalen NO-Synthase für die myokardiale Kontraktilität und den myokardialen Sauerstoffverbrauch und damit auch für die Ökonomie des Herzschlags zu analysieren. Des Weiteren soll der Einfluss der nNOS auf die mitochondriale Atmungskette, als mögliche Ursache für einen veränderten myokardialen Sauerstoffverbrauch, untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Kraft- und Sauerstoffmessung

2.1.1 Versuchstiere

Zur Verwendung kamen 8 bis 12 Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse aus den Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland).

Alle Tierversuche wurden von der Reg. V. Unterfranken genehmigt (Az: 55.2-2531.01-60/09).

2.1.2 Lösungen

Es kamen eine Präparier- und eine Versuchslösung zum Einsatz. Beide Lösungen basierten auf der Standardlösung nach Krebs-Henseleit und wurden ständig mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Abweichend von der Standardlösung hatte die Präparierlösung eine niedrigere Kalziumkonzentration, enthielt 2,3-Butandion Monoxim (BDM) und war auf 4°C gekühlt, um das Myokard während der Präparation zu schonen. Die Kalziumkonzentration der 37°C warmen Versuchslösung wurde auf 2,25 mM erhöht, da die Muskelstreifen unter diesen Bedingungen kräftiger und stabiler schlugen. Die genaue Zusammensetzung der Lösungen findet sich in Tabelle 1.

| Inhaltsstoff | Einheit | Präparierlösung | Versuchslösung |
|---|---------|---|---|
| NaCl | mM | 116,1 | 116,1 |
| KCl | mM | 5,0 | 5,0 |
| MgCl ₂ (6 H ₂ O) | mM | 1,2 | 1,2 |
| Na ₂ O ₄ | mM | 1,2 | 1,2 |
| NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O) | mM | 2,0 | 2,0 |
| NaHCO ₃ | mM | 18,0 | 18,0 |
| Glucose | mM | 11,2 | 11,2 |
| CaCl ₂ | mM | 0,25 | 2,25 |
| BDM | mM | 29,7 | |
| Begasung | | 95% O ₂ , 5% CO ₂ | 95% O ₂ , 5% CO ₂ |
| Temperatur | °C | 4 | 37 |

Tabelle 1: Zusammensetzung der Präparier- und Versuchslösung

Alle verwendeten Chemikalien stammten von Sigma-Aldrich (München, Deutschland).

2.1.3 Präparation

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und auf dem Rücken liegend fixiert. Nach rechtsparasternaler Eröffnung des Thorax zur Vermeidung von Verletzungen des Herzens und anschließender Spreizung des Thorax' wurde das so zur Darstellung gebrachte, schlagende Herz mittels Pinzette im Bereich der aufsteigenden Aorta fixiert und mit Hilfe einer kleinen Schere vorsichtig von der Umgebung gelöst. Daraufhin erfolgte der rasche Transfer in eine mit Präparierlösung gefüllte Styroporschale, in der im Anschluss Lungen- und Thymusreste sowie die beiden Vorhöfe entfernt wurden. Es folgte die Spülung der beiden Ventrikel mittels einer durch die atrioventrikulären Klappen eingeführten Kanüle, um Thrombenbildung in den Kammern zu vermeiden. In einer zweiten Schale mit frischer Präparierlösung wurden sorgfältig noch übrig gebliebene Vorhofreste entfernt und das Herz dann mit Hilfe einer Pinzette am interventrikulären Septum fixiert. Nach Weitung der Trikuspidalklappe und Entfernung von intraventrikulären Sehnenfäden erfolgte ein Schnitt ausgehend von der Trikuspidal- hin zur Pulmonalklappe. Die so aus dem rechten Ventrikel entstandene Tasche wurde durch einen Schnitt längs der Herzachse von der Klappenebene zur Herzspitze in zwei gleich große Lappen geteilt. Nun wurden parallel zu diesem teilenden Schnitt aus beiden Lappen mit größter Behutsamkeit insgesamt drei bis fünf Myokardstreifen mit einer Breite von etwa 700 µm und einer Länge von circa 4 mm herausgeschnitten und bis zur Verwendung in einem mit Präparierlösung gefüllten Becherglas aufbewahrt.

2.1.4 Versuchsaufbau

Zur Untersuchung der Herzmuskelstreifen kam ein Muscle Research System der Firma Scientific Instruments (Heidelberg, Deutschland) zum Einsatz (siehe Abb. 1). Hierbei handelt es sich um eine zylindrische Kammer, in welcher der mittels zweier feiner Klemmen befestigte Muskelstreifen von Versuchslösung umspült wird. Eine der beiden Klemmen ist mit einem Kraftaufnehmer

verbunden, die andere ist an einer Mikrometerschraube befestigt, durch welche die Dehnung des Streifens variiert werden kann. Da die Konstanz der Kammertemperatur für die Messung des Sauerstoffverbrauchs von großer Bedeutung ist, befindet sich die Kammer in einem beheizbaren Metallblock, der für eine konstante Kammertemperatur von 37,0 °C sorgt. Vor Einleitung in das Muscle Research System wird die Versuchslösung (100 ml) in einem Vorratsgefäß auf etwa 45 °C erwärmt und mit Carbogen begast. Die Temperaturdifferenz zwischen Vorratsgefäß und Kammer ist von Nöten, um ein Ausperlen des Gases in der Kammer zu verhindern. Für einen konstanten Fluss der Versuchslösung sorgt eine stufenlos regulierbare Rollenpumpe. Nach Durchfließen der Kammer wird die Versuchslösung abgesaugt und wieder in das Vorratsgefäß eingespeist. Elektrisch stimuliert wird der Streifen über die beiden Halteklemmen. Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs lässt sich durch einen senkrecht zur Kammer stehenden Kanal eine Clarksche Sonde (Scientific Instruments, Heidelberg, Deutschland) mittels Mikrometerschraube bis auf einen definierten Abstand (50 bis 150 µm) an den Muskelstreifen heranführen. Die elektrischen Signale von Kraftaufnehmer und Sauerstoffsonde werden nach Verstärkung mit Hilfe eines Interfaces an einen Computer weitergegeben und durch die Software Muscle (Scientific Instruments, Heidelberg, Deutschland) aufgezeichnet und ausgewertet.

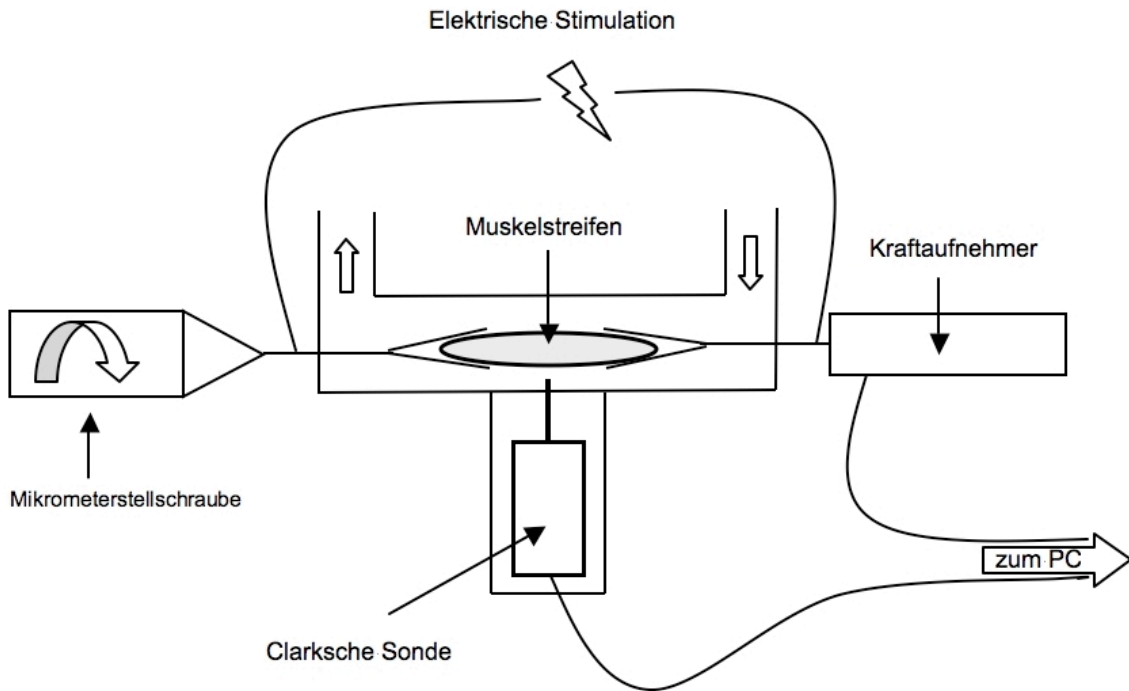


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des Muscle Research Systems (Scientific Instruments, Heidelberg, Deutschland) zur parallelen Messung von Schlagkraft (mittels Kraftaufnehmer) und Sauerstoffverbrauch (per Clarkscher Sonde) von Herzmuskelstreifen. Der mit Versuchslösung umspülte Streifen ist in einer beheizbaren Kammer eingespannt. Die Signale von Clarkscher Sonde und Kraftaufnehmer werden von einem PC aufgezeichnet.

2.1.5 Versuchsvorbereitung

Der Muskelstreifen wurden mit größter Vorsicht unter einem zehnfach verstärkenden Stereomikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) in die beiden Klemmen des Muscle Research Systems eingespannt. Mit Hilfe einer im Okular befindlichen Skalierung wurden Länge und Durchmesser des Präparats gemessen. Anschließend wurde der Muskelstreifen sofort durch eine Rechteckspannung von 3 Volt mit einer Impulsdauer von 10 ms und einer Frequenz von 5 Hz stimuliert. Nach etwa zehnminütigem Auswaschen des BDMs und Anpassung an die Bedingungen in der Kammer wurde der Streifen mittels Mikrometerschraube stufenweise gedehnt und die Stimulationsspannung in Schritten von 0,5 V erhöht, bis die Kraftamplitude ein

Maximum erreichte. Eine Stimulationsspannung von 5 V wurde dabei nicht überschritten, weil sich ansonsten durch Elektrolyse Gasbläschen in der Kammer gebildet hätten. Sodann wurde das Präparat für weitere zehn Minuten bezüglich diastolischer Kraft und Kraftamplitude beobachtet. Zeigte sich Konstanz wurde mit dem Versuch begonnen, anderenfalls der Streifen verworfen.

2.1.6 Versuchsprotokoll

Zu Beginn des Versuchs wurden zeitgleich Sauerstoffverbrauch und Schlagkraft des stimulierten, zuckenden Muskelstreifens gemessen. Daran schloss sich nach einer zweiminütigen Erholungsphase die Messung des Sauerstoffverbrauchs des unstimulierten, ruhenden Muskelstreifens an. Nach diesen „Baseline“-Messungen wurde der Versuchslösung im Vorratsgefäß das jeweilige Pharmakon zugegeben. 30 und 60 Minuten nach Zugabe wurden die Messungen wie bei Versuchsbeginn wiederholt.

2.1.7 Schlagkraft und geleistete Arbeit

Die Software Muscle zeichnet das Signal des Kraftaufnehmers über 20 Sekunden mit einer Auflösung von 100 Datenpunkten pro Sekunde auf. Diese 2000 Werte werden in einer Datei abgelegt, aus der sie durch das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft, USA) importiert werden können. In Excel wurde daraus die Amplitude der Schlagkraft und das Integral der über die Zeit registrierten Kraftamplitude berechnet. Das Kraft-Zeit-Integral (FTI) gilt als Surrogatparameter für die vom Muskelstreifen geleistete Arbeit, da bei isometrischer Kontraktion keine physikalische Arbeit im Sinne des Kraft-Weg-Produkts geleistet wird.

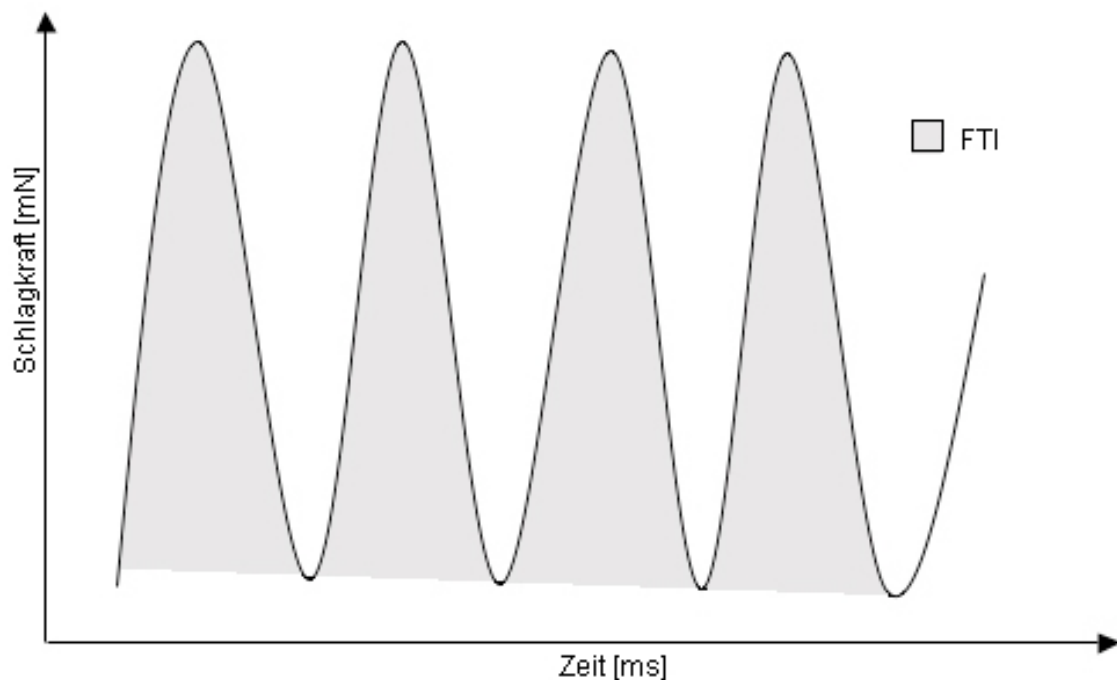


Abb. 2: Das Kraft-Zeit-Integral (FTI), hier grau dargestellt, gilt als Surrogatparameter für die vom Muskelstreifen geleistete Arbeit.

2.1.8 Sauerstoffverbrauch

2.1.8.1 Clarksche Sonde

Parallel zur 20 Sekunden dauernden Messung der Schlagkraft wird der Sauerstoffverbrauch des Muskelstreifens mit Hilfe einer Clarkschen Sonde bestimmt (siehe Abb. 3). Diese besteht aus einem feinen Golddraht in einem Silberröhrchen von 0,8 mm Durchmesser. Golddraht und Silberröhrchen sind durch eine Glaskapillare voneinander isoliert. Glaskapillare und Golddraht überragen das Silberröhrchen an der Spitze um etwa 0,5 mm. Ihre Oberfläche ist mit einer für Sauerstoff semipermeablen Kunststoffmembran überzogen. Der Golddraht fungiert als Kathode, das Silberröhrchen als Anode. Sauerstoff diffundiert konzentrationsabhängig durch die semipermeable Membran und wird am Golddraht zu Wasser reduziert. Am Silberröhrchen wird gleichzeitig Silber oxidiert. Der dabei zwischen Anode und Kathode fließende Strom ist der Sauerstoffkonzentration an der Sondenspitze direkt proportional. Verstärkt und

über ein Interface an einen Computer weitergeleitet wird das Sondensignal von der Software Muscle aufgezeichnet.

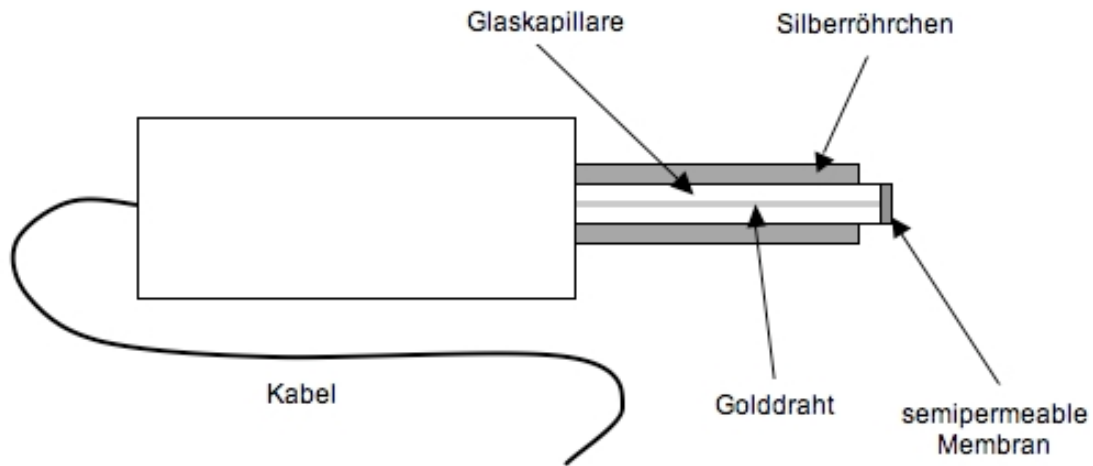


Abb. 3: Schematische Darstellung der zur Messung der Sauerstoffkonzentration verwendeten Clarkschen Sonde.

2.1.8.2 Röhreffekt

Die Clarksche Sonde verbraucht selbst geringe Mengen Sauerstoff. Bei eingeschalteter Perfusion ist die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer aufgrund der ständigen Durchmischung homogen. Wird die Perfusion jedoch gestoppt, kommt es aufgrund des Eigenverbrauchs um die Sondenspitze herum zur Ausbildung eines Konzentrationsgefälles. Erst nach Einstellen dieses Konzentrationsgradienten ist der von der Sonde registrierte Sauerstoffverbrauch alleine dem Muskelstreifen zuzuschreiben. Dieses Phänomen wird als „Röhreffekt“ bezeichnet und muss bei der Auswertung beachtet werden. Dies geschieht anhand des in Muscle dargestellten Kurvenverlaufs durch manuelle Einstellung der Zeit bis zum Beginn des linearen Abfall des Sondensignals (ca. 5 bis 10 s) (siehe Abb. 4).

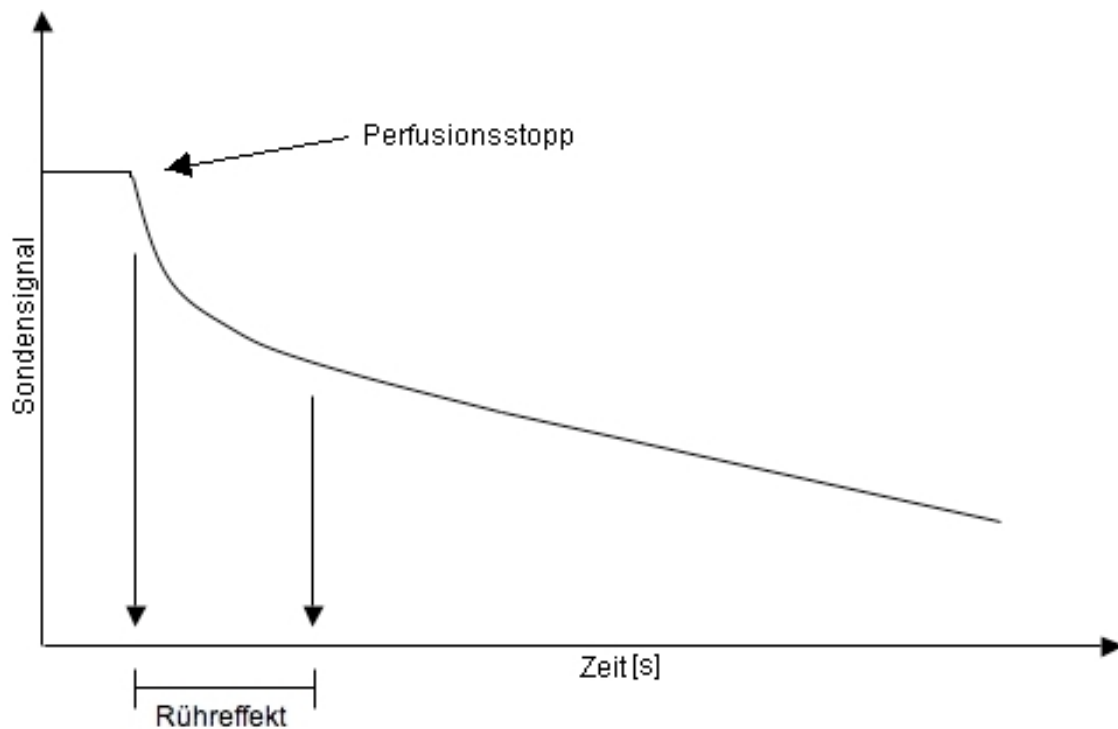


Abb. 4: Nach Abstellen der Perfusion kommt es zum so genannten Rühreffekt. Erst danach kann der Sauerstoffverbrauch des Muskelstreifens gemessen werden.

2.1.8.3 Messvorgang und Datenauswertung

Eine Sauerstoffmessung dauert 20 Sekunden. Während dieser Zeit wird die Perfusion des Muskelstreifens abgestellt und der Abfall der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer von Muscle aufgezeichnet. Muscle vergleicht den gemessenen Konzentrationsabfall unter Berücksichtigung des Streifendurchmessers, des Abstands der Sonde von der Streifenoberfläche, der zuvor gemessenen Sauerstoffkonzentration in der Versuchslösung und des Rühreffekts mit vorberechneten Modellkurven und ermittelt so den Sauerstoffverbrauch des Muskelstreifens.

2.1.9 Pharmaka

N5-(1-Imino-3-Butenyl)-L-Ornithin (Vinyl-L-NIO) ist ein spezifischer Inhibitor der neuronalen NO-Synthase⁵³. Die gelieferte, kristalline Form (Alexis, Lausen,

Deutschland) wurde in PBS-Puffer gelöst und portioniert bei -20°C eingefroren. Nach den Baseline-Messungen wurde der Versuchslösung im Vorratsgefäß Vinyl-L-NIO-PBS-Lösung zugegeben, sodass sich im Versuchskreislauf eine Vinyl-L-NIO-Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ einstellte.

L-N^G-Nitroargininmethylester (L-NAME) ist ein unspezifischer Inhibitor der NO-Synthasen ⁴. Der Versuchslösung wurde nach den Baseline-Messungen L-NAME (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in kristalliner Form zugegeben, sodass es im Versuchskreislauf zu einer L-NAME-Konzentration von $500\ \mu\text{M}$ kam.

2.2 Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität

2.2.1 Versuchstiere

Es wurden 8 bis 12 Wochen alte nNOS⁺/αMHC-tTA⁺-Mäuse verwendet. Alle Tierversuche wurden von der Reg. V. Unterfranken genehmigt (Az: 55.2-2531.01-60/09).

2.2.2 Tiermodell

Bei den nNOS⁺/αMHC-tTA⁺-Mäusen handelt es sich um ein transgenes Tiermodell. nNOS⁺/αMHC-tTA⁺-Mäuse zeigen eine konstitutionelle kardiale nNOS-Überexpression, die durch tetrazyklinhaltiges Futter unterdrückt werden kann. Hierfür verantwortlich ist der mit dem herzspezifischen αMHC-Promoter verknüpfte tetrazyklinkontrollierte Transaktivator (tTA), der in Abwesenheit eines Tetrazyklins (Doxycyclin) an das tetrazyklin-responsive element (TRE) bindet und so die Transkription des daran gekoppelten nNOSα-Gens fördert. Werden die Tiere mit tetrazyklinhaltigem Futter gefüttert, so wird die Bindung des tTAs an das TRE blockiert und eine nNOS-Überexpression bleibt aus.

Zur Induktion der nNOS-Überexpression bekommen die Tiere 14 Tage vor dem Versuch Normalfutter. Die Tiere der Kontrollgruppe bekommen weiter Doxycyclinfutter.

Burkard et al. konnten nachweisen, dass die hier verwendeten nNOS⁺/αMHC-tTA⁺-Mäusen nach Induktion die neuronale NO-Synthase herzspezifisch überexprimieren und die Herzmuskelzellen dieser Tiere eine erhöhte nNOS-Aktivität aufweisen¹⁰.

2.2.3 Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität wurde das MitoProfile® Rapid Microplate Assay Kit zur Bestimmung der Komplex IV-Aktivität bei Mäusen (MitoScience, Eugene, USA) verwendet. Herzstück des Kits sind Kunststoffstreifen in deren Vertiefungen monoklonale Antikörper gegen Komplex IV der Atmungskette (Cytochrom c-Oxidase) gebunden sind. Diese Antikörper fixieren den in der Probelösung enthaltenen Komplex IV ohne seine Funktion zu beeinträchtigen. Gibt man nun ebenfalls im Kit enthaltenes, reduziertes Cytochrom c auf die Streifen, so wird dieses vom fixierten Komplex IV oxidiert. Colorimetrisch lässt sich über die dabei abfallende Absorption bei 550 nm die Cytochrom c-Oxidase-Aktivität bestimmen.

2.2.4 Versuchsdurchführung

Die Tiere wurden durch CO₂-Inhalation getötet und die Herzen nach sofortiger Entnahme und Spülung mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS-Lösung, pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Homogenisierung der gefrorenen Herzen in RIPA-Puffer (PBS, 1% Igepal CA-630, 0,5% Natriumdeoxycholate (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)) mittels Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden sie anschließend bei 4°C 15 Minuten lang mit 15000 g zentrifugiert. Mittels Absorptionsmessung bei 280 nm wurde die absolute Proteinkonzentration im Überstand bestimmt und dieser dann mit der Pufferlösung des MitoProfile-Kits auf 5 mg/ml verdünnt. Dem Assay-Protokoll folgend wurde der Probe mitgeliefertes Kit-Detergenz (1/10 des Probenvolumens) zugesetzt, die Probe nach sofortigem Mischen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 16000 g 20 Minuten lang zentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µl mit 150 µl Kit-Pufferlösung verdünnt und in eine

der antikörperbeschichteten Vertiefungen des Kunststoffstreifens gegeben. Es folgte eine 3-stündige Inkubation der Streifen bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen des Streifens mit Kit-Pufferlösung wurde in jede seiner Vertiefungen 200 µl der Cytochrom c-Lösung gegeben und rasch die Aufzeichnung mit dem Spectrophotometer (Tecan Spectra, Männerdorf, Schweiz) begonnen. Dieses war auf eine Wellenlänge von 550 nm und eine Versuchstemperatur von 30°C eingestellt. Gemessen wurde jede Minute über eine Dauer von 120 Minuten.

2.3 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) angegeben.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Excel „add-in“ WinSTAT (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Deutschland).

Verbundene Daten wurden mittels Wilcoxon Test, unverbundene mittels Mann-Whitney-U-test untersucht. Wiederholte Messungen am gleichen Präparat wurden durch Varianzanalyse (ANOVA for repeated measurements) verglichen. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Kraftamplitude

Die Kraftamplitude nach 30 Minuten Versuchsdauer zeigte bezogen auf die Werte zu Versuchsbeginn einen relativen Abfall auf $86,7 \pm 3,2\%$ in der Kontrollgruppe, $79,6 \pm 2,4\%$ (n = 12) in der Vinyl-L-NIO-Gruppe (n = 9) und $87,3 \pm 6,7\%$ in der L-NAME-Gruppe (n = 7).

Nach weiteren 30 Minuten konnte ein Abfall auf $68,5 \pm 3,5\%$ in der Kontrollgruppe (n = 12), $59,2 \pm 2,7\%$ in der Vinyl-L-NIO-Gruppe (n = 9) und $72,6 \pm 4,8\%$ in der L-NAME-Gruppe (n = 7) gemessen werden.

Statistisch signifikant unterschieden sich die Vinyl-L-NIO-Gruppe und die L-NAME-Gruppe 60 Minuten nach Versuchsbeginn ($p < 0,05$). Zur Kontrollgruppe unterschieden sich beide Behandlungsgruppen jedoch nicht.

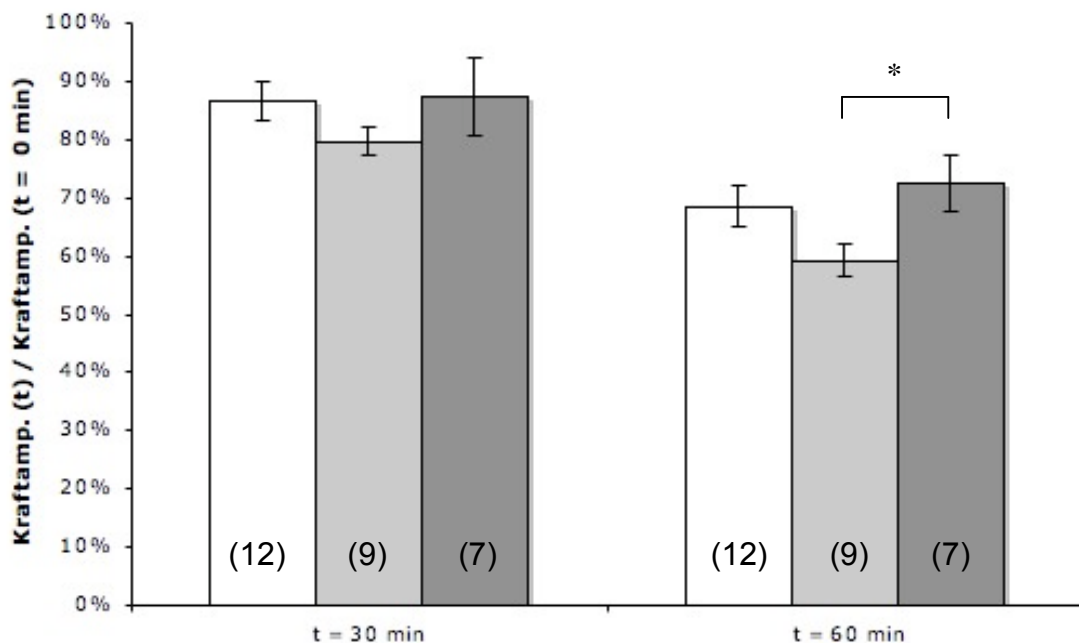


Abb. 5: Kraftamplitude der Herzmuskelstreifen 30 bzw. 60 Minuten nach Versuchsbeginn bezogen auf die Kraftamplitude zu Versuchsbeginn; □ Kontrollgruppe, ■ Vinyl-L-NIO-Gruppe und ■ L-NAME-Gruppe

3.2 Kraft-Zeit-Integral

Das Kraft-Zeit-Integral (FTI) als Maß für die geleistete Arbeit der Herzmuskelstreifen war 30 Minuten nach Versuchsbeginn in der Kontrollgruppe (n = 12) auf $82,0 \pm 2,2\%$, in der Vinyl-L-NIO-Gruppe (n = 9) auf $77,6 \pm 1,7\%$ und in der L-NAME-Gruppe (n = 7) auf $83,0 \pm 5,6\%$ gefallen.

Nach 60 Minuten zeigte sich ein Abfall auf $68,4 \pm 2,3\%$ in der Kontrollgruppe (n = 12), $60,7 \pm 2,4\%$ in der Vinyl-L-NIO-Gruppe (n = 9) und $73,0 \pm 4,6\%$ in der L-NAME-Gruppe (n = 7).

Das FTI der Vinyl-L-NIO-Gruppe war 60 Minuten nach Versuchsbeginn signifikant stärker reduziert als in den beiden anderen Gruppen ($p < 0,05$).

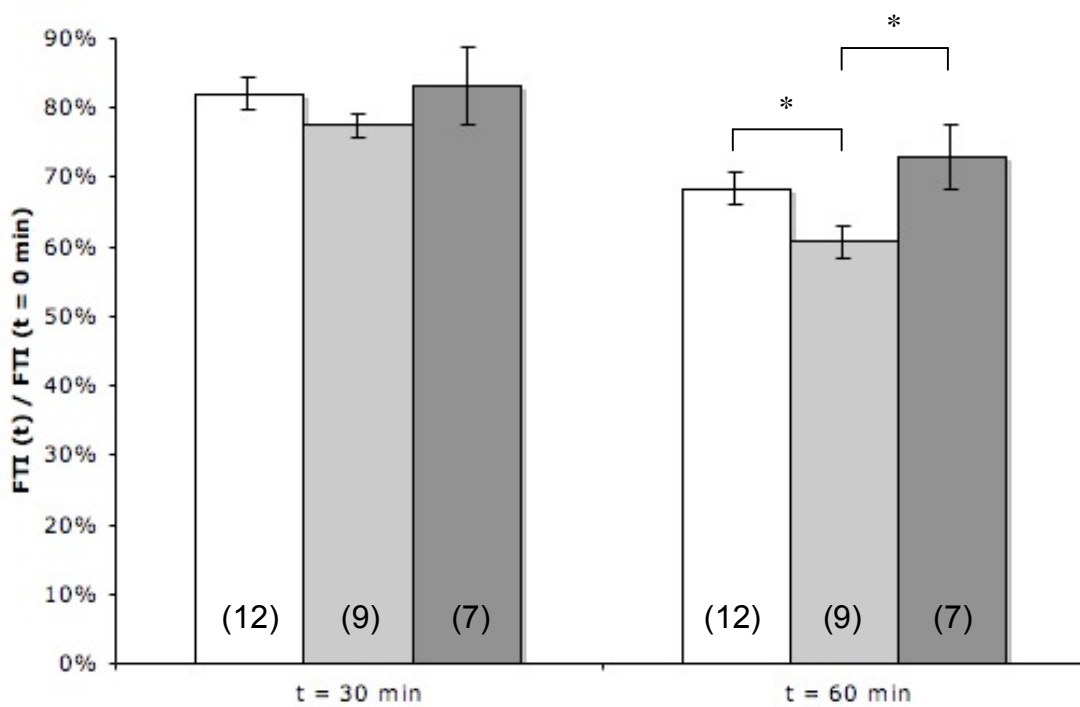


Abb. 6: FTI der Herzmuskelstreifen 30 bzw. 60 Minuten nach Versuchsbeginn bezogen auf das FTI zu Versuchsbeginn; □ Kontrollgruppe, ■ Vinyl-L-NIO-Gruppe und ■ L-NAME-Gruppe

3.3 Sauerstoffverbrauch des schlagenden Muskelstreifens

Der Sauerstoffverbrauch (MVO_2) des schlagenden Muskelstreifen war nach 30 Minuten in der Kontrollgruppe ($n = 12$) auf $93,3 \pm 2,9\%$ und in der L-NAME-Gruppe ($n = 7$) auf $92,7 \pm 5,8\%$ gesunken. In der Vinyl-L-NIO-Gruppe ($n = 9$) blieb MVO_2 bei $99,8 \pm 2,9\%$ konstant.

60 Minuten nach Versuchsbeginn konnte in der Kontrollgruppe ($n = 12$) ein Abfall auf $92,4 \pm 3,3\%$ und in der L-NAME-Gruppe ($n = 7$) eine Reduktion auf $88,3 \pm 8,5\%$ beobachtet werden. In der Vinyl-L-NIO-Gruppe ($n = 9$) stieg der Sauerstoffverbrauch leicht auf $103,8 \pm 4,9\%$.

Signifikant unterschied sich der Sauerstoffverbrauch des schlagenden Muskelstreifens nur zwischen Vinyl-L-NIO- und L-NAME-Gruppe 60 Minuten nach Versuchsbeginn ($p < 0,05$). Es bestand allerdings zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

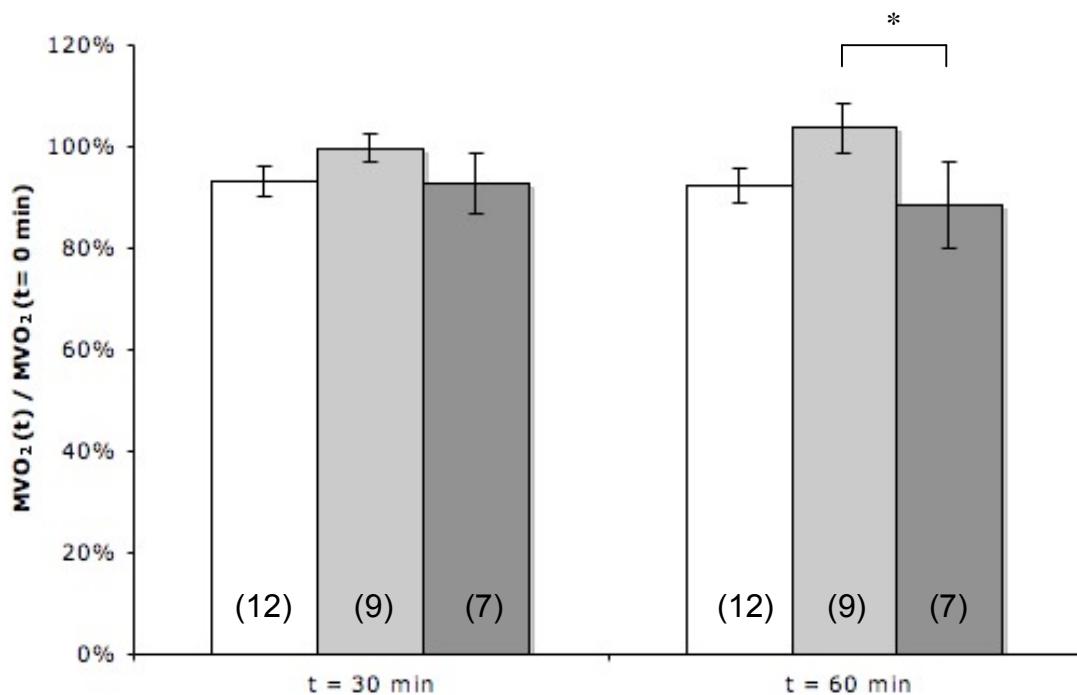


Abb. 7: MVO_2 des schlagenden Herzmuskelstreifen 30 bzw. 60 Minuten nach Versuchsbeginn bezogen auf den MVO_2 zu Versuchsbeginn; □ Kontrollgruppe, ■ Vinyl-L-NIO-Gruppe und ■ L-NAME-Gruppe

3.4 Sauerstoffverbrauch des ruhenden Muskelstreifens

Bei nicht stimuliertem, ruhendem Muskelstreifen sank der Sauerstoffverbrauch während der ersten 30 Minuten in der Kontrollgruppe (n = 12) auf $93,3 \pm 1,7\%$ und in der L-NAME-Gruppe (n = 7) auf $95,9 \pm 9,1\%$, wohingegen er in der Vinyl-L-NIO-Gruppe (n = 9) auf $103,1 \pm 2,9\%$ leicht anstieg.

Nach 60 Minuten war ein Abfall auf $92,7 \pm 2,9\%$ in der Kontrollgruppe (n = 12) und $95,6 \pm 11,6\%$ in der L-NAME-Gruppe (n = 7) zu registrieren. In der Vinyl-L-NIO-Gruppe (n = 9) stieg der MVO_2 in Ruhe hingegen auf $106,2 \pm 5,0\%$.

Der Sauerstoffverbrauch der unstimulierten Muskelstreifen der Vinyl-L-NIO-Gruppe unterschied sich signifikant von dem der unbehandelten Kontrollgruppe sowohl nach 30 als auch nach 60 Minuten ($p < 0,05$).

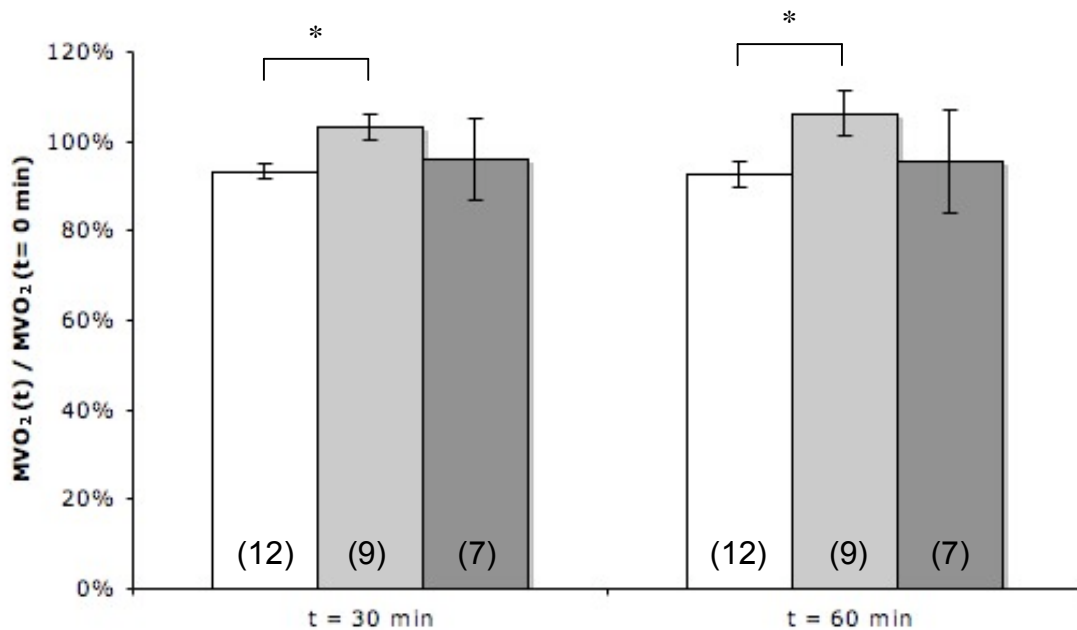


Abb. 8: MVO_2 des ruhenden Herzmuskelstreifen 30 bzw. 60 Minuten nach Versuchsbeginn bezogen auf den MVO_2 zu Versuchsbeginn; □ Kontrollgruppe, ■ Vinyl-L-NIO-Gruppe und ■ L-NAME-Gruppe

3.5 Sauerstoffverbrauch bezogen auf das Kraft-Zeit-Integral

Der Sauerstoffverbrauch (MVO_2) des schlagenden Muskelstreifens bezogen auf die von ihm geleistete Arbeit bzw. das als Surrogatparameter dienende Kraft-Zeit-Integral (FTI) stieg nach 30 Minuten auf $114,4 \pm 3,9\%$ in der Kontrollgruppe ($n = 12$), $129,5 \pm 5,4\%$ in der Vinyl-L-NIO-Gruppe ($n = 9$) und $115,5 \pm 10,7\%$ in der L-NAME-Gruppe ($n = 7$).

60 Minuten nach Versuchsbeginn war MVO_2/FTI in der Kontrollgruppe ($n = 12$) auf $136,5 \pm 6,1\%$, in der Vinyl-L-NIO-Gruppe ($n = 9$) auf $172,8 \pm 9,6\%$ und in der L-Name-Gruppe ($n = 7$) auf $125,2 \pm 14,7\%$ angestiegen.

Damit war MVO_2/FTI nach 60 Minuten in der Vinyl-L-NIO-Gruppe signifikant stärker angestiegen als in der Kontroll- und L-NAME-Gruppe ($p < 0,05$).

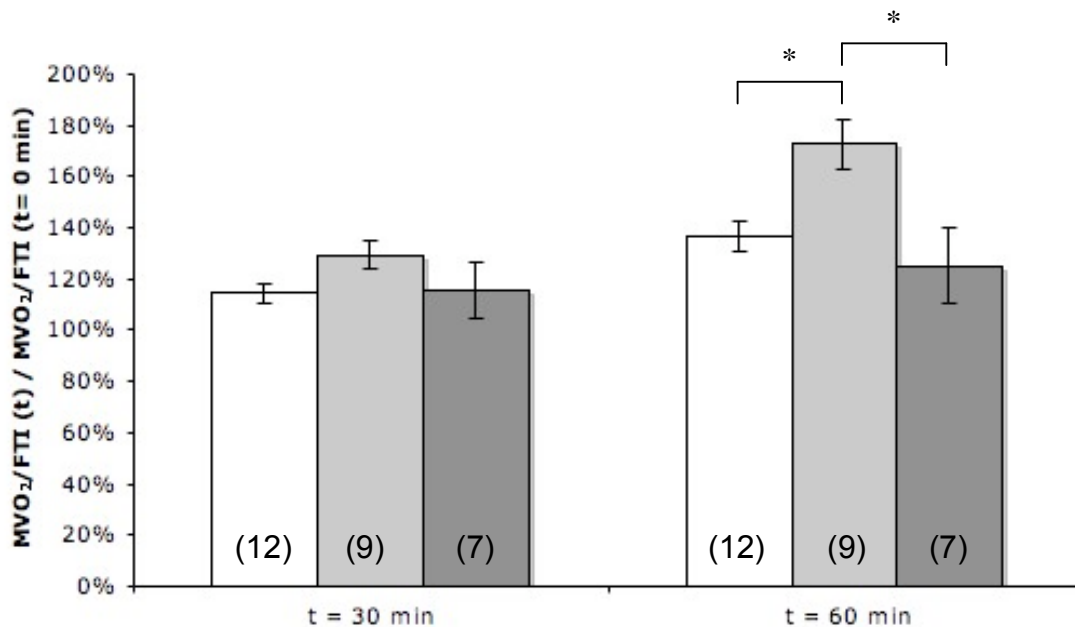


Abb. 9: MVO_2/FTI des ruhenden Herzmuskelstreifen 30 bzw. 60 Minuten nach Versuchsbeginn bezogen auf MVO_2/FTI zu Versuchsbeginn; □ Kontrollgruppe, ■ Vinyl-L-NIO-Gruppe und ■ L-NAME-Gruppe

3.6 Cytochrom c-Oxidase-Aktivität

nNOS-Überexpression reduzierte die Cytochrom c-Oxidase-Aktivität signifikant. ($0,26 \pm 0,011$ optische Dichte/min in nNOS überexprimierenden nNOS+/ α MHC-tTA+ Mäusen gegenüber $0,21 \pm 0,013$ optische Dichte/min in nicht induzierten nNOS+/ α MHC-tTA+ Tieren, $n = 8$, $p < 0,05$)

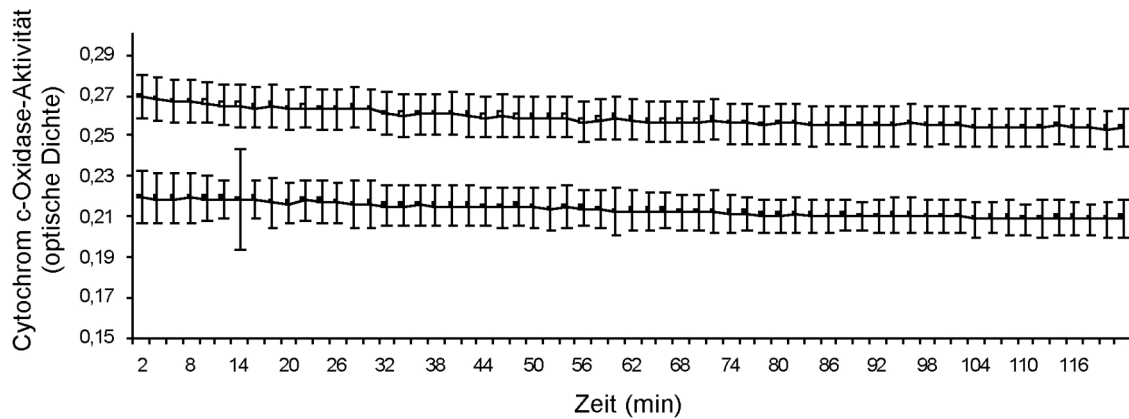


Abb. 10: Cytochrom c-Oxidase-Aktivität bei nNOS-überexprimierenden Tieren

■ versus nicht induzierten Tieren □

4. Diskussion

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Stickstoffmonoxid (NO) sowohl die myokardiale Kontraktilität als auch den myokardialen Sauerstoffverbrauch (MVO_2) beeinflussen kann. Es herrscht in der Literatur jedoch keine Einigkeit darüber, wie diese bedeutenden Parameter der Herzfunktion verändert werden. Diese Diskrepanz wird auf stark divergierende Versuchsbedingungen (Versuchtemperatur, Stimulationsfrequenz und Level der NOS-Expression) zurückgeführt³.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden Versuche an isolierten Herzmuskelstreifen aus dem rechten Ventrikel von Mäusen durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Versuchsbedingungen (Temperatur und Elektrolytkonzentrationen der Versuchslösung, Stimulationsfrequenz und -spannung, etc.) weitgehend frei gewählt und systemische Einflüsse auf die Herzfunktion (Innervation, Hormone, usw.) ausgeschlossen werden können. Des Weiteren besteht die Möglichkeit zur synchronen Messung von Schlagkraft und Sauerstoffverbrauch, was den direkten Bezug der beiden Parameter zueinander ermöglicht. Bei Versuchen mit isolierten Herzmuskelstreifen können zudem pharmakokinetische Veränderungen der zu untersuchenden Substanz ebenso ausgeschlossen werden, wie ein Wechsel des vom Streifen metabolisierten Substrats. Letzteres kann insbesondere die Sauerstoffverbrauchsmessung bedeutend beeinflussen.

Nachteile der hier verwendeten Methode könnten die mechanische Beeinträchtigung und kurze ischämische Phasen des Myokards während der Präparation sein. So wurde gezeigt, dass bereits kurze ischämische Episoden Auswirkungen auf den Kalziummetabolismus und die kontraktile Effizienz des Myokards haben können^{54,55}. Aus diesem Grund wurde auf eine möglichst rasche und äußerst schonende Präparation in gekühlter und oxygenierter BDM-Lösung geachtet. Eine weitere mögliche systemische Fehlerquelle liegt in der auf 2,25 mM erhöhten Kalziumkonzentration der Versuchslösung. Der physiologische Blutspiegel ionisierten Kalziums beträgt bei der Maus ca. 1,35 mM⁵⁶. Die Erhöhung in der Versuchslösung war jedoch von Nöten, um der

Entwicklung von Eigenrhythmen mit erhöhter Schlagfrequenz des Muskelstreifens vorzubeugen. Trotz genannter möglicher Fehlerquellen ist die Methode mit Herzmuskelstreifen von Menschen und Ratten bereits etabliert⁵⁷, weswegen sie in der vorliegenden Arbeit auf Mäuse ausgeweitet wurde.

4.1 Myokardiale Kontraktilität

4.1.1 Unspezifische Hemmung der NO-Synthasen

In der Literatur herrscht keine Einigkeit über die Auswirkung einer unspezifischen Inhibition der NO-Synthasen auf die myokardiale Schlagkraft.

Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche am murinen Herzmuskelstreifen zeigten keinen Einfluss einer unspezifischen NO-Synthasen-Hemmung durch L-NAME auf die Schlagkraft der Streifen (siehe Abb. 5). Dies steht in Einklang mit Klabunde et al., der mit einer Langendorff-Präparation von Rattenherzen keinen Einfluss der unspezifischen NOS-Inhibition mit N^G-Methyl-L-arginin (NMA) auf die Schlagkraft der untersuchten Herzen nachweisen konnte⁵⁸. Balligand et al. bestätigte diese Ergebnisse mit Versuchen an Kardiomyozyten adulter Ratten und dem unspezifischen NOS-Inhibitor N^o-Nitro-L-Arginin⁵⁹. Intrakoronare Injektion von L-NAME am Hund bewirkte bei Versuchen von Keaney et al. ebenfalls keine Veränderung der myokardialen Kontraktilität⁶⁰.

Im Gegensatz zu den oben zitierten Studien, denen der Nachweis einer Veränderung der myokardiale Schlagkraft nicht gelang, registrierte Finkel et al. nach unspezifischer NOS-Inhibition mit N^G-Mono-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) bei isolierten Papillarmuskeln vom Hamster eine positiv inotrope Wirkung⁶¹. Ebenso beobachtete Kaye et al. eine positive Inotropie von L-NMMA bei Myozyten aus dem Rattenventrikel⁶².

Es existieren jedoch auch Studien, die eine Reduktion der myokardialen Schlagkraft durch unspezifische NOS-Inhibition zeigen. Beispielsweise stellte

Kojda et al. in Langendorff-Versuchen an Rattenherzen einen negativ inotropen Effekt von L-NMMA und N^ω-Nitro-L-Arginin⁶³ fest und Cotton et al. zeigte, dass die intrakoronare Injektion von L-NMMA am menschlichen Herzen zu einer Reduktion der Kontraktilität führt⁶⁴.

4.1.2 Neuronale NO-Synthase

Die Studienlage zum Einfluss der neuronalen Isoform der NO-Synthasen auf die myokardiale Schlagkraft ist widersprüchlich.

In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen ließ sich nach spezifischer nNOS-Inhibition mit Vinyl-L-NIO nur eine statistisch nicht signifikante Reduktion der Kontraktionsstärke der isolierten Herzmuskelstreifen nachweisen (siehe Abb. 5). Auch Barouch et al. und Kahn et al. konnten bei nNOS^{-/-}-Mäusen keine signifikante Veränderung der myokardialen Kontraktion durch die neuronale NO-Synthase messen^{30,37}.

Einen negativ inotropen Effekt der neuronalen NO-Synthase auf die myokardiale Schlagkraft wiesen Ashley et al., Sears et al. und Burkard et al. nach. Ashley et al. konnte zeigen, dass Kardiomyozyten von Mäusen mit homozygoter Deletion des nNOS-Gens (nNOS^{-/-}) eine stärkere basale Zellverkürzung aufwiesen als Kardiomyozyten von Kontrolltieren. Er bestätigte diese Beobachtung durch selektive pharmakologische nNOS-Inhibition mit Vinyl-L-NIO bei Herzmuskelzellen von Wildtypen, die gleiche Effekte hervorrief. Bei nNOS^{-/-}-Tieren hingegen bewirkte Vinyl-L-NIO keine weiteren Veränderungen³³. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Sears et al., die zudem echokardiographisch zeigte, dass nNOS^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypwurfgeschwistern eine signifikant höhere linksventrikuläre Auswurfraction aufweisen³⁴. Umgekehrt gelang Burkard et al. bei nNOS-überexprimierenden Mäusen der Nachweis einer verminderten Zellverkürzung¹⁰.

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Studien, die eine nNOS-bedingte Reduktion der myokardialen Schlagkraft zeigen, findet man auch Studien, die zu dem Schluss kommen, dass die neuronale NO-Synthese positiv inotrop wirkt. Loyer et al. beobachtete beispielsweise bei nNOS-überexprimierenden Mäusen in vivo eine moderate, aber signifikante Steigerung der linksventrikulären Kontraktion und in vitro eine stärkere Zellverkürzung³⁵. Entsprechend wies Wang et al. an Trabekeln aus dem rechten Ventrikel von nNOS-Knockout-Mäusen eine signifikante Reduktion der Kraftentwicklung nach. Wang gelang auch der Nachweis einer verminderten Zellverkürzung von nNOS^{-/-}-Kardiomyozyten und von Wildtyp-Kardiomyozyten, die mit SMLT, einem spezifischen nNOS-Inhibitor, behandelt worden waren³⁶.

4.2 Myokardialer Sauerstoffverbrauch

4.2.1 Unspezifische Hemmung der NO-Synthasen

Die Literatur über die Auswirkung einer unspezifischen NO-Synthasen-Inhibition auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch ist inhomogen.

Keine Veränderung des MVO_2 ruhender und schlagender muriner Herzmuskelstreifen nach unspezifischer NOS-Inhibition mit L-NAME zeigt diese Arbeit (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Bestätigung finden diese Ergebnisse durch Grassi et al., dem am kontrahierenden Muskel der Nachweis eines veränderten Sauerstoffverbrauchs nach L-NAME-Gabe nicht gelang⁶⁵. Xie et al. und Loke et al. beobachteten an linksventrikulärem Gewebe vom Hund bzw. der Maus ebenfalls keine Veränderung des Sauerstoffverbrauchs nach Inkubation mit L-NNA^{40,42}. Crystal et al. zufolge hat die unspezifische NOS-Inhibition mit L-NAME auch keinen Einfluss auf den Gesamtsauerstoffverbrauch des anästhesierten Hundes⁶⁶. An ruhenden und arbeitenden Schweinen konnte Duncker et al. keine Veränderung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs nach Injektion von NLA messen⁶⁷ und in Langendorff-Präparationen von Mäuseherzen beobachtete Kojic et al. keinerlei Einfluss des unspezifischen NOS-Inhibitors L-NMMA auf MVO_2 ⁶⁸.

Einen Anstieg des Gesamtsauerstoffverbrauches nach unspezifischer NOS-Hemmung mit NLA konnte Shen et al. an Hunden messen ⁶⁹. Bestätigung fanden diese Ergebnisse in Arbeiten von Bernstein et al. und Chen et al., denen bei ruhenden und arbeitenden Hunden der Nachweis gelang, dass eine intracoronare NLA- bzw. L-NNA-Injektion den myokardialen Sauerstoffverbrauch steigert ^{38,70}. Ebenso zeigte Grassi et al. am ruhenden, isolierten Musculus gastrocnemius des Hundes, dass NOS-Inhibition durch L-NAME zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs führt ⁶⁵.

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Arbeiten konnte Sherman et al. sowohl am anästhesierten als auch am nicht-anästhesierten Hund einen Abfall des myokardialen Sauerstoffverbrauches nach intracoronarer Verabreichung von L-NAME bzw. L-NA registrieren ⁷¹.

4.2.2 Neuronale NO-Synthase

Der Einfluss der neuronalen Isoform der NO-Synthasen auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch ist bisher kaum untersucht.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche zeigen nach Zugabe von Vinyl-L-NIO zur Versuchslösung bei nicht-stimulierten murinen Herzmuskelstreifen einen signifikanten Anstieg des Sauerstoffverbrauches (siehe Abb. 8). Am schlagenden Streifen ließ sich ein Anstieg beobachten, welcher keine statistische Signifikanz erreichte (siehe Abb. 7).

Kinugawa et al. beobachtete zwischen nNOS-Knockout-Mäusen und Wildtypen keinen Unterschied bezüglich des Sauerstoffverbrauches linksventrikulären Gewebes. Allerdings war der durch Bradykinin bzw. Carbachol bedingte Abfall des Sauerstoffverbrauches in den nNOS^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert. Akute, spezifische nNOS-Inhibition mit S-Methyl-L-Thiocitrullin (SMTC) bzw. 7-Nitroindazol (7-NI) hatte jedoch keinen Einfluss auf die Bradykinin-induzierte Reduktion von MVO₂ in Wildtyp-Mäusen. In Zusammenschau mit weiteren Ergebnissen seiner Arbeit postuliert er, dass ein Defekt der nNOS die

Veränderung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs durch NO aus anderen Quellen (z.B. eNOS) beeinflusst⁴³.

4.3 Myokardiale Ökonomie

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der auf die geleistete Arbeit bezogene Sauerstoffverbrauch des schlagenden Herzmuskelstreifens (MVO_2/FTI) als Maß für die myokardiale Ökonomie betrachtet.

4.3.1 Unspezifische Hemmung der NO-Synthasen

Während in der hier vorliegenden Arbeit eine unspezifische NOS-Hemmung mit L-NAME die myokardiale Effizienz nicht veränderte (siehe Abb. 9), konnte Bernstein et al. beim Hund nach Gabe von NLA, einem unspezifischen NOS-Inhibitor, einen Anstieg des myokardialen Sauerstoffverbrauches und eine Reduktion des Verbrauchs freier Fettsäuren bei vergleichbarer Herzleistung beobachten³⁸. Die Reduktion des Verbrauchs an freien Fettsäuren und ein kompensatorischer Mehrverbrauch an Kohlenhydraten dürfte zudem noch zum Unterschätzen des Anstiegs des myokardialen Sauerstoffverbrauches führen, da das ATP/Sauerstoff-Verhältnis von Kohlenhydraten höher ist als das von freien Fettsäuren^{72,73}. Analog zu Bernstein et al. gelang auch Saavedra et al. der Nachweis einer verminderten myokardialen Effizienz nach unspezifischer NOS-Inhibition mit L-NMMA am Hund, die er auf eine erhöhte Aktivität der Xanthinoxidase zurückführt⁷⁴. An isolierten rechtstventrikulären Papillarmuskeln vom Kaninchen konnte Hünlich et al. nach Applikation des NO-Donors SNP (Natrium-Nitroprussid) eine Steigerung der myokardialen Ökonomie demonstrieren. Hierzu kam es durch eine mäßige Reduktion der Inotropie bei nicht proportionaler Abnahme des Sauerstoffverbrauches der Papillarmuskeln⁷⁵.

4.3.2 Neuronale NO-Synthase

Nach spezifischer nNOS-Inhibition mit Vinyl-L-NIO zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit ein signifikanter Abfall der myokardialen Effizienz (siehe Abb. 9). Dieser Abfall der Ökonomie ergibt sich aus der Kombination eines leicht angestiegenen Sauerstoffverbrauches (siehe Abb. 7) und eines signifikant

reduzierten FTIs (siehe Abb. 6). Im Umkehrschluss lässt sich postulieren, dass die neuronale NO-Synthase die Ökonomie muriner Herzmuskelstreifen erhöht.

4.4 Cytochrom c-Oxidase

In nanomolaren Konzentrationen hemmt Stickstoffmonoxid die mitochondriale Atmungskette durch reversible Inhibition der Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) ^{76,77}. Diese reversible Hemmung der Cytochrom c-Oxidase erfolgt sowohl am oxidierten Kupfer als auch am reduzierten Häm der Sauerstoffbindungsstelle. Die Bindung von Stickstoffmonoxid an das oxidierte Kupfer führt zu dessen Reduktion und zur Bildung inhibitorisch wirksamen Nitrits, wohingegen die Bindung von NO an das reduzierte Häm die Cytochrom c-Oxidase kompetitiv hemmt ⁷⁸.

Höhere Konzentrationen von NO und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) führen hingegen durch S-Nitrosylierung und Nitrierung zu einer irreversiblen und lang anhaltenden Hemmung der Cytochrom c-Oxidase ⁷⁹ sowie der Komplexe I bis III ⁸⁰.

Inwieweit die in den Mitochondrien lokalisierte neuronale NO-Synthase ^{14,15,44} die Atmungskette beeinflusst, ist umstritten. Einerseits wurde gezeigt, dass bis zu 56 % des gesamten zellulären NOs aus den Mitochondrien stammen ^{45,46}, andererseits wird jede physiologische Relevanz mitochondrialer NO-Produktion bestritten ^{47,48}. Letzteres lässt sich möglicherweise auf erhöhte MgCl₂-Konzentrationen in den Versuchslösungen zurückführen ²⁶, da gezeigt werden konnte, dass Mg²⁺-Konzentrationen über 1 mM die mitochondriale NO-Produktion signifikant reduzieren ⁸¹ bzw. komplett inhibieren ⁸².

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass nNOS-Überexpression bei der Maus zu einer signifikanten Reduktion der Cytochrom c-Aktivität führt (siehe Abb. 10). Da die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase in Abwesenheit der neuronalen NO-Synthase bestimmt wurde, ist von einer lang anhaltenden Hemmung auszugehen.

4.5 Synthese

Diese Arbeit zeigt, dass die spezifische Inhibition der neuronalen NO-Synthase zu einer Reduktion der myokardialen Ökonomie führt. Umgekehrt lässt sich postulieren, dass die Produktion von Stickstoffmonoxid durch die nNOS eine gesteigerte Effizienz des Herzmuskelgewebes bewirkt.

Zu einer erhöhten myokardialen Effizienz kann es zum Einen durch ökonomischere ATP-Produktion zum Anderen aber auch durch effizienteren ATP-Verbrauch kommen.

Beim ruhenden Herzmuskelstreifen spielen stark ATP-verbrauchende Prozesse wie Kalzium- und Kontraktionszyklus nur eine untergeordnete Rolle. Aus diesem Grund lassen sich mit Hilfe des myokardialen Sauerstoffverbrauchs des nicht schlagenden Streifens Aussagen zur Ökonomie der ATP-Produktion machen. Folglich weist der erhöhte Sauerstoffverbrauch des ruhenden Muskelstreifens nach nNOS-Inhibition in der hier vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 8) indirekt auf eine erhöhte Effizienz der ATP-Produktion durch die nNOS hin. Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass nNOS-Überexpression bei der Maus zu einer lang anhaltenden Reduktion der Aktivität der Cytochrom c-Oxidase, einem Schlüsselenzym der mitochondrialen ATP-Produktion, führt (siehe Abb. 10). So kommt es infolge der NO-induzierten Hemmung der Atmungskette zu einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials⁸³ und einer damit einhergehenden Limitierung der ATP-Synthese⁸⁴. Folge ist die Aktivierung der Glykolyse⁸⁵ und eine homogenere O₂-Versorgung des Gewebes⁸⁶. Diese Mechanismen könnten, zumindest teilweise, die beobachtete myokardiale Effizienzsteigerung erklären. Eine weitere Ursache für den verminderten myokardialen Sauerstoffverbrauch und die dadurch gesteigerte myokardiale Ökonomie könnte die NO-bedingte Hemmung der Xanthinoxidase sein⁷⁴. Diese führt zu einer reduzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Kardiomyocyten. Hierbei scheint die neuronale Isoform der NO-Synthase von eminenter Bedeutung zu sein^{12,43,52}.

Wäre die Steigerung der myokardialen Ökonomie (MVO_2/FTI) durch die nNOS alleine auf eine gesteigerte Effizienz der ATP-Produktion zurückzuführen, so müsste die Effizienzsteigerung des schlagenden Herzmuskelstreifens in einer ähnlichen Größenordnung liegen. In der hier vorliegenden Arbeit steigt MVO_2/FTI des schlagenden Muskelstreifens nach spezifischer nNOS-Inhibition jedoch deutlich stärker als der Sauerstoffverbrauch des ruhenden Muskelstreifens (36% [Abb. 9] vs. 14% [Abb. 8]). Daraus lässt sich folgern, dass neben der oben postulierten Effizienzsteigerung der ATP-Produktion auch eine gesteigerte Effizienz des ATP-Verbrauchs zur erhöhten myokardialen Ökonomie durch die nNOS beiträgt. Dies wird durch die Kollokalisierung der neuronalen NO-Synthase und wichtiger Enzyme der elektromechanischen Kopplung untermauert. Beispielsweise wurde die nNOS am Sarkolemm und den dort vorhandenen L-Typ-Kalziumkanälen und Ryanodinrezeptoren (RyR)⁸⁻¹¹ sowie am sarkoplasmatischen Retikulum und der dort lokalisierten SERCA2A (Sarko(Endo)plasmatische Retikulum Calcium ATPase)¹⁰⁻¹³ gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass die nNOS den Ca^{2+} -Eintritt in die Zelle durch L-Typ-Kalziumkanäle hemmt^{10,34} und dass NO die Offenwahrscheinlichkeit von Ryanodinrezeptoren (RyR) erhöht²⁸⁻³⁰ und die SERCA2A inhibiert¹³.

Da die elektromechanische Kopplung nur für etwa 15 - 20 % des gesamten ATP-Verbrauchs verantwortlich ist⁸⁷ und NO mittels cGMP-abhängiger Phosphorylierung von Troponin I zu einer herabgesetzten Kalziumsensitivität des myofibrillären Apparates führt⁸⁸ und so mehr Energie in Form von ATP für den Kalziumzyklus gebraucht wird, geht die myokardiale Effizienzsteigerung möglicherweise aber auch auf eine verbesserte Ökonomie im Bereich der myofibrillären Proteine zurück.

Klinische Bedeutung könnte die nNOS-bedingte myokardiale Effizienzsteigerung besonders bei Vorliegen eines Missverhältnisses von Sauerstoffangebot und zu leistender Herzmuskelarbeit erlangen. Ein solches Missverhältnis liegt beispielsweise bei Myokardinfarkt und Kreislaufstillstand vor. Kawahara et al. wies nach, dass eine spezifische nNOS-Inhibition zu einem vermehrten Absterben isolierter Kardiomyocyten während ischämischer Phasen

und anschließender Reperfusion führt⁸⁹. Dies erklärt er unter anderem durch eine Abnahme der zellulären ATP-Konzentration. Zudem zeigte Saraiva et al., dass ein Fehlen der nNOS zu einer gesteigerten Mortalität und einem verstärkten Remodelling nach Myokardinfarkt führt⁵¹. Daraus lässt sich folgern, dass die nNOS in ischämischen Phasen und während der sich anschließenden Reperfusion, wie sie etwa beim Herzinfarkt vorkommt, kardioprotektiv wirkt. So konnte auch Adams et al. an Schweinen nachweisen, dass die Inhibition der nNOS während kardiopulmonaler Reanimation (CPR) die Überlebenschancen reduziert, die neuronale NO-Synthase also einen positiven Einfluss auf das Ergebnis einer CPR hat⁹⁰.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte anhand von Untersuchungen an murinen Herzmuskelstreifen gezeigt werden, dass die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) die myokardiale Ökonomie steigert. Es wird postuliert, dass dies sowohl durch eine erhöhte Effizienz der ATP-Produktion, wie auch durch eine Effizienzsteigerung des ATP-Verbrauchs zu erklären ist. Des Weiteren gelang der Nachweis, dass die neuronale NO-Synthase die Cytochrom c-Oxidase hemmt, was als eine mögliche Ursache für die gesteigerte Effizienz der ATP-Produktion angesehen wird. Die Steigerung der myokardialen Ökonomie durch die nNOS liefert eine mögliche Erklärung für die vielfach nachgewiesenen kardioprotektiven Eigenschaften des Enzyms.

6. Literatur

1. Sears CE, Ashley EA, Casadei B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004; 359(1446): 1021-44.
2. Danson EJ, Choate JK, Paterson DJ. Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacol Ther.* 2005; 106(1): 57-74.
3. Seddon M, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(2): 315-26.
4. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357(Pt 3): 593-615.
5. Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA. RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(21): 12150-5.
6. Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics.* 1992; 14(3): 802-4.
7. Lee CG, Gregg AR, O'Brien WE. Localization of the neuronal form of nitric oxide synthase to mouse chromosome 5. *Mamm Genome.* 1995; 6(1): 56-7.
8. Xu KY, Kuppusamy SP, Wang JQ, Li H, Cui H, Dawson TM, Huang PL, Burnett AL, Kuppusamy P, Becker LC. Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. *J Biol Chem.* 2003; 278(43): 41798-803.
9. Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rothlein N, Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol.* 2001; 155(2): 201-5.
10. Burkard N, Rokita AG, Kaufmann SG, Hallhuber M, Wu R, Hu K,

- Hofmann U, Bonz A, Frantz S, Cartwright EJ, Neyses L, Maier LS, Maier SK, Renné T, Schuh K, Ritter O. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circ Res.* 2007; 100(3): e32-44.
11. Damy T, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Oliviero P, Boczkowski J, Ebrahimian T, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB J.* 2003; 17(13): 1934-6.
 12. Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SV, Tejani AD, Li D, Berkowitz DE, Hare JM. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(45): 15944-8.
 13. Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Brecht DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(2): 657-62.
 14. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(24): 14126-31.
 15. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002; 277(41): 38079-86.
 16. Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III) *FASEB J.* 1998; 12(10): 773-90.
 17. Guo Y, Ward ME, Beasjourns S, Mori M, Hussain SN. Regulation of cerebellar nitric oxide production in response to prolonged in vivo hypoxia. *J Neurosci Res.* 1997; 49(1): 89-97.
 18. Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM, Brecht DS. Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev Neurosci.* 1997; 19(3): 224-31.
 19. Silvagno F, Xia H, Brecht DS. Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle.

- J Biol Chem. 1996; 271(19): 11204-8.
20. Herring N, Golding S, Paterson DJ. Pre-synaptic NO-cGMP pathway modulates vagal control of heart rate in isolated adult guinea pig atria. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(10): 1795-804.
 21. Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem.* 1999; 274(29): 20597-602.
 22. Kotsonis P, Frey A, Fröhlich LG, Hofmann H, Reif A, Wink DA, Feelisch M, Schmidt HH. Autoinhibition of neuronal nitric oxide synthase: distinct effects of reactive nitrogen and oxygen species on enzyme activity. *Biochem J.* 1999; 340(Pt 3): 745-52.
 23. Sato Y, Sagami I, Shimizu T. Identification of caveolin-1-interacting sites in neuronal nitric-oxide synthase. Molecular mechanism for inhibition of NO formation. *J Biol Chem.* 2004; 279(10): 8827-36.
 24. Bendall JK, Damy T, Ratajczak P, Loyer X, Monceau V, Marty I, Milliez P, Robidel E, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation.* 2004; 110(16): 2368-75.
 25. Gao YT, Roman LJ, Martásek P, Panda SP, Ishimura Y, Masters BS. Oxygen Metabolism by Neuronal Nitric-oxide Synthase. *J Biol Chem.* 2007; 282(39): 28557-65.
 26. Dedkova EN, Blatter LA. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J Physiol.* 2009; 587(Pt 4): 851-72.
 27. Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, Losano G. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci.* 2007; 81(10): 779-93.
 28. Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marbán E, Balligand JL, Sollott SJ. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(10): 867-73.
 29. Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium

- release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 1998; 279(5348): 234-7.
30. Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric Oxide Regulation of Myocardial Contractility and Calcium Cycling: Independent Impact of Neuronal and Endothelial Nitric Oxide Synthases. *Circ Res*. 2003; 92(12): 1322-9.
31. Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E. Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2006; 98(3): 403-11.
32. Hu H, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, Marban E. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ Res*. 1997; 81(5): 742-52.
33. Ashley EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. Cardiac Nitric Oxide Synthase 1 Regulates Basal and β -Adrenergic Contractility in Murine Ventricular Myocytes. *Circulation*. 2002; 105(25): 3011-6.
34. Sears CE, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, Neubauer S, Terrar DA, Casadei B. Cardiac Neuronal Nitric Oxide Synthase Isoform Regulates Myocardial Contraction and Calcium Handling. *Circ Res*. 2003; 92(5): e52-9.
35. Loyer X, Gómez AM, Milliez P, Fernandez-Velasco M, Vangheluwe P, Vinet L, Charue D, Vaudin E, Zhang W, Sainte-Marie Y, Robidel E, Marty I, Mayer B, Jaisser F, Mercadier JJ, Richard S, Shah AM, Bénitah JP, Samuel JL, Heymes C. Cardiomyocyte Overexpression of Neuronal Nitric Oxide Synthase Delays Transition Toward Heart Failure in Response to Pressure Overload by Preserving Calcium Cycling. *Circulation*. 2008; 117(25): 3187-98.
36. Wang H, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT. Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294(6): C1566-75.
37. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi

- ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*. 2002; 416(6878): 337-9.
38. Bernstein RD, Ochoa FY, Xu X, Forfia P, Shen W, Thompson CI, Hintze TH. Function and production of nitric oxide in the coronary circulation of the conscious dog during exercise. *Circ Res*. 1996; (4): 840-8.
39. Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M, Schöpfer F, Cadenas E, Boveris A. Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am J Physiol*. 1998; 274(1 Pt 1): C112-9.
40. Xie YW, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. *Circ Res*. 1996; 79(3):381-7.
41. Forfia PR, Zhang X, Knight DR, Smith AH, Doe CP, Wolfgang EA, Flynn DM, Wolin MS, Hintze TH. NO modulates myocardial O₂ consumption in the nonhuman primate: an additional mechanism of action of amlodipine. *Am J Physiol*. 1999; 276(6 Pt 2):H2069-75.
42. Loke KE, McConnell PI, Tuzman JM, Shesely EG, Smith CJ, Stackpole CJ, Thompson CI, Kaley G, Wolin MS, Hintze TH. Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ Res*. 1999; 84(7):840-5.
43. Kinugawa S, Huang H, Wang Z, Kaminski PM, Wolin MS, Hintze TH. A defect of neuronal nitric oxide synthase increases xanthine oxidase-derived superoxide anion and attenuates the control of myocardial oxygen consumption by nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2005; 96(3):355-62.
44. Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997; 418(3):291-6.
45. Valdez LB, Zaobornyj T, Alvarez S, Bustamante J, Costa LE, Boveris A.

- Heart mitochondrial nitric oxide synthase. Effects of hypoxia and aging. *Mol Aspects Med.* 2004; 25(1-2):49-59.
46. Valdez LB, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide synthase, a voltage-dependent enzyme, is responsible for nitric oxide diffusion to cytosol. *Front Biosci.* 2007; 12:1210-9.
47. French S, Giulivi C, Balaban RS. Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280(6):H2863-7.
48. Tay YM, Lim KS, Sheu FS, Jenner A, Whiteman M, Wong KP, Halliwell B. Do mitochondria make nitric oxide? no? *Free Radic Res.* 2004; 38(6):591-9.
49. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 40(1):16-23.
50. Dawson D, Lygate CA, Zhang MH, Hulbert K, Neubauer S, Casadei B. nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation.* 2005; 112(24):3729-37.
51. Saraiva RM, Minhas KM, Raju SV, Barouch LA, Pitz E, Schuleri KH, Vandegaer K, Li D, Hare JM. Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. *Circulation.* 2005; 112(22):3415-22.
52. Burkard N, Williams T, Czolbe M, Blömer N, Panther F, Link M, Fraccarollo D, Widder JD, Hu K, Han H, Hofmann U, Frantz S, Nordbeck P, Bulla J, Schuh K, Ritter O. Conditional overexpression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in ischemia/reperfusion. *Circulation.* 2010; 122(16):1588-603.
53. Babu BR, Griffith OW. N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1998; 273(15):8882-9.
54. Sunderdiek U, Schmitz-Spanke S, Korbmacher B, Gams E, Schipke JD. Left ventricular dysfunction and disturbed O₂-utilization in stunned myocardium: influence of ischemic preconditioning. *Eur J Cardiothorac*

- Surg. 2001; 20(4):770-6.
55. Lee S, Araki J, Imaoka T, Maesako M, Iribe G, Miyaji K, Mohri S, Shimizu J, Harada M, Ohe T, Hirakawa M, Suga H. Energy-wasteful total Ca(2+) handling underlies increased O(2) cost of contractility in canine stunned heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278(5):H1464-72.
 56. Sutherland FJ, Shattock MJ, Baker KE, Hearse DJ. Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30(11):867-78.
 57. Meyer M, Keweloh B, Güth K, Holmes JW, Pieske B, Lehnart SE, Just H, Hasenfuss G. Frequency-dependence of myocardial energetics in failing human myocardium as quantified by a new method for the measurement of oxygen consumption in muscle strip preparations. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(8):1459-70.
 58. Klabunde RE, Kimber ND, Kuk JE, Helgren MC, Förstermann U. NG-methyl-L-arginine decreases contractility, cGMP and cAMP in isoproterenol-stimulated rat hearts in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1992; 223(1):1-7.
 59. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(1):347-51.
 60. Keaney JF Jr, Hare JM, Balligand JL, Loscalzo J, Smith TW, Colucci WS. Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol.* 1996; 271(6 Pt 2):H2646-52.
 61. Finkel MS, Oddis CV, Mayer OH, Hattler BG, Simmons RL. Nitric oxide synthase inhibitor alters papillary muscle force-frequency relationship. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 272(2):945-52.
 62. Kaye DM, Wiviott SD, Balligand JL, Simmons WW, Smith TW, Kelly RA. Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 1996; 78(2):217-24.
 63. Kojda G, Kottenberg K, Noack E. Inhibition of nitric oxide synthase and

- soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. *Eur J Pharmacol.* 1997; 334(2-3):181-90.
64. Cotton JM, Kearney MT, MacCarthy PA, Grocott-Mason RM, McClean DR, Heymes C, Richardson PJ, Shah AM. Effects of nitric oxide synthase inhibition on Basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation.* 2001; 104(19):2318-23.
65. Grassi B, Hogan MC, Kelley KM, Howlett RA, Gladden LB. Effects of nitric oxide synthase inhibition by L-NAME on oxygen uptake kinetics in isolated canine muscle in situ. *J Physiol.* 2005; 568(Pt 3):1021-33.
66. Crystal GJ, Zhou X, Halim AA, Alam S, El-Orbany M, Salem MR. Nitric oxide does not modulate whole body oxygen consumption in anesthetized dogs. *J Appl Physiol.* 1999; 86(6):1944-9.
67. Duncker DJ, Stubenitsky R, Tonino PA, Verdouw PD. Nitric oxide contributes to the regulation of vasomotor tone but does not modulate O₂-consumption in exercising swine. *Cardiovasc Res.* 2000; 47(4):738-48.
68. Kojic ZZ, Flogel U, Schrader J, Decking UK. Endothelial NO formation does not control myocardial O₂ consumption in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285(1):H392-7.
69. Shen W, Xu X, Ochoa M, Zhao G, Wolin MS, Hintze TH. Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circ Res.* 1994; 75(6):1086-95.
70. Chen Y, Traverse JH, Du R, Hou M, Bache RJ. Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart. *Circulation.* 2002; 106(2):273-9.
71. Sherman AJ, Davis CA 3rd, Klocke FJ, Harris KR, Srinivasan G, Yaacoub AS, Quinn DA, Ahlin KA, Jang JJ. Blockade of nitric oxide synthesis reduces myocardial oxygen consumption in vivo. *Circulation.* 1997; 95(5):1328-34.
72. Recchia FA, McConnell PI, Loke KE, Xu X, Ochoa M, Hintze TH. Nitric

- oxide controls cardiac substrate utilization in the conscious dog. *Cardiovasc Res.* 1999; 44(2):325-32.
73. Opie LH. Myocardial energy metabolism. *Adv Cardiol.* 1974; 12(0):70-83.
74. Saavedra WF, Paolucci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, Harrison RW, Zeichner J, Mudrick D, Marbán E, Kass DA, Hare JM. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res.* 2002; 90(3):297-304.
75. Hünlich M, Hasenfuss G. Effects of the NO donor sodium nitroprusside on oxygen consumption and energetics in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol.* 2009; 104(4):359-65.
76. Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 1994; 356(2-3):295-8.
77. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 1994; 345(1):50-4.
78. Mason MG, Nicholls P, Wilson MT, Cooper CE. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(3):708-13.
79. Cooper CE, Davies NA. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on the cytochrome oxidase $K(m)$ for oxygen: implications for mitochondrial pathology. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1459(2-3):390-6.
80. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(2):283-90.
81. Manzo-Avalos S, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R, Saavedra-Molina A. Regulation of the rate of synthesis of nitric oxide by $Mg(2+)$ and hypoxia. Studies in rat heart mitochondria. *Amino Acids.* 2002; 22(4):381-9.

82. Zenebe WJ, Nazarewicz RR, Parihar MS, Ghafourifar P. Hypoxia/reoxygenation of isolated rat heart mitochondria causes cytochrome c release and oxidative stress; evidence for involvement of mitochondrial nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 43(4):411-9.
83. Schweizer M, Richter C. Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 204(1):169-75.
84. Brookes PS, Bolaños JP, Heales SJ. The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Lett.* 1999; 446(2-3):261-3.
85. Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol.* 2004; 6(1):45-51.
86. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR Jr. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(1):355-60.
87. Hasenfuss G, Mulieri LA, Holubarsch C, Pieske B, Just H, Alpert NR. Energetics of calcium cycling in nonfailing and failing human myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1992; 87 Suppl 2:81-92.
88. Shah AM, Spurgeon HA, Sollott SJ, Talo A, Lakatta EG. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ Res.* 1994; 74(5):970-8.
89. Kawahara K, Hachiro T, Yokokawa T, Nakajima T, Yamauchi Y, Nakayama Y. Ischemia/reperfusion-induced death of cardiac myocytes: possible involvement of nitric oxide in the coordination of ATP supply and demand during ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 40(1):35-46.
90. Adams JA, Wu D, Bassuk J, Arias J, Lozano H, Kurlansky P, Lamas GA. Nitric oxide synthase isoform inhibition before whole body ischemia reperfusion in pigs: vital or protective? *Resuscitation.* 2007; 74(3):516-25.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung aller Ressourcen an der Medizinischen Universitätsklinik, sowie der Unterstützung bei der Publikation von Teilergebnissen dieser Arbeit in Circulation bin ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. O. Ritter, zu großem Dank verpflichtet.

Des weiteren möchte ich mich ganz besonders bei meinem verantwortlichen Betreuer Dr. med. Ulrich Hofmann bedanken. Ohne seine ständige Verfügbarkeit, seinen kompetenten Rat und seine praktischen Hilfestellungen wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Auch bei Natalie Burkard und allen anderen Mitarbeitern des Labors möchte ich mich für die tägliche Unterstützung und freundliche Atmosphäre bedanken.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie es mir ermöglicht haben, einen solch phantastischen Beruf ergreifen zu können.

Meiner Verlobten Ruth Sittl danke ich für die vielen, hilfreichen Korrekturvorschläge während der Niederschrift dieser Arbeit und die ständige Ermunterung.

Lebenslauf

| | | |
|------------------------|-------------------|---|
| Zur Person: | Name: | Martin Benedikt Link |
| | Anschrift: | |
| | Geburtstag: | 16. Juli 1984 |
| | Geburtsort: | Freiburg im Breisgau |
| | Familienstand: | ledig |
| Schulische Ausbildung: | 1991 - 1995 | Grundschule Salem |
| | 1995 - 2003 | Droste-Hülshoff-Gymnasium Meersburg achtjähriger Bildungsgang |
| | 06/2003 | Allgemeine Hochschulreife (Note 1,5) |
| Studium: | 04/2004 - 05/2010 | Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg |
| | 05/2010 | Ärztliche Prüfung (Gesamtnote 1,8) |
| Pflegepraktika: | 01/2004 | Abteilung für Innere Medizin Krankenhaus Überlingen |
| | 02/2004 | Abteilung für Chirurgie Krankenhaus Überlingen |
| | 02/2005 | Abteilung für Geburtshilfe Krankenhaus Überlingen |

| | | |
|-------------------------------|--------------|---|
| Famulaturen: | 09/2006 | Innere Medizin Krankenhaus Land Hadeln Otterndorf |
| | 02/2007 | Diabetologie Hegau-Bodensee-Klinikum Radolfzell |
| | 02/2008 | Hämatologie / Onkologie Die Filderklinik Filderstadt |
| | 08/2008 | Allgemeinarztpraxis Dr. med. Link Überlingen |
| Ärztliche Tätigkeit: | seit 09/2010 | Assistenzarzt Klinik für Hämatologie und Onkologie Klinikum Neuperlach München |
| Ehrenamtliche Tätigkeiten: | 2000 - 2002 | Schülersprecher |
| | 08 - 12/2003 | Webdesigner Hilfsorganisation PREDA Philippinen |
| Sonstige Tätigkeiten: | 03 - 10/2002 | Besucherführer Pfalzbaumuseum Unteruhldingen |
| Interessen: | | Literatur, Klassische Musik, Mechanische Uhren, Joggen, Hanteltraining, Wandern |

München, 04.04.2011

Martin Link