

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

Untersuchungen an Kreatinkinase - Knockout - Mäusen  
mittels MR - Tomographie:  
Kardialer Phänotyp und Remodeling nach Myokardinfarkt  
bei Kreatinkinase - Mangel

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

vorgelegt von  
Peter Johann Nordbeck  
aus Göttingen

Würzburg, November 2005

**Referent:** Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang Rudolf Bauer

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Wolfram Voelker

**Dekan:** Prof. Dr. med. Georg Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung:** 31.05.2006

Der Promovend ist Arzt.

# Inhaltsverzeichnis

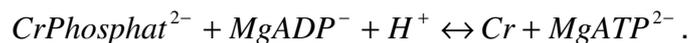
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN DER MR-TOMOGRAPHIE .....</b>	<b>6</b>
2.1	Geschichte und Prinzip der MR-Bildgebung.....	6
2.2	Ortsauflösung und Bildkontrast im MRT .....	7
2.3	Kardiale MR-Tomographie und Cine-Technik .....	9
2.4	FLASH-Bildgebung.....	10
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
3.1	Versuchstiere .....	12
3.1.1	Knockout-Mäuse .....	12
3.1.2	Infarzierung .....	13
3.1.3	Versuchsgruppen .....	15
3.2	MR-Tomographie.....	15
3.2.1	Biospec-System .....	15
3.2.2	Versuchsvorbereitungen.....	16
3.2.3	FLASH-Cine-Gradientenecho.....	17
3.3	Datenanalyse .....	22
3.4	Statistik.....	26
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>27</b>
4.1	Tiere ohne Myokardinfarkt.....	27
4.1.1	Linksventrikuläre Parameter.....	28
4.1.2	Rechtsventrikuläre Parameter .....	33
4.2	Myokardinfarkt.....	36
4.2.1	Linksventrikuläre Parameter.....	37
4.2.2	Rechtsventrikuläre Parameter .....	42
4.3	Korrelationen .....	44
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
5.1	Morphologie und Funktion des Herzens bei CK-KO .....	47
5.2	CK-Knockout und Myokardinfarkt.....	54
5.3	Energiemetabolismus und kardiales Remodeling.....	58
5.4	Limitationen .....	62
5.5	Abschließende Betrachtung .....	65
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
	<b>DANKSAGUNG, LEBENSLAUF .....</b>	

# 1 Einleitung

Eine der wichtigsten Aufgaben jeder Zelle ist die Energiehomöostase. Dies trifft besonders auf Zellen mit hohem Energieverbrauch, wie Herzmuskelzellen, zu. Die jederzeit zuverlässige Funktion des Herzens als absolut lebenswichtigem Organ ist daher entscheidend abhängig von einem leistungsfähigen System zur dauernden Bereitstellung ausreichender Mengen von Energie. Dem Adenosin-5'-triphosphat (ATP) als wichtigstem Energielieferanten zahlreicher Stoffwechselprozesse kommt dabei die entscheidende Bedeutung auch bei der Muskelkontraktion zu. Da die ATP-Vorräte der Myozyten ohne ständige Neubildung innerhalb weniger Sekunden erschöpft wären, sind zahlreiche Enzyme in den unterschiedlichen Kompartimenten der Herzmuskelzelle daran beteiligt, einer Erschöpfung der ATP-Vorräte entgegenzuwirken und dem Myozyten nach jedem Herzschlag innerhalb kürzester Zeit wieder die Kontraktion zu ermöglichen, ohne jemals zu ermüden. Eine Familie von in diesem Zusammenhang bedeutsamen Isoenzymen sind die Kreatinkinasen (engl. creatine kinase, CK). Diese kommen als intrazelluläre Enzyme in verschiedenen Zusammensetzungen in unterschiedlichen Kompartimenten zahlreicher Körperzellen mit hohem und/oder stark wechselndem Energieumsatz vor und haben eine Schlüsselstellung in der Energiehomöostase inne [76].

Derzeit sind fünf verschiedene Isoenzyme der Kreatinkinase bekannt, drei davon kommen im Zytoplasma, zwei in den Mitochondrien vor. In den Myozyten existiert die Kreatinkinase zum einen in Form der sarkomerischen mitochondrialen CK (engl.: sarcomeric mitochondrial CK) im intermembranösen Raum der Mitochondrien, zum anderen in Form von drei verschiedenen Isoenzymen im Zytosol. Das fünfte Isoenzym der CK (engl.: ubiquitous mitochondrial CK) kommt in Herzmuskelzellen nicht in nennenswertem Umfang vor. Im Gegensatz zur mitochondrialen CK können die zytosolischen Formen als Dimere aus den Untereinheiten B (engl.: brain, Gehirn), M (engl.: muscle,

Muskel) oder B und M zusammengesetzt sein. Im Herzen werden ganz überwiegend die Isoenzyme CK-MM und CK-MB exprimiert, in Spuren zusätzlich auch CK-BB. Die primäre Bedeutung der Kreatinkinasen liegt in der reversiblen Katalyse der ATP-abhängigen Phosphorylierung von Kreatin (engl.: creatine, Cr) nach dem folgenden Schema [70]:



Nach dem heutigen Wissensstand liegt die Bedeutung dieser Reaktion einerseits in der Aufrechterhaltung eines konstant hohen Levels von zytosolischem ATP, wobei das Kreatinphosphat als rasch verfügbarer Energiezwischenpeicher dient, der bei plötzlichem oder intermittierendem hohem Energiebedarf schnell und einfach verhältnismäßig große Mengen ATP bereitstellen kann. Außerdem wird Kreatinphosphat als Energie-Shuttle zwischen Energieproduzenten (Mitochondrien) und -verbrauchern gesehen, so dass beispielsweise ATP-undurchlässige Membranen innerhalb der Zelle überwunden werden können [70][76].

Es ist bekannt, dass in seiner Funktion gestörtes Myokard durch deutliche Veränderungen des Energiehaushalts gekennzeichnet ist. So nimmt der intrazelluläre Transport energiereicher Phosphate ab [43] und das ATP zeigt leicht verringerte Werte [59]. Auch kommt es zu einer Minderung der Aktivität der Kreatinkinase [21] und der intrazelluläre Gehalt an Kreatin und Phosphokreatin sinkt [21][22]. Trotz intensiver Forschung sind allerdings bis heute die genauen Ursachen-Wirkungs-Beziehungen in diesem komplexen pathologischen Geschehen nicht abschließend geklärt und bisher blieb unklar, ob beispielsweise die Veränderungen der Aktivität der Kreatinkinase lediglich ein durch die myokardialen Veränderungen hervorgerufenes Phänomen ohne eigenen Krankheitswert oder eher einen adaptiven Prozess im Sinne einer eigendynamischen Reaktion darstellen. Es stellt sich vor allem die Frage, inwieweit diese energetischen Belange zum Fortbestehen oder gar zur Verschlimmerung der Pathologie beitragen. Verschiedene Studien legten zuletzt eine entscheidende Bedeutung verschiedener Veränderungen des

Energiestoffwechsels in der Genese von Störungen der kontraktile Funktion von Muskelzellen nahe [20][34][42][64]. Bei der Vielzahl von Veränderungen im Energiestoffwechsel des in seiner Funktion gestörten Myokards kann davon ausgegangen werden, dass einige Teilaspekte dieser Veränderungen rein negativ für die Funktion des Herzens zu beurteilen sind (beispielsweise der Abfall von ATP und der intrazellulären Transportrate energiereicher Verbindungen). Andererseits lassen sich auch Teilaspekte mit möglicherweise positiven Auswirkungen auf den Erhalt der Herzfunktion finden, potentielle Adaptationen. Ein Beispiel dafür wäre der Abfall des intrazellulären Gesamt-Kreatins [22], welcher als Adaptation zur Aufrechterhaltung eines hohen ATP- und niedrigen ADP-Level bei gestörtem Energieumsatz angesehen werden könnte. Dennoch bleibt der genaue Zusammenhang zwischen nachlassender Leistungsfähigkeit des Herzens und einer veränderten Energiehomöostase weiterhin unklar.

In der medizinischen Grundlagenforschung spielen Tiermodelle trotz zunehmender Möglichkeiten der Forschung an isolierten Organen oder Zellkulturen weiterhin eine wichtige Rolle. Nach wie vor unverzichtbar ist die Forschung an solchen Modellen zur Untersuchung komplexer Vorgänge, vor allem mit Beteiligung mehrerer Organe. Zunehmende Bedeutung erlangt dabei das Tiermodell der Maus, der derzeit neben dem Menschen einzigen Säugetierspezies, deren Genom vollständig charakterisiert ist. Dabei konnte die nahe Verwandtschaft beider Spezies durch den Nachweis der hohen Übereinstimmung des genetischen Materials von circa 97 % aufgezeigt werden [38]. Zusätzlich wurde für jedes menschliche Gen ein entsprechendes Pendant in der Maus gefunden, daher lassen an der Maus gefundene Forschungsergebnisse weit reichende Rückschlüsse auch auf den Menschen zu. Für die medizinische Forschung von besonderer Bedeutung ist nun die Möglichkeit, mittels in den letzten Jahren entwickelter Techniken gezielte Veränderungen einzelner Gene wie Gendeletion, Genüberexpression oder Genmutation vorzunehmen, wodurch ein Beitrag zum Verständnis zahlreicher

komplexer physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge auch beim Menschen geleistet werden kann.

Mit der Verfügbarkeit von Mäusen mit einer Gendeletion (engl.: knock out, KO) der M-Untereinheit der zytosolischen Isoenzyme der Kreatinkinase (M-CK<sup>-/-</sup>) [12], des sarkomerischen mitochondrialen Isoenzym (Mito-CK<sup>-/-</sup>) [61] und einem kombinierten Knockout beider Gene (M/Mito-CK<sup>-/-</sup>) [62] erwuchs damit die Möglichkeit weiterführender Untersuchungen zur eingangs erläuterten Fragestellung des Zusammenhangs verschiedener pathologischer Vorgänge und energetischer Veränderungen im Herzen. Die spezifische Bedeutung des Kreatinkinase-Systems im Herzen konnte nun in einem Tiermodell gezielt untersucht werden. So war im Myokard von Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen der Phosphokreatin-Gehalt deutlich verringert [53][58], dagegen zeigten sich bei M-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Veränderungen. Auch Veränderungen der zellulären Ultrastruktur und biochemische Modifikationen wurden beobachtet [24][54][68][69]. Eher überraschend waren die Ergebnisse verschiedener Studien am isolierten Herzen, die keine signifikanten Unterschiede der kardialen Funktion zwischen CK-Knockout und Wildtyp-Mäusen feststellen konnten [53][54][58]. Dabei müssen allerdings die Schwierigkeiten einer umfassenden Simulation komplexer pathophysiologischer Prozesse wie etwa der Kardiomyopathie oder auch das Verhalten des Herzens nach Myokardinfarkt *in vitro* im Vergleich zur Situation *in vivo* berücksichtigt werden. Für zahlreiche Störungen des kardialen Energiehaushalts konnten in der Vergangenheit morphologische Veränderungen des Herzens nachgewiesen werden [20][66][67][73], so dass andererseits vom Ablauf verschiedener Adaptationsprozesse bei solchen Störungen ausgegangen werden kann. Es erscheint damit möglich, dass ein Fehlen der Kreatinkinase im Myokard ebenso durch Adaptationsprozesse, welche möglicherweise bereits pränatal einsetzen könnten, ausgeglichen werden kann.

In dieser Arbeit sollte somit der Phänotyp des Herzens der verschiedenen CK-Knockout Mäuse *in vivo* unter normalen Bedingungen sowie das

linksventrikuläre Remodeling bei Vorliegen eines chronischen Myokardinfarktes und etwaige Auswirkungen desselben auf die Herzfunktion untersucht werden. So sollten weitere Aufschlüsse über Funktion und Bedeutung des Kreatinkinase-Systems erlangt, und dabei methodische Fehler verschiedener anderer Modelle möglichst ausgeschlossen, beziehungsweise in diesen bisher nicht berücksichtigte Faktoren mit einbezogen werden. Außerdem sollten dabei neue Erkenntnisse über Ursachen und Auswirkungen der Veränderungen des Kreatinkinase-Systems bei Störungen der normalen Morphologie und Funktion des menschlichen Herzens gewonnen werden. Vor dem Hintergrund der enormen Bedeutung der Herz-Kreislaufkrankungen, die seit Jahren die Todesursachenstatistiken der Industrieländer anführen, und im Wissen um das zu beobachtende gemeinsame Auftreten von Herzerkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Herzversagen und Änderungen im Kreatinkinase-System beim Menschen [21] kann nicht zuletzt auch eine hohe klinische Relevanz der genauen Erforschung dieser Prozesse für den Menschen angenommen werden. Dieses Vorhaben sollte durch die Verwendung der derzeit besten Bildgebungsmethode zur Erfassung der genauen Morphologie und Funktion in vivo, der Magnetresonanztomographie, sichergestellt werden.

## 2 Grundlagen der MR-Tomographie

### 2.1 Geschichte und Prinzip der MR-Bildgebung

Die Geschichte der nuklearmagnetischen Bildgebung beginnt mit der Entdeckung der Kernspin- oder magnetischen Resonanz durch Purcell et. al. [46] und Bloch et. al. [5] im Jahre 1946. Dies führte in den folgenden Jahren zur Entwicklung verschiedener nuklearmagnetischer Spektroskopiemethoden, die bald ein fester Bestandteil der naturwissenschaftlichen Forschung wurden. Mit der Entwicklung komplexer Verfahren zur räumlichen Kodierung von Signalen Anfang der siebziger Jahre wurde es erstmals möglich, auch komplexe Objekte wie den menschlichen Körper mittels der Magnetresonanz-Tomographie (MRT) zu untersuchen [32][36]. Durch die fortschreitende technische Entwicklung mit höherer Auflösung und kürzeren Messzeiten wurde die MRT in den folgenden Jahren ein wichtiger Bestandteil der medizinischen Forschung und Diagnostik.

In der klinischen MR-Tomographie bedient man sich heute zur Bildgebung überwiegend der kernmagnetischen Resonanz von Protonen beziehungsweise leichten Wasserstoffatomen ( $^1\text{H}$ ). Diese besitzen wie alle Kerne ungerader Massenzahl einen Eigendrehimpuls, den Kernspin. Als Effekt dieses Kernspins verhalten sie sich wie ein magnetischer Dipol. Das Anlegen eines externen Magnetfeldes führt daher zur Ausrichtung der Spins mit der Ausbildung eines thermodynamischen Gleichgewichtes, mit einer Nettomagnetisierung in Richtung der magnetischen Feldlinien. Während des Vorgangs der Annäherung an diesen Gleichgewichtszustand führen die Spins eine kreiselähnliche Präzessionsbewegung aus. Die Kreisfrequenz dieser Bewegung wird als Larmorfrequenz bezeichnet, sie verhält sich direkt proportional zur Stärke des externen Magnetfeldes sowie einer kerntypischen Proportionalitätskonstanten und liegt für gewöhnlich im Hochfrequenzbereich. Die Larmorpräzession der Spins endet nach einer gewissen Zeit mit der sich ausrichtenden Nettomagnetisierung in Richtung des externen Magnetfeldes, beginnt jedoch

stets von neuem, wenn die Kerne durch äußere Einwirkungen aus dem Gleichgewicht der Ausgangslage im Magnetfeld abgelenkt werden. Dieses Phänomen wird als Grundlage aller MR-Techniken zur Bildgebung genutzt.

Im MR-Tomographen werden regellos orientierte Spins zunächst durch ein starkes Magnetfeld in einen Gleichgewichtszustand mit Nettomagnetisierung in Magnetfeldrichtung gebracht. Der Resonanzeffekt bewirkt beim Anlegen eines weiteren, senkrecht zum statischen Magnetfeld stehenden, rotierenden Magnetfeldes mittels einer Hochfrequenzspule beziehungsweise eines HF-Resonators die Auslenkung der Spins derselben Frequenz aus der longitudinalen Ausgangsebene in die Transversalebene. Die dadurch ausgelöste Larmorpräzession in Phase bei der Rückkehr des Systems in die thermodynamische Ausgangsgleichgewichtslage (Relaxation) ist dann in einer ortsfesten Hochfrequenzspule wieder quantitativ messbar, da die zuvor aufgenommene elektromagnetische Energie der Kerne mit der gleichen Frequenz der Energieaufnahme nun wieder abgegeben wird. Diese in der Empfangsspule induzierte Wechselspannung stellt das MR-Signal dar, welches nachfolgend mit Hilfe des Computers zur Bilderzeugung weiterverarbeitet wird [60].

## 2.2 Ortsauflösung und Bildkontrast im MRT

Die Ortsauflösung zur Darstellung inhomogener Objekte im Kernspintomographen erfolgt nach dem Prinzip der Fourier-Bildgebung, die 1975 von Kumar eingeführt wurde [29]. Dabei werden im statischen Hauptmagnetfeld zusätzlich magnetische Gradientenfelder angelegt, die das Magnetfeld ortsabhängig verändern. Für eine vollständige Ortskodierung werden drei Gradientenfelder kombiniert, so dass über alle drei Raumrichtungen ein Koordinatensystem mit spezifischen Feldstärken aufgespannt wird. Da die Frequenz der Präzession der Spins wie bereits erläutert abhängig von der Stärke des externen Magnetfeldes ist, ist es nun

möglich, die Spinensembles der einzelnen Voxel anhand ihrer Winkelgeschwindigkeiten ortsabhängig zu unterscheiden und damit auch ortsspezifisch anzuregen und zu messen. Zur Bildgebung wird jedes einzelne Voxel über den entsprechenden Hochfrequenzpuls gezielt angeregt und danach das Signal aufgezeichnet. Das endgültige MR-Bild des Tomographen entsteht dann in der Rekonstruktion durch Zusammenfügen aller einzelnen Bildbestandteile.

Die grundlegenden Parameter des Bildkontrasts bei der Erstellung von MR-Bildern sind die Spindichte in der Probe sowie die Relaxationseigenschaften der Kerne, außerdem spielen Flussgeschwindigkeiten und chemische Verschiebungen eine wichtige Rolle. Die Spindichte ist direkt proportional der Anzahl der anregbaren Kerne pro Volumeneinheit und damit Maßzahl der maximalen Signalstärke. Der Begriff der Relaxation beschreibt den Prozess der Rückkehr des Spinensembles ins Gleichgewicht nach Anregung. Unterschieden werden zwei charakteristische Zeitkonstanten, die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  und die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$ .  $T_1$  ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Rückkehr der Magnetisierung ins thermodynamische Gleichgewicht nach Anregung und beschreibt die Wechselwirkungen des Spinsystems mit der Umgebung.  $T_2$  ist ein Maß für den Zerfall der transversalen Magnetisierung beziehungsweise der festen Phasenbeziehung der Spins nach Anregung. Sie beschreibt den Verlauf des Energieaustausches der Spins untereinander, ohne Energieverlust nach außen.  $T_1$  und  $T_2$  zeigen einen exponentiellen Verlauf und liegen für biologisches Gewebe im Bereich von Millisekunden bis wenigen Sekunden, dabei ist  $T_1$  gewöhnlich größer als  $T_2$ . Den Umstand des in der Praxis aufgrund lokaler Magnetfeld-Inhomogenitäten beschleunigten Zerfalls der Transversalmagnetisierung berücksichtigt die effektive Zeitkonstante  $T_2^*$ , die zugehörige Messgröße ist der freie Induktionszerfall (engl.: free induction decay, FID) [60].

Da  $T_1$ ,  $T_2$  und  $T_2^*$  je nach Körpergewebe unterschiedliche Werte besitzen, bestimmen sie in erheblichem Maße den Kontrast im MR-Bild. Je nach

Messesequenz lassen sie sich durch Wahl unterschiedlicher Repetitionszeiten (engl.: time of repetition, TR; zeitlicher Abstand zweier Messungen) und Echozeiten (engl.: echo time, TE; zeitlicher Abstand zwischen Anregungspuls und Signalecho) unterschiedlich gewichten. Somit können durch Einsatz spezieller Sequenzen die MR-Bilder je nach Fragestellung nicht nur verschiedene Gewebe differenzieren, sondern beispielsweise auch pathologische Vorgänge oder Bewegungen sichtbar machen.

Voraussetzung eines guten Bildkontrastes ist außerdem ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch Verhältnis (engl.: signal to noise ratio, SNR). Das Rauschen entsteht durch vielfältige Faktoren in Probe, Spule und sonstigen Elektronikbauteilen und führt zur Störung des eigentlich zu messenden Signals. Bei niedrigem SNR, etwa bei sehr kleinen Voxelgrößen und entsprechend niedrigem Signal, kann über verlängerte Aufnahmezeiten oder mehrfache Mittelung wiederholter Messungen eine gewisse Bildverbesserung hergestellt werden. Allerdings steigt das SNR nur linear mit der Wurzel der Aufnahmezeit, daher kommt dem Quotient dieser beiden Größen als Effizienz einer Sequenz eine große Bedeutung in der praktischen MR-Anwendung zu.

## 2.3 Kardiale MR-Tomographie und Cine-Technik

Die Erstellung kardialer MR-Bilder ist im Vergleich zur Darstellung anderer Körperregionen aufgrund anatomischer und funktioneller Besonderheiten mit einigen Schwierigkeiten verbunden, die berücksichtigt werden müssen, um brauchbare Ergebnisse zu erzielen. Bedingt durch die rhythmischen Herzkontraktionen scheiden einfache Sequenzen, wie sie zur Darstellung unbewegter Körperteile verwendet werden, bereits größtenteils aus. Als zusätzliche Schwierigkeit kommt noch der relativ große Bewegungsumfang des gesamten Herzens während der Atmung hinzu. Auch die Bewegungen des Blutes führen zu raschen Verlagerungen der Spinensembles während der Messungen. Als Folge dieser Bewegungen kann es zu Effekten wie

Doppelbildern („Ghosting“), Verschmierungen („Blurring“) oder Signalauslöschung und damit zu unterschiedlichen Bildartefakten kommen [72]. Somit sind je nach Zielsetzung spezielle Aufnahmetechniken vonnöten, die teilweise einen hohen untersuchungstechnischen Aufwand bedingen.

Die Voraussetzungen aussagekräftiger MR-Bilder, hohe Auflösung und guter Kontrast, werden in der kardialen MRT nur durch den Einsatz sehr genauer und schnell zu schaltender Gradientensysteme und Spulen erreicht. Da die überwiegende Anzahl der derzeit verwendeten MR-Tomographen trotz großer Fortschritte auf diesem Gebiet für die Erstellung eines qualitativ hochwertigen Bildes immer noch deutlich längere Messzeiten benötigt als die Dauer eines Herzschlages, ist die Synchronisation der Bildgebungssequenzen mit der Herzfrequenz über eine elektrokardiographisch gesteuerte Triggerung gebräuchlich. Dabei wird stets in der gleichen Phase vieler aufeinander folgender Herzschläge nur ein Teil eines Bildes akquiriert, somit lassen sich Bilder eines bestimmten Zeitpunktes der Herzaktion ohne Bewegungsunschärfen darstellen. Die Zusammenstellung mehrerer solcher Bilder verschiedener Herzphasen einer Schicht in einer Filmschleife ermöglicht dann dem Betrachter eine visuelle Annäherung an die dynamische Herzaktion (Cine-Mode-Technik, [16]). Zur Elimination der Atmungsbewegungen gibt es neben der Möglichkeit der Beeinflussung der Atmung (z.B. Atemanhaltetechniken des Patienten, künstliche Beatmung von Versuchstieren und Einsatz von Atemtriggern) auch verschiedene technische Ansätze [14][18], die Bildqualität kann aber auch einfach durch vielfaches Mitteln verbessert werden. Bewegungsartefakte des Blutes können technisch durch den Einsatz einer Flusskompensation minimiert werden.

## 2.4 FLASH-Bildgebung

Für die Darstellung der kardialen Anatomie und Morphologie werden heute unter anderem erfolgreich Turbo-Spin-Echo-Sequenzen angewandt, die neben

gutem Gewebekontrast und hoher Auflösung auch den Vorteil bieten, inzwischen bereits verhältnismäßig gut ausgereift und praxiserprobt zu sein. Sollen außerdem Aussagen zur Funktion des Herzens gemacht werden, so ermöglicht die Anwendung der bereits erwähnten Cine-Technik die Gewinnung einiger zusätzlicher Informationen. Neben einer qualitativen Beurteilung der Anatomie und Kontraktilität besteht die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung der gewonnenen Bilder zur Bestimmung von Myokardmassen, Volumina und Wanddickenveränderungen [45][56]. Gut geeignet sind dazu Gradientenecho-Sequenzen wie die (Turbo-) FLASH- (engl.: fast low angle shot) Bildgebung [19], die eine hohe zeitliche Auflösung und durch Nutzung des Inflow-Effektes eine verbesserte Abgrenzbarkeit von Myokard und Blut ermöglicht. Durch Verwendung verhältnismäßig hoher Flip-Winkel (Auslenkung der Transversalmagnetisierung) in Kombination mit kurzen Repetitionszeiten und Hochfrequenz-Spoiling werden stationäre Spinensembles gesättigt und deren Signal damit unterdrückt. Spins, die die Bildebene rasch durchlaufen, erfahren dagegen nur wenige Anregungspulse und senden daher in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit, beziehungsweise der Verweildauer in der Bildebene, ungesättigtes hohes Signal. Als Folge davon erscheint das Blut im FLASH-Bild hell, sonstige Organe dunkel [15].

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

#### 3.1.1 Knockout-Mäuse

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an ausgewachsenen, etwa 9 bis 10 Monate alten Mäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Verschiedene Genotypen von Kreatinkinase- (CK) Knockout- (KO) Mäusen sollten mittels Cine-MRT in vivo kardial phänotypisiert und Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen aufgedeckt werden. Außerdem sollten die Auswirkungen eines chronischen Myokardinfarkts auf Herzmorphologie und -funktion von CK-KO-Mäusen erforscht werden. Dazu erfolgten entsprechende MR-Untersuchungen an infarzierten CK-KO-Mäusen mit anschließendem Vergleich der Ergebnisse, einerseits mit Wildtypen mit ebensolchen Myokardinfarkten, andererseits mit den nicht infarzierten CK-Knockout-Mäusen.

Für diese Arbeit standen drei verschiedene Stämme von genetisch veränderten Mäusen zur Verfügung, die in Bezug auf die jeweils ausgeknockten Gene sämtlich ein homozygoten Genom aufwiesen. Dies waren zum einen Tiere mit Knockout der Gene der „M“-Untereinheit der zytosolischen Isoenzyme der Kreatinkinase, wodurch sowohl CK-MM als auch CK-MB nicht synthetisiert werden können, nachfolgend wie in der Literatur üblich als M-CK<sup>-/-</sup> bezeichnet. Außerdem Mäuse mit Knockout des sarkomerischen mitochondrialen Isoenzym (Mito-CK<sup>-/-</sup>) und schließlich Tiere mit einem kombinierten Knockout von M-CK und Mito-CK, M/Mito-CK<sup>-/-</sup>. Bezogen wurden die Mäuse der Knockout-Stämme von Dr. Bé Wieringa, Universität Nijmegen, Niederlande, in dessen Arbeitsgruppe die drei Genotypen auch zuerst beschrieben wurden [12][61][62]. Die verschiedenen CK-Knockout-Mäuse wurden aus den gleichen Mauszuchtstämmen (Blastozysten von C57BL/6- und embryonale Stammzellen von 129/Sv-Mäusen) herangezogen, so dass mit Ausnahme der für die Bildung

der verschiedenen Formen der Kreatinkinase verantwortlichen Gene von einer hohen Übereinstimmung der Erbmassen aller drei Genotypen ausgegangen werden kann. Die verbliebene CK-Gesamtaktivität im Myokard wurde bereits in früheren Untersuchungen eruiert. Sie beträgt bei den Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen etwa 70 % des Vergleichswertes von Wildtyp-Mäusen [13][61], bei Mäusen des M-CK<sup>-/-</sup>-Stammes liegt der Wert bei circa 28 % [13][53] und bei den M/Mito-CK<sup>-/-</sup> je nach Quelle bei ungefähr 1-4 % [24][53], bedingt durch in Spuren im Myokard vorhandene CK-BB.

Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Alle Versuchstiere wurden unter Beachtung der europäischen Richtlinien für die Versorgung und Verwendung von Labortieren während der gesamten Studie in Kunststoffkäfigen in einem klimatisierten Tierstall bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus sowie Futter und Wasser ad libidum gehalten.

### *3.1.2 Infarzierung*

Zur Untersuchung der Auswirkungen eines Myokardinfarktes bei CK-Knockout wurden zwei Infarkt-Versuchsgruppen mit Mäusen der Genotypen Wildtyp und M/Mito-CK<sup>-/-</sup> gebildet. Bei diesen wurde durch permanente Ligatur des distalen Teils des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (engl.: left anterior descendens, LAD) ein chronischer anterolateraler Myokardinfarkt der linken Herzkammer erzeugt. Der Myokardinfarkt liegt bei dieser Art der Infarzierung aufgrund der anatomischen Gegebenheiten am Mäuseherzen dem Ventrikelseptum gegenüber, dieses ist ebenso wie der rechte Ventrikel normalerweise nicht vom Infarkt betroffen.

Vor Beginn wurden die Mäuse zunächst in einer Glasglocke mit einem 5%igen Isofluran-Sauerstoffgemisch narkotisiert, dann erfolgten die Intubation mit Hilfe einer Braunüle und der Anschluss an ein Beatmungsgerät für Kleintiere (Typ 7025 Rodent Ventilator, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland). Beatmet wurde

mit reinem Sauerstoff bei einem Atemhubvolumen von 250 $\mu$ l und einer Frequenz von 90/min. Über einen an den Respirator angeschlossenen Vapor wurde während der gesamten Operation die Narkose mit etwa 2,5 Volumenprozent Isofluran aufrechterhalten (Isofluran „Forene“, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland, über Vaporisator „Isoflurane Vapor“, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland).

Als nächstes wurde die Haut sowie die darunter liegende pectorale Muskulatur im ventralen linken Thoraxbereich mit einer Schere durchtrennt und mit lockeren Tabaksbeutelnähten versehen. Mit Hilfe eines Hitzekauters für Kleintiere wurde daraufhin im Bereich der 6./7. Rippe durch intercostalen Schnitt die Thoraxhöhle eröffnet. Die Rippen wurden durch Anlage einer kleinen Klemme gespreizt, das Perikard eröffnet und anschließend das Herz durch leichten Druck auf den Thorax aus dem Perikardsack luxiert. Nun konnte der Zugang zum Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie erfolgen. Dieser wurde durch Durchstechen des Myokards unterhalb der Arterie im entsprechenden Bereich und anschließender Ligatur mit einem 6/0 Prolene-Faden (nicht resorbierbar) verschlossen. Je nach individueller Koronar-Anatomie des Versuchstieres und genauer Lage des Fadens bildete sich so im Folgenden ein unterschiedlich großer Anterolateralinfarkt aus, was direkt während der Operation an der Weißfärbung des betroffenen Myokards erkennbar war.

Nach Anlage der Ligatur wurde das Herz in die ursprüngliche Lage im Thorax repositioniert, dieser mit Hilfe der anfangs angelegten Tabaksbeutelnähte wieder verschlossen und zuletzt die Haut vernäht. Nach Abstellen der Isofluranzufuhr wurden die Tiere bis zum Wiedereintritt der Spontanatmung weiter mit Sauerstoff beatmet, anschließend extubiert und zurück in die Käfige gesetzt. Dort verblieben sie bis zum Beginn der MRT-Untersuchungen vier Wochen später ohne weitere besondere Behandlung.

### 3.1.3 Versuchsgruppen

Insgesamt umfasste die Studie 63 Mäuse, gebildet wurden sechs verschiedene Untersuchungsgruppen mit jeweils ausgeglichenem Geschlechterverhältnis.

Zunächst sollte die Fragestellung nach dem nativen kardialen Phänotyp der Mäuse der verschiedenen Genotypen in vivo untersucht werden. Dafür wurden vier Versuchsgruppen gebildet. Dies waren nicht operierte Mäuse der vier Genotypen M-CK<sup>-/-</sup> (n=10), Mito-CK<sup>-/-</sup> (n=6), M/Mito-CK<sup>-/-</sup> (n=10) sowie Wildtyp (n=10). Die Auswirkungen eines chronischen Myokardinfarktes bei CK-defizienten Mäusen wurden anhand der infarzierten Mäuse in zwei weiteren Gruppen untersucht, MI Wildtyp (n=12) und MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> (n=15). Der Messzeitpunkt im MRT lag jeweils genau vier Wochen nach Durchführung der Infarzierung.

## 3.2 MR-Tomographie

### 3.2.1 Biospec-System

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an einem Biospec 70/20 NMR-Tomographen der Firma Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt. Kernstück dieses Gerätes ist eine supraleitende Spule mit einer magnetischen Feldstärke von 7,05 Tesla, für Protonen ergibt sich somit eine Larmorfrequenz von 300,3 MHz. Die horizontal orientierte Bohrung besitzt einen Durchmesser von 21 cm, der nutzbare Messbereich entlang dieser Achse beträgt 7,2 cm. Ein Shim-System mit insgesamt 15 Spulen dient der Korrektur auftretender Magnetfeldverzerrungen. Angesteuert wird der Tomograph über einen Aspect 3001 / X32 Rechner. Das Steuerprogramm UXNMR 9610 erlaubte die Datenakquisition und nachfolgende Rekonstruktion der Bilder.

In das fest im Tomographen installierte Gradientensystem S116 wurde mit Hilfe einer Positionierhilfe [27] zusätzlich das Bruker Mikroskopiegradientensystem

G060 eingebaut, welches mit einem Innendurchmesser von 6 cm, einer maximalen Gradientenstärke von 870 mT/m und einer Schaltzeit von 280  $\mu$ s (-100% bis +100%) die technischen Voraussetzungen zur kardialen MR-Tomographie an Mäusen erfüllte. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Abstandes wurde als Hochfrequenz-Spule zusätzlich ein eigens für Mäuse optimierter achtbeiniger Birdcage-Resonator [30][31] mit einem Innendurchmesser von 3,5 cm eingebaut. Für die Messungen wurden kürzlich in unserer Arbeitsgruppe etablierte Bildgebungssequenzen und Automations-Routinen verwendet, die im Rahmen einer abgeschlossenen Dissertation speziell für die Bildgebung an Mäusen entwickelt beziehungsweise optimiert wurden [51].

### *3.2.2 Versuchsvorbereitungen*

Zur Durchführung der Messungen wurden die Mäuse zunächst narkotisiert und auf dem Wärmekissen einer Kunststoff-Trägerschiene fixiert. Nach Anbringen der EKG-Elektroden wurden sie dann auf der Schiene in den Tomographen eingebracht.

Die Narkose erfolgte mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran „Forene“ (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Nach Narkoseeinleitung in einer Glasglocke mit 4 Vol.% Isofluran in reinem Sauerstoff erfolgte die Aufrechterhaltung während der gesamten Messungen über eine Atemmaske mit 1,5 Vol.% Isofluran in 1,5 l O<sub>2</sub> pro Minute. Das Mischungsverhältnis erzeugte ein Vaporisator „Isoflurane Vapor“ (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland), über den das Mischungsverhältnis jederzeit stufenlos geregelt werden konnte. Isofluran bewirkt in den verwendeten Konzentrationen eine leichte Atemdepression, die Versuchstiere fallen von Beginn der Narkose an in eine Schnappatmung mit verhältnismäßig langen Atempausen zwischen sehr tiefen Atemzügen, die Herzfrequenz wird dagegen so gut wie nicht beeinflusst [50].

Damit waren gute Voraussetzungen für die Erstellung artefaktarmer, aussagekräftiger MR-Bilder des Herzen gegeben.

Als Unterlage auf der Arbeitsschiene wurde eine elektrisch betriebene Wärmematte verwendet, die auf etwa 40°C erwärmt wurde und während der gesamten Versuchsdauer in Betrieb war, um ein zu starkes Auskühlen der narkotisierten Versuchstiere während der Messungen im gekühlten MRT zu verhindern. Um Cine-Bildaufnahmen der Herzaktion ohne Bewegungsartefakte erstellen zu können, wurden die Pulssequenzen über ein Elektrokardiographie-Gerät getriggert. Die Akquisition der einzelnen Bilder konnte so über mehrere Herzzyklen verteilt zu definierten Zeitpunkten des Herzzyklus erfolgen. Einem guten EKG-Signal kam dabei eine entscheidende Bedeutung bei der Erstellung kontrastreicher und artefaktfreier MR-Bilder zu. Die Ableitung des EKG-Signals erfolgte über beide Vorderpfoten der Mäuse mit Hilfe selbstklebender Kupferfolie und Elektrodengel, womit ein großflächiger, verletzungsfreier Kontakt erreicht werden konnte. Die Folie wurde mittels eines kurzen Silberdrahtes mit einem abgeschirmten BNC-Kabel verbunden, über welches das Signal an eine speziell für Mäuse optimierte EKG-Einheit geleitet wurde [49].

Neben der Triggerung der MR-Sequenz diente das EKG-Gerät der Ermittlung der Herzfrequenz, die während der Messungen wiederholt abgelesen und für die spätere Bestimmung der Herzfunktion notiert wurde. Außerdem konnte über die Darstellung im EKG die Atemfrequenz überwacht und nötigenfalls die Narkosetiefe angepasst werden.

### *3.2.3 FLASH-Cine-Gradientenecho*

Die MR-Bildgebung am Herzen der Maus begann mit der Messung des arteriellen Blutflusses im Jahr 1991 [8]. Seitdem wurden die Untersuchungsmöglichkeiten des Mäuseherzens im MRT stetig verbessert, im Rahmen einer Dissertation konnte einige Jahre später an unserem Institut die

Cine-Bildgebung am Mäuseherzen mit Hilfe schneller FLASH- (engl.: fast low angle shot) Sequenzen etabliert werden, welche unter anderem eine präzise Funktionsanalyse des Mäuseherzens erlaubt [51][52].

Die MR-Bildgebung erfolgte nach Einbringen der wie beschrieben vorbereiteten Maus mitsamt der Arbeitsschiene in den Birdcage-Resonator im Tomographen. Grundlage der Cine-Aufnahmen bildete eine EKG-getriggerte FLASH-Gradientenechosequenz, um ventrikuläre Kurzachsschichten des Herzens zu erstellen, welche die Basis der späteren Auswertungen bildeten. Dazu wurde eine dafür entwickelte Automationsroutine verwendet, die für die hier vorgenommenen Versuche weiter angepasst und bei Bedarf leicht abgeändert werden konnte.

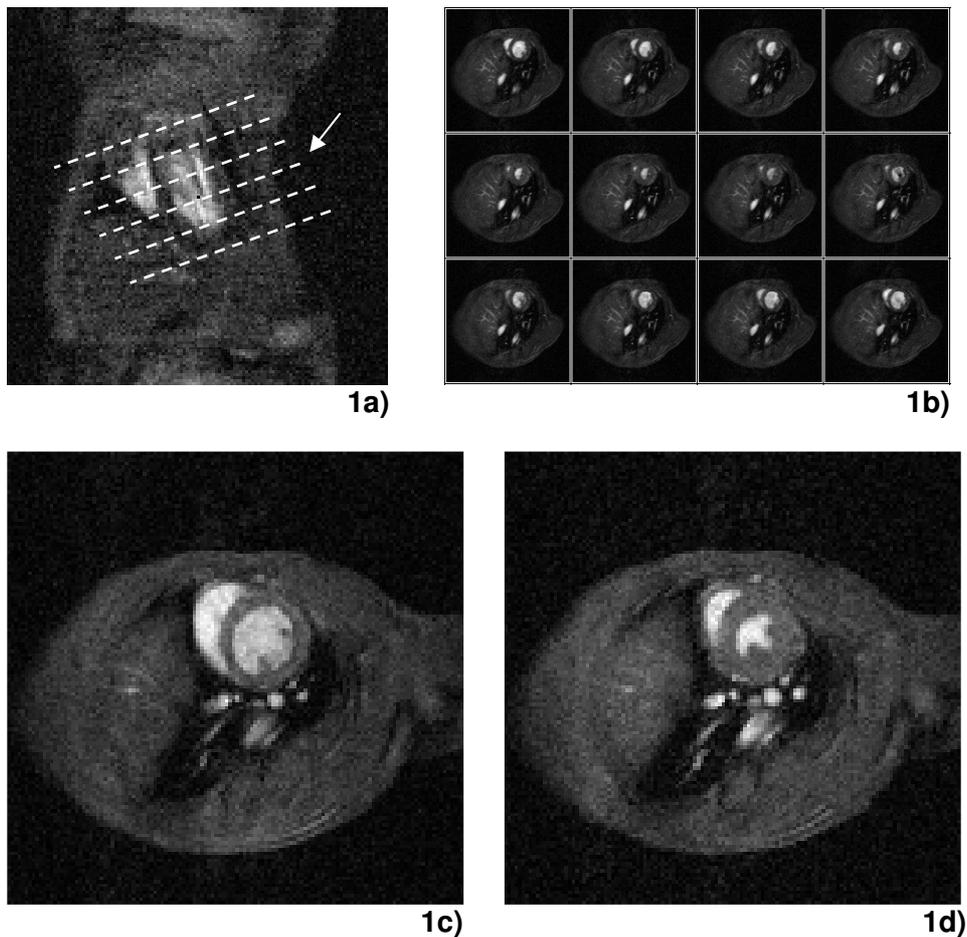
Eine Cine-Bildserie besteht aus mehreren Einzelbildern der gleichen Schicht, die in gleichmäßigem Abstand zeitversetzt über die Dauer eines vielfach gemittelten Herzschlages aufgenommen werden. Bei bewegten Objekten wie dem Herz entsteht dann durch Zusammenfassen der zu unterschiedlichen Herzaktionsphasen aufgenommenen MRT-Bilder in einer raschen Endlosbildfolge der „Kino-Effekt“, die Bildfolge kann als Film betrachtet werden. Auf diese Weise kann die Herzaktion gut beurteilt werden, in der vorliegenden Arbeit wichtig speziell für das Erkennen dyskinetischer Areale etwa im Infarkttrandgebiet, die anhand einzelner Bilder nur schwer als Teil des Infarktes zu identifizieren sind. Außerdem ist die Cine-Technik bei korrekter Wahl von Beginn und Dauer der Bildfolge relativ zum Herzschlag eine sichere Methode zur Aufnahme endsystolischer MR-Bilder. Während es sonst mit großen Schwierigkeiten verbunden ist, genau diese relativ kurze Herzphase gezielt abzubilden, kann bei einer Cine-Bildserie nachträglich das entsprechende Bild ausgewählt werden. Voraussetzung für die Qualität dieser Bilder ist eine ausreichend kurze Akquisitionszeit der einzelnen Bildteile, um trotz schneller Bewegungen Bewegungsunschärfe zu vermeiden. Außerdem muss eine rasche Bildfolge sicherstellen, dass die kurze Phase der Endsystole abgebildet ist.

Das Mäuseherz schlägt in Ruhe etwa 500-mal pro Minute, ein Herzzyklus dauert damit circa 120 ms. Um auch während der schnellen Bewegung der Systole ausreichend scharfe Bilder zu erhalten, erwies sich ein Zeitfenster von 10 ms für die Akquisition der Bilddaten noch als ausreichend. Somit sollten also mindesten 12 Bilder hintereinander pro Cine-Bildserie erstellt werden, um jede Herzphase scharf abzubilden. Da mit der verfügbaren Technik in der kurzen Zeitspanne von 10 ms kein vollständiges Bild der gewünschten Qualität erstellt werden konnte, wurde die Akquisition mit Hilfe des EKG-Triggers über 128 Herzzyklen segmentiert. Mit der verwendeten segmentierten FLASH-Cine-Gradientenecho-Sequenz wird während jedes Herzschlages nur eine k-Raum-Zeile aller Bilder einer Bildserie hintereinander aufgenommen, dann folgt mit dem nächsten Phasenkodierschritt im nächsten Herzschlag die nächste Zeile. Während der Rekonstruktion ergibt das Zusammenfügen aller Zeilen getrennt nach Herzphasen die rekonstruierten Cine-Bilder. Bei einer Echozeit (TE) von 1,5 ms und einer Repetitionszeit (TR) von 4,3 ms konnte in dieser Arbeit jedes Bildexperiment zweimal direkt nacheinander ausgeführt und dann gemittelt werden, so dass die Gesamtakquisitionszeit (engl.: total acquisition time, TAT) um die Hälfte verkürzt werden konnte. Um achtfach gemittelte Bilder zu erhalten, wurde außerdem jede Messung viermal hintereinander durchgeführt. TAT jeder Bildserie einer Schicht betrug also bei 128 Phasenkodierschritten etwa 60 - 90 Sekunden ( $\text{Herzzykluslänge} \cdot 4 \cdot 128$ ) für achtfach gemittelte Bilder.

Bei einem Sichtfeld von 30x30 mm und einer Bildmatrix von 128x128 lag die Bildauflösung bei 234x234  $\mu\text{m}$ . Der Kontrast wurde bei den verwendeten Sequenzen durch den Inflow-Effekt entscheidend verbessert, da rasch bewegtes Blut bei kleinen Anregungsschichtdicken hohes Signal („weiß“) sendet, während bei stationären Spins im Myokard durch Sättigungseffekte eine Signalunterdrückung eintritt. Zusätzlich bedingte die Aufnahmetechnik (kurze TE) noch eine gewisse Fettunterdrückung.

Die Bilder wurden als ventrikuläre Kurzachsschichten aufgenommen. In einer ersten Scout-Aufnahme wurde zunächst der Bildausschnitt kontrolliert und gegebenenfalls durch Neupositionierung der Maus optimiert. Dann wurde mit Hilfe von weiteren Scout-Schichten der Aufnahme- und Abbildungswinkel so eingestellt, dass die letztlich zur Auswertung herangezogenen Bildschichten alle parallel zu einer Schicht lagen, die den linken Ventrikel im  $90^\circ$  Winkel zur langen Achse des linken Ventrikels schneidet (Abbildung 1). Auf diese Weise konnte die Wanddicke des Myokards in der mittig durch die linke Kammer verlaufenden Schicht genau beurteilt werden. Bei einer Schichtdicke von 1 mm wurden auf diese Weise 10 bis 14 kontinuierlich aufeinander folgende, parallel verlaufende ventrikuläre Kurzachsschicht-Bildserien von einem Herzzyklus erstellt. Die auf diese Weise gewonnenen MRT-Bilder dienten als Grundlage für die Berechnung der kardialen Parameter [28].

Die Versuchstiere erwachten aus der Maskennarkose kurz nach Ende der Isofluranzufuhr und konnten schon nach etwa 5 Minuten zurück in die Käfige gesetzt werden.



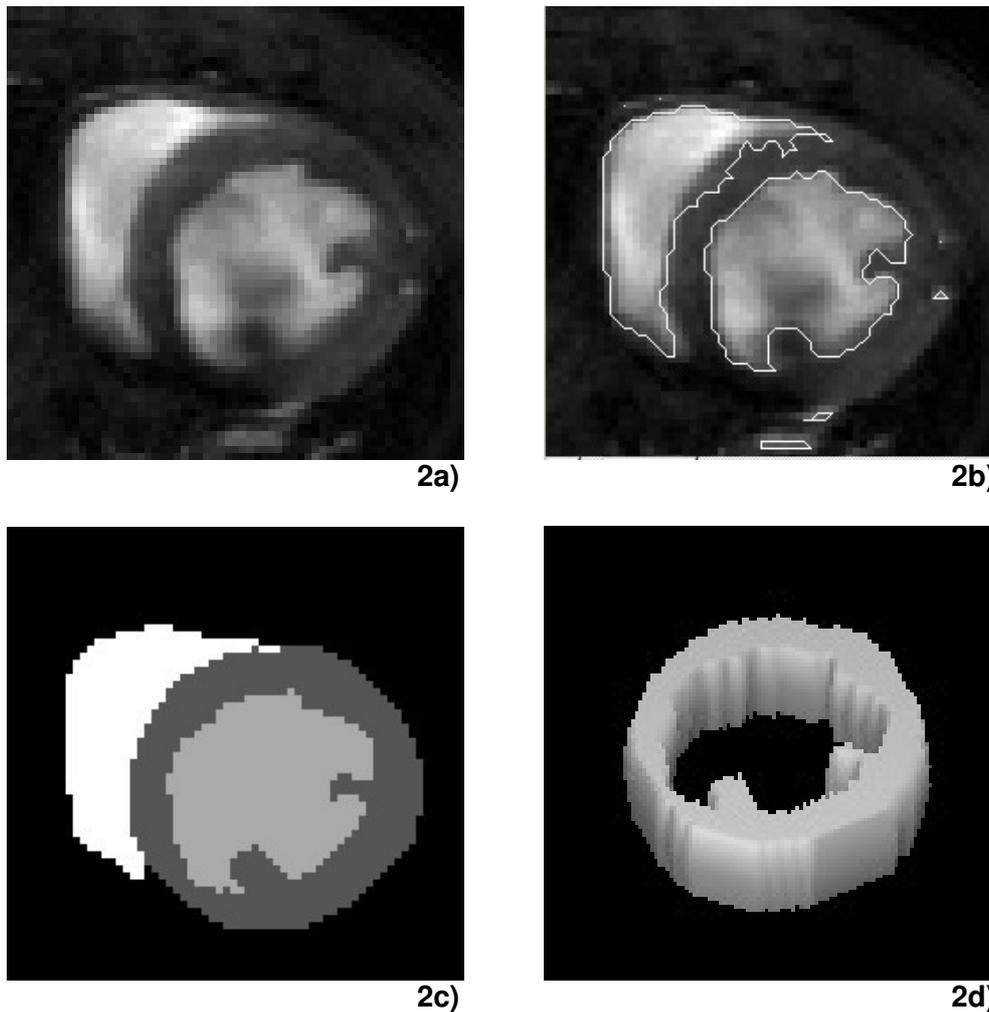
**Abbildungen 1a bis d:** NMR-Tomographie am Herzens der Maus. 1a) zeigt ein Scoutschicht-Bild, wie es zum Festlegen der endgültigen Schichtführung angefertigt wurde. Zu sehen ist ein koronarer Schnitt des Herzens (lange Herzachse), trotz reduzierter Qualität (Scoutaufnahme) sind Myokard und Ventrikel beider Herzkammern deutlich zu erkennen. Der spätere Verlauf der Cine-Bildschichten ist skizziert. Der Pfeil markiert die ungefähre Schnittebene der unter 1b) gezeigten Cine-FLASH-Bildserie, die 12 Phasen eines gemittelten Herzschlages derselben Bildebene abbildet. Die Abbildungen 1c) und 1d) zeigen zwei solche Bilder vergrößert, und zwar aus Enddiastole (c) und Endsystole (d). Zu sehen ist hier ein Schnitt durch den gesamten Körper der Maus, das Myokard des linken Ventrikels zeichnet sich in diesen Kurzachsschichten als kreisrunder Ring ab, dem der rechte Ventrikel anliegt. Das Blut in den Ventrikeln erscheint aufgrund des Inflow-Effektes weiß, in der linken Kammer sind deutlich zwei Papillarmuskeln zu erkennen.

### 3.3 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe eines speziell entwickelten Benutzerinteraktiven Auswertungsprogramms auf Basis der Programmiersprache Interactive Data Language (IDL, Research Systems Inc., Boulder, USA). Die entwickelten Routinen erlaubten eine halbautomatische Weiterverarbeitung und Auswertung der Daten.

Zunächst wurden für jede Schicht die beiden Bilder der Enddiastole als Phase der größten und der Endsystole als Phase der geringsten Ventrikelfüllung definiert. In beiden Schnitten wurde dann das Herz segmentiert indem die Ausdehnung der verschiedenen Kompartimente teils per Hand, teils programmunterstützt festgelegt wurde (Abbildungen 2a-d). Anhand dieser Kompartimente erfolgte die Bestimmung von Myokardvolumen, enddiastolischem und endsystolischem Volumen des linken und rechten Ventrikels sowie der Wanddicken. Aus diesen Messgrößen konnten dann funktionelle Parameter wie Schlagvolumen oder prozentuale systolische Wanddickenzunahme errechnet werden.

Zunächst wurde die Myokardmasse des linken Ventrikels bestimmt, dafür dienten die enddiastolischen Bilder. Die Fläche des Myokards des linken Ventrikels jeder einzelnen Schicht wurde mit der Schichtdicke (1 mm) multipliziert und die so errechneten Volumina sämtlicher Schichten addiert. Die linksventrikuläre Masse wurde dann als Produkt von linksventrikulärem Myokardvolumen und der spezifischen Myokarddichte (1,05 g/ml) definiert.



**Abbildungen 2a bis d:** Die Bildfolge zeigt beispielhaft vier Arbeitsschritte zur Bestimmung der Myokardmasse. Nach Bestimmung des enddiastolischen MRT-Bildes jeder einzelnen Schicht (2a) konnten die Kompartimente der beiden Ventrikel mit Hilfe des Auswertungsprogramms zunächst halbautomatisch grob festgelegt werden (2b). Zur exakten Bestimmung der einzelnen Parameter wie in 2c) wurden die Kompartimente von linksventrikulärem Myokard (dunkelgrau) sowie linkem (hellgrau) und rechtem Ventrikel (weiß) dann manuell präzisiert. 2d) zeigt das resultierende Kompartiment des linksventrikulären Myokards dieser Schicht, welches schließlich in die Myokardmassen-Berechnung einfließt.

Enddiastolisches und endsystolisches linksventrikuläres Volumen (LV EDV und LV ESV) wurden berechnet, indem analog zur Myokardvolumen-Errechnung die jeweiligen Kammervolumina aller Schichten aus Enddiastole beziehungsweise Endsystole aufaddiert wurden. Sie entsprechen dem Blutvolumen im Ventrikel, die Papillarmuskeln wurden zum Myokard und nicht zum Blutvolumen gezählt. Das Schlagvolumen wurde dann aus der Differenz von enddiastolischem und endsystolischem Volumen bestimmt:

$$SV = EDV - ESV .$$

Die Ejektionsfraktion bezeichnet das Verhältnis des Schlagvolumens zum enddiastolischen Volumen in Prozent:

$$EF = \frac{EDV - ESV}{EDV} * 100 .$$

Um das Herzzeitvolumen (HZV) zu erhalten wurde das Schlagvolumen mit der Anzahl der Herzschläge pro Minute während der Messung multipliziert.

Für die Bestimmung der linksventrikulären Wanddicke wurde die mittventrikuläre Schicht herangezogen. Hier wurde die durchschnittliche Myokarddicke der Wand in der Enddiastole (LV EDWD) sowie in der Endsystole (LV ESWD) bestimmt. Das Septum wurde dabei komplett zum linken Ventrikel gezählt, einzelne erkennbare Papillarmuskeln wurden in der Wanddickenbestimmung nicht berücksichtigt. Die absolute systolische Wanddickenzunahme wurde als Differenz dieser beiden Werte errechnet:

$$SWDZ = ESWD - EDWD .$$

Die Differenz von systolischem und diastolischem Wert geteilt durch den diastolischen Wert und multipliziert mit 100 ergab die prozentuale systolische Wanddickenzunahme:

$$\%SWDZ = \frac{ESWD - EDWD}{EDWD} * 100 .$$

Bei Mäusen mit Myokardinfarkt (MI) beziehen sich alle vorgenannten gemessenen Wanddickenparameter ausschließlich auf das gesunde Myokard. Die minimale Narbendicke im Infarktbereich (MIWD) wurde bei diesen Tieren gesondert bestimmt.

Die Bestimmung der Funktionsparameter des rechten Ventrikels (RV) erfolgte analog zu denen der linken Herzkammer. Auf die Erfassung der rechtsventrikulären Masse wurde verzichtet, da die Bildauflösung (234  $\mu\text{m}$ ) hier Grenzen setzte.

Die MI-Größenbestimmung bei infarzierten Tieren erfolgte ebenfalls durch Auswertung der Cine-MRT-Bilder. Die verwendete Methode wurde in Anlehnung an die histologische MI-Größenbestimmung nach Pfeffer et al. [44] für das Cine-MRT angepasst. Die Infarktareale wurden zunächst qualitativ anhand von deutlicher Myokardverschmälerung sowie Dys- beziehungsweise Akinesie in der Cine-Sequenz festgelegt. Dann wurde für jede Schicht endo- sowie „epikardialer“ (äußerer) Umfang dieser Areale in der Enddiastole addiert. Diese Werte wurden von allen Schichten addiert und das Ergebnis durch die Summe des endo- und epikardialen enddiastolischen Gesamtumfangs des linken Ventrikels aller Schichten geteilt. Nach der gleichen Methode wurde auch in der Endsystole das Infarktgebiet ermittelt und schließlich der Mittelwert von Enddiastole und Endsystole gebildet. Die Übertragbarkeit dieser ursprünglich histologischen Größenbestimmungsmethode auf das Cine-MRT wurde an Ratten gezeigt [39].

Die Datensätze wurden geblindet ausgewertet und danach den Versuchsgruppen zugeordnet. Da die kardialen Parameter Myokardmasse, Ventrikelvolumen und Herzzeitvolumen unter anderem vom Körpergewicht abhängen [57], wurden bei diesen Parametern zusätzlich zu den absoluten Werten Indices dieser Ergebnisse bezogen auf das Körpergewicht der jeweiligen Versuchstiere gebildet, sofern Körpergewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestanden.

### 3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Excel XP (Microsoft, USA) und WinSTAT 3.1 (Kalmia Co. Inc., Cambridge, USA). Die gemessenen Daten werden im Ergebnisteil sofern nicht anders angegeben als arithmetische Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Zur Beurteilung der Signifikanz von Unterschieden zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen wurde eine Analyse der Varianz zwischen mehreren Gruppen (engl.: analysis of variances between groups, ANOVA) mit anschließendem post-hoc-Test nach Duncan durchgeführt. Wurden lediglich zwei Gruppen miteinander oder zwei Parameter innerhalb einer Gruppe verglichen, so geschah dies mit Hilfe eines Student-t-Tests. Um Wechselbeziehungen zwischen einzelnen Parametern statistisch zu belegen, wurde im Bedarfsfall der Korrelationskoeffizient (Rangkorrelation von Spearman, bei kleinen Fallzahlen mit Ausreißern zusätzlich Kendalls Tau) bestimmt. Sofern nicht anders angegeben werden im Ergebnisteil die Korrelationskoeffizienten nach Spearman aufgeführt. Für alle statistischen Tests wurde als statistisch relevantes Signifikanzniveau ein p-Wert von  $< 0,05$  festgelegt, das heißt Unterschiede wurden bei einem Wahrscheinlichkeitswert unterhalb von 0,05 als signifikant erachtet und sind dann entsprechend gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Tiere ohne Myokardinfarkt

In diesem Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen der nicht infarzierten Mäuse dargestellt. Mäuse ohne Myokardinfarkt wurden wie folgt untersucht: 10 Tiere des Genotyps Wildtyp (WT), 10 mit Knockout (KO) der muskulären zytosolischen Kreatinkinase (M-CK<sup>-/-</sup>), 6 mit KO der mitochondrialen Kreatinkinase (Mito-CK<sup>-/-</sup>) sowie 10 mit kombiniertem Knockout der muskulären zytosolischen und der mitochondrialen Kreatinkinase (M/Mito-CK<sup>-/-</sup>), insgesamt also 36 Tiere. Alle Gruppen wiesen ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis auf. Das durchschnittliche Lebensalter zum Versuchszeitpunkt lag in allen Versuchsgruppen bei 41±2 Wochen. Alle Tiere überlebten Narkose und NMR-Untersuchungen.

Das Körpergewicht der Mäuse, gemessen direkt im Anschluss an die MR-Tomographie, war in allen vier Versuchsgruppen vergleichbar (Tabelle 1), bei einem gemessenen Mittelwert sämtlicher Tiere von 26,9±2,9 g (Mittelwert ± Standardabweichung). Die gemittelte Herzfrequenz während der NMR-Aufnahmen zeigte mit Mittelwerten zwischen 401±58 und 471±35 Schlägen pro Minute ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen.

	<b>Wildtyp</b> n=10	<b>M-CK<sup>-/-</sup></b> n=10	<b>Mito-CK<sup>-/-</sup></b> n=6	<b>M/Mito-CK<sup>-/-</sup></b> n=10
Körpergewicht (g)	26,2±0,8	26,2±1,1	28,2±1,4	27,4±0,7
Herzfrequenz /min	435±30	407±19	401±58	471±35

**Tabelle 1:** Gemessene Körpergewichte und Herzfrequenzen der nicht infarzierten Versuchstiere (Mittelwerte ± Standardfehler).

### 4.1.1 Linksventrikuläre Parameter

Die Bestimmung der kardialen Morphologie und Funktion mittels Cine-Bildgebung zeigte deutliche Unterschiede der linksventrikulären Parameter der verschiedenen Kreatinkinase-Knockout- sowie der Wildtyp-Mäuse auf.

LV-Parameter	Wildtyp n=10	M-CK <sup>-/-</sup> n=10	Mito-CK <sup>-/-</sup> n=6	M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=10
Masse (mg)	99,6±4,2	132,3±6,4 *	172,8±12,0 *†	163,1±8,6 *†
EDV (μl)	70,0±3,1	65,8±3,5	92,9±5,3 *†	88,9±5,1 *†
ESV (μl)	25,5±2,2	22,4±2,9	32,3±3,0	34,5±4,5 †
EF (%)	64±3	67±3	65±3	62±3
SV (μl)	44,5±2,8	43,3±1,9	60,6±4,6 *†	54,4±2,9 *†
HZV (ml/min)	19,2±1,6	17,7±1,2	23,3±2,5	25,6±2,3 *†
EDWD (mm)	0,85±0,02	1,00±0,04 *	1,15±0,03 *†	1,11±0,04 *†
ESWD (mm)	1,36±0,05	1,57±0,04 *	1,65±0,10 *	1,56±0,04 *
SWDZ (mm)	0,51±0,05	0,58±0,04	0,50±0,09	0,45±0,03
%SWDZ (%)	61±6	59±4	44±8	41±4 *†

**Tabelle 2:** Linksventrikuläre (LV) Massen-, Volumen- und Funktionsparameter der nicht infarzierten Versuchstiere. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte ± Standardfehler.

\* p < 0,05 gegenüber Wildtyp; † p < 0,05 gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>.

Masse = Myokardmasse;

EDV = enddiastolisches Volumen; ESV = endsystolisches Volumen;

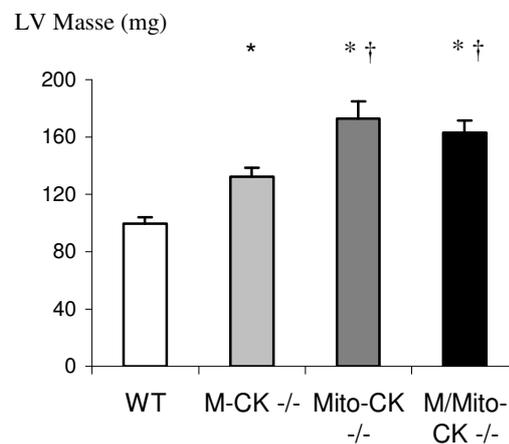
EF = Ejektionsfraktion; SV = Schlagvolumen; HZV = Herzzeitvolumen;

EDWD = enddiastolische Wanddicke; ESWD = endsystolische Wanddicke;

SWDZ = absolute systolische Wanddickenzunahme;

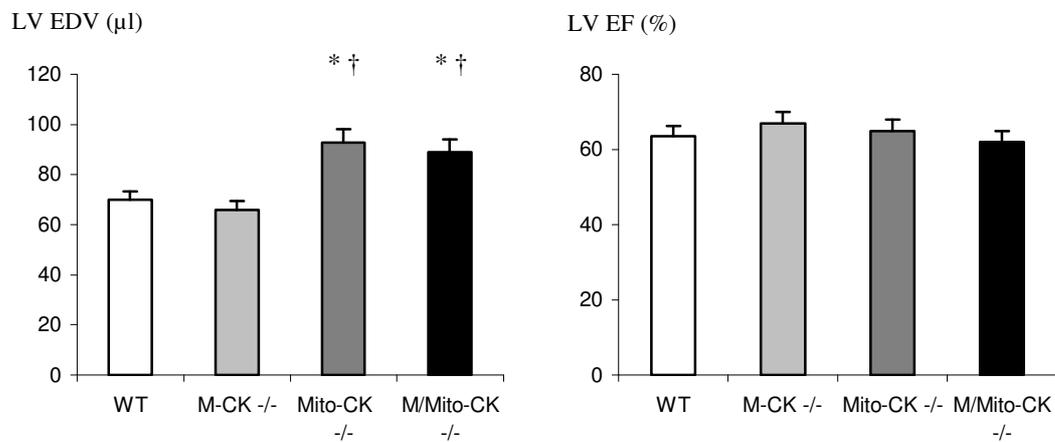
%SWDZ = prozentuale systolische Wanddickenzunahme

Die linksventrikuläre Myokardmasse der Tiere aller drei Knockout-Gruppen war gegenüber den Wildtyp-Mäusen (LV Masse  $99,6 \pm 4,2$  mg) signifikant erhöht (Tabelle 2; Abbildung 3), doch in unterschiedlicher Ausprägung. Eine sehr deutliche Erhöhung der LV Masse zeigten die Mito-CK<sup>-/-</sup> ( $172,8 \pm 12,0$  mg, +73% gegenüber WT) und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $163,1 \pm 8,6$  mg, +64% gegenüber WT). Bei den M-CK<sup>-/-</sup>-Tieren war diese Massenerhöhung ( $132,3 \pm 6,4$  mg, +33% gegenüber WT) wesentlich geringer ausgeprägt. Beide erstgenannten Gruppen zeigten damit gleichzeitig auch signifikant höhere Herzgewichte gegenüber den M-CK<sup>-/-</sup> (Mito-CK<sup>-/-</sup> +31%, M/Mito-CK<sup>-/-</sup> +23%).



**Abbildung 3:** Linksventrikuläre (LV) Myokardmasse von Wildtyp- und CK-Knockout-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte jeder Gruppe sowie deren Standardfehler. \*  $p < 0,05$  gegenüber WT; †  $p < 0,05$  gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>.

Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LV EDV) war bei den M-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber den Wildtypen nicht verändert (Tabelle 2; Abbildung 4a). Bei den Mito-CK<sup>-/-</sup> war LV EDV mit +33% gegenüber Wildtyp und +41% gegenüber M-CK<sup>-/-</sup> signifikant größer. Ähnliche Werte zeigten auch die M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse, LV EDV zeigte sich hier im Vergleich zu den Wildtypen um 27% erhöht, gegenüber M-CK<sup>-/-</sup> um 35% ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ).

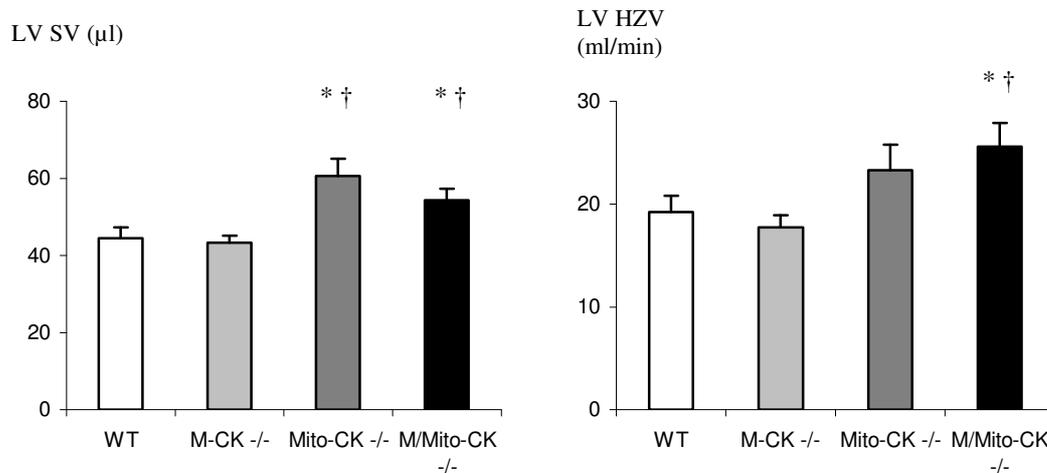


**Abbildungen 4a und b:** Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LV EDV) und Ejektionsfraktion (EF) von Wildtyp- und CK-Knockout-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen sowie deren Standardfehler.

\*  $p < 0,05$  gegen WT; †  $p < 0,05$  gegen M-CK<sup>-/-</sup>.

Auch beim Vergleich der endsystolischen linksventrikulären Volumina (LV ESV) waren die Mittelwerte der Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse tendenziell gegenüber WT und M-CK<sup>-/-</sup> erhöht, signifikante Unterschiede zeigten sich nur im Vergleich des LV ESV der M/Mito-CK<sup>-/-</sup> mit den M-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen (mit um +54% erhöhtem endsystolischem Volumen bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup>).

Die Errechnung der linksventrikulären Auswurfractionen (LV EF) zeigte keine Unterschiede zwischen den vier Genotypen, die durchschnittliche LV EF lag in den vier Gruppen zwischen 62 und 67 Prozent (Abbildung 4b). Dagegen war das linksventrikuläre Schlagvolumen (LV SV) der Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber WT mit +36% signifikant erhöht, ebenso gegenüber M-CK<sup>-/-</sup> mit +40%. LV SV der M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse war gegenüber diesen beiden Gruppen ebenfalls erhöht (+22% gegenüber WT, +26% gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>; Tabelle 2 und Abbildung 5a), ohne signifikante Unterschiede gegenüber Mito-CK<sup>-/-</sup>.



**Abbildungen 5a und b:** Linksventrikuläre Schlagvolumina (LV SV) und Herzzeitvolumina (LV HZV) von Wildtyp- und CK-Knockout-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardfehler.

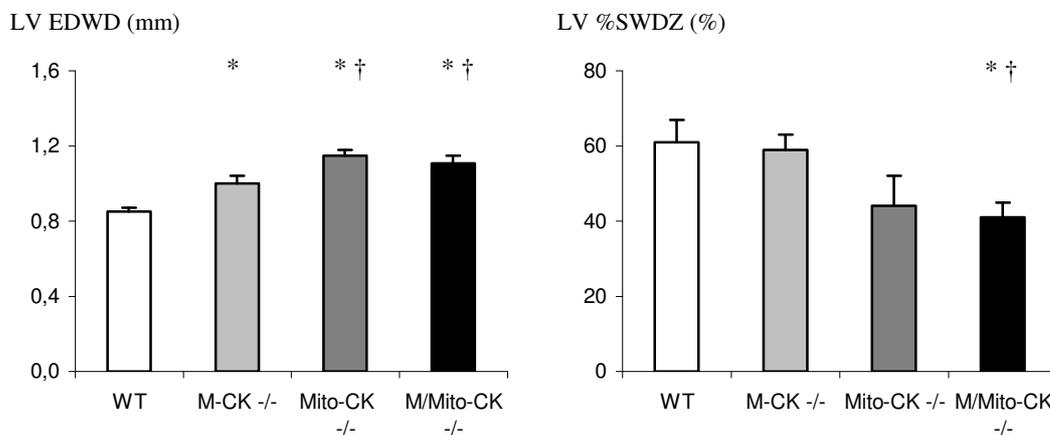
\*  $p < 0,05$  gegen WT; †  $p < 0,05$  gegen M-CK<sup>-/-</sup>.

Die Bestimmung der linksventrikulären Herzzeitvolumina (LV HZV) ergab wie bei allen bestimmten Volumina vergleichbare Werte für M-CK<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäuse. Das LV HZV der Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse war nicht signifikant höher als das beider vorgenannter Gruppen. Die höchsten Werte erreichte das LV HZV der M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse. Gegenüber WT waren die Werte dieser Versuchsgruppe um 33% und signifikant erhöht, im Vergleich mit M-CK<sup>-/-</sup> betrug die Steigerung +45%; gegenüber Mito-CK<sup>-/-</sup> gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 2 und Abbildung 5b).

Auch in den Ergebnissen der Wanddicke des linken Ventrikels zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen, mit deutlichen Parallelen zur gemessenen linksventrikulären Masse. Sowohl enddiastolisch als auch endsystolisch hatten die Wildtypen mit  $0,85 \pm 0,02$  mm beziehungsweise  $1,36 \pm 0,05$  mm die niedrigsten linksventrikulären Wandstärken. Enddiastolisch stiegen die Werte über die M-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse mit  $1,00 \pm 0,04$  mm (+18% gegenüber WT) auf  $1,15 \pm 0,03$  mm bei den Mito-CK<sup>-/-</sup> (+35% gegenüber WT, +15% gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>, jeweils  $p < 0,05$ ) und  $1,11 \pm 0,04$  mm bei den M/Mito-CK<sup>-/-</sup>

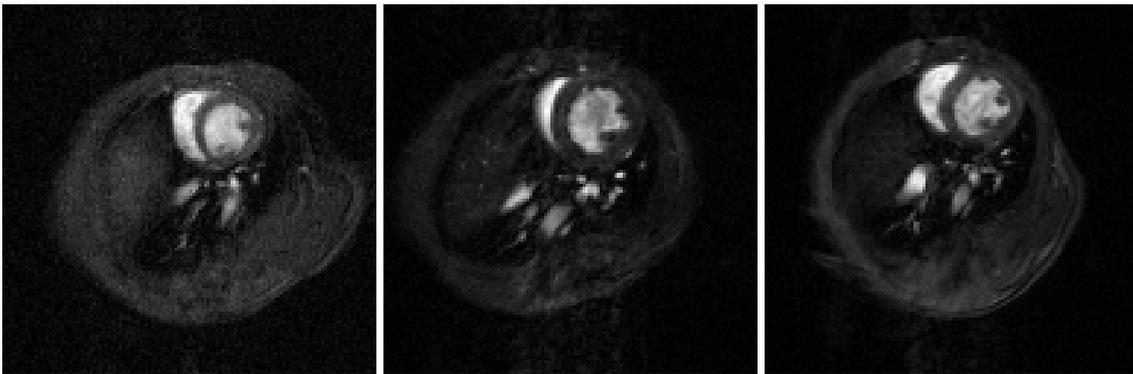
Mäusen (+31% gegenüber WT, +11% gegenüber M-CK<sup>-/-</sup> jeweils p<0,05, Abbildung 6a). Endsystolisch wiesen die Tiere aller Knockout-Gruppen im Durchschnitt vergleichbare linksventrikuläre Wanddicken auf. Gegenüber WT waren die Durchmesser bei M-CK<sup>-/-</sup> und M/Mito-CK<sup>-/-</sup> um jeweils 15% erhöht, bei Mito-CK<sup>-/-</sup> um 21%. Für die absolute systolische Wanddickenzunahme des linken Ventrikels ergaben sich mit Mittelwerten zwischen 0,45±0,03 und 0,58±0,04 mm keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen (Tabelle 2).

Die linksventrikuläre prozentuale systolische Wanddickenzunahme zeigte dagegen deutliche Differenzen zwischen den verschiedenen Genotypen. WT mit 61±6 % und M-CK<sup>-/-</sup> mit 59±4 % Zunahme gegenüber der Diastole lagen hier bei ähnlichen Werten, Mito-CK<sup>-/-</sup> bei 44±8 % und M/Mito-CK<sup>-/-</sup> bei gegenüber WT und M-CK<sup>-/-</sup> signifikant erniedrigten 41±4 % systolischer Wanddickenzunahme (Abbildung 6b).



**Abbildungen 6a und b:** Linksventrikuläre enddiastolische Wanddicke (LV EDWD) und prozentuale systolische Wanddickenzunahme (%SWDZ) von Wildtyp- und CK-Knockout-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardfehler.

\* p<0,05 gegenüber WT; † p<0,05 gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>.



**Abbildungen 7a bis c:** Repräsentative enddiastolische Kurzachsschichten durch das Herz einer Wildtyp- (links), einer Mito-CK<sup>-/-</sup>- (Mitte) sowie einer M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Maus (rechts) im Vergleich. Die linksventrikuläre Hypertrophie der Knockout-Mäuse ist bereits visuell erkennbar.

#### 4.1.2 Rechtsventrikuläre Parameter

Die Erhebung der rechtsventrikulären (RV) Parameter ergab die niedrigsten enddiastolischen Volumina bei den Wildtyp- und M-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen, gefolgt von den Mito-CK<sup>-/-</sup> mit signifikant höherem enddiastolischem Volumen als M-CK<sup>-/-</sup> (+35%) und den höchsten Werten bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup>, mit +30% gegenüber WT und +44% gegenüber M-CK<sup>-/-</sup> (Tabelle 3; Abbildung 8a).

Das rechtsventrikuläre endsystolische Volumen zeigte bei den Wildtyp-, M-CK<sup>-/-</sup>- und Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen keine signifikanten Unterschiede, bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup> war dieser Wert gegenüber M-CK<sup>-/-</sup> (+92%,  $p < 0,05$ ) und WT (+37%,  $p < 0,05$ ) deutlich erhöht, gegenüber Mito-CK<sup>-/-</sup> nicht signifikant (Tabelle 3). Die Ejektionsfraktionen des rechten Ventrikels zeigten mit Mittelwerten von  $59 \pm 3$  bis  $70 \pm 3$  Prozent vergleichbar den entsprechenden Ejektionsfraktionen des linken Ventrikels keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstieren der vier Gruppen.

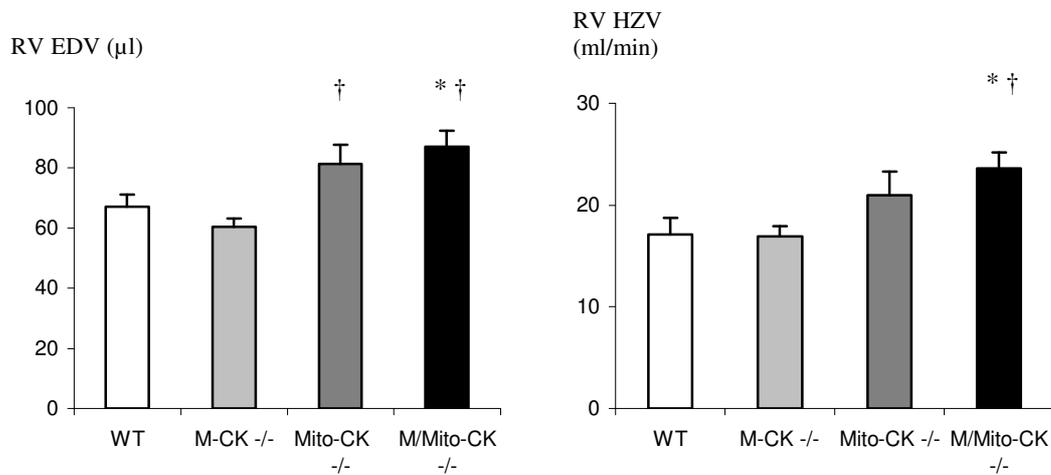
RV-Parameter	Wildtyp n=10	M-CK <sup>-/-</sup> n=10	Mito-CK <sup>-/-</sup> n=6	M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=10
EDV (μl)	67,1±4,1	60,4±2,7	81,4±6,3 †	87,0±5,4 *†
ESV (μl)	26,4±3,0	18,9±2,5	26,2±3,8	36,2±4,4 *†
EF (%)	60±5	70±3	68±4	59±3
SV (μl)	40,7±4,4	41,6±1,7	55,2±5,8 *†	50,7±2,6
HZV (ml/min)	17,1±1,6	16,9±1,0	21,0±2,3	23,6±1,6 *†
EDWD (mm)	0,42±0,03	0,46±0,01	0,51±0,07	0,45±0,04
ESWD (mm)	0,70±0,03	0,80±0,04	0,82±0,05	0,75±0,03
SWDZ (mm)	0,28±0,03	0,34±0,04	0,31±0,05	0,30±0,03
%SWDZ (%)	75±16	74±9	78±27	78±16

**Tabelle 3:** Rechtsventrikuläre (RV) Volumen- und Funktionsparameter der nicht infarzierten Versuchstiere. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte ± Standardfehler.

\* p<0,05 gegenüber Wildtyp; † p<0,05 gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>.

EDV = enddiastolisches Volumen; ESV = endsystolisches Volumen;  
 EF = Ejektionsfraktion; SV = Schlagvolumen; HZV = Herzzeitvolumen;  
 EDWD = enddiastolische Wanddicke; ESWD = endsystolische Wanddicke;  
 SWDZ = absolute systolische Wanddickenzunahme;  
 %SWDZ = prozentuale systolische Wanddickenzunahme

Das rechtsventrikuläre Schlagvolumen war erneut bei Mito-CK<sup>-/-</sup> (+36% im Vergleich mit WT, +33% gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>, jeweils p<0,05) und M/Mito-CK<sup>-/-</sup> tendenziell höher als in den beiden anderen Gruppen. Auch im Herzzeitvolumen des rechten Ventrikels kamen WT und M-CK<sup>-/-</sup> auf beinahe identische Werte, die Werte der M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Gruppe lagen signifikant höher (+38% gegenüber WT, +40% gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>), die der Mito-CK<sup>-/-</sup>-Gruppe zwischen WT beziehungsweise M-CK<sup>-/-</sup> einerseits und M/Mito-CK<sup>-/-</sup> andererseits (Tabelle 3; Abbildung 8b).



**Abbildungen 8a und b:** Rechtsventrikuläre enddiastolische Volumina (LV EDV) und Herzzeitvolumina (RV HZV) von Wildtyp- und CK-Knockout-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardfehler.

\*  $p < 0,05$  gegenüber WT; †  $p < 0,05$  gegenüber M-CK<sup>-/-</sup>.

Die Wanddickenmessungen des rechten Ventrikels ergaben vergleichbare Werte für die unterschiedlichen Genotypen. Die enddiastolische Wanddicke lag im Mittelwert zwischen  $0,42 \pm 0,03$  und  $0,51 \pm 0,07$  mm, endsystolisch zwischen  $0,70 \pm 0,03$  und  $0,82 \pm 0,05$  mm. Auch in der rechtsventrikulären systolischen Wanddickenzunahme zeigten sich keine Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen (Tabelle 3).

## 4.2 Myokardinfarkt

Insgesamt wurde bei 27 Mäusen operativ ein Myokardinfarkt induziert. 12 davon waren Wildtyp-Mäuse, von diesen starben fünf Tiere bereits während oder kurz nach der OP. Die restlichen sieben Tiere konnten nach vier Wochen im MRT untersucht werden. Die Mortalität der Wildtypen nach Infarzierung betrug damit 42%. Außerdem wurden 15 M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse operiert, von denen sechs Tiere früh verstarben. Die intra- bzw. postoperative Mortalität war somit bei den M/Mito-CK<sup>-/-</sup> mit 40% nicht höher als bei den WT-Mäusen (Tabelle 4). Am höchsten war die Mortalität unmittelbar nach Infarzierung, beziehungsweise innerhalb der ersten drei Tage. Alle Tiere beider Gruppen, die nach vier Wochen noch am Leben waren, konnten in die Untersuchungen eingeschlossen werden. Die nachfolgenden Ergebnisse und Mittelwerte beziehen sich auf die überlebenden Tiere ab der 5. postoperativen Woche. Die MR-Untersuchungen in Narkose überstanden alle Tiere unbeschadet.

Das Körpergewicht der Wildtyp-Mäuse mit Myokardinfarkt (MI WT) lag bei  $28,1 \pm 0,3$  g, das der MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse bei  $25,6 \pm 1,1$  g. Damit bewegten sich die Körpergewichte der MI WT im oberen Bereich aller gemessenen Gruppen, die der MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> waren am niedrigsten, allerdings ohne dass signifikante Unterschiede vorlagen. Um sich eventuell dennoch aus diesen Umständen ergebende systematische Fehler vollständig zu eliminieren, wurden die Indices der gemessenen Werte bezogen auf das jeweilige Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt. Im Vergleich dieser Indices mit den aufgeführten nativen Daten ergaben sich keine relevanten Unterschiede, weshalb auf eine gesonderte Darstellung verzichtet wurde.

Während der MR-Messungen lag die Herzfrequenz pro Minute in beiden Infarktgruppen im Bereich der Frequenzen der Tiere ohne Myokardinfarkt (Tabelle 4). Die im MRT bestimmte linksventrikuläre mittlere MI-Größe betrug bei MI WT  $32 \pm 6$  % und bei MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>  $29 \pm 2$  %. Damit waren aufgrund gleicher Infarktgröße die Voraussetzungen für einen sinnvollen Vergleich der ventrikulären Funktionsparameter beider MI-Gruppen gegeben.

	Wildtyp n=10	M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=10	MI Wildtyp n=7	MI M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=9
Infarzierte Tiere	x	x	12	15
Verstorben vor MRT-Messung	x	x	5	6
Mortalität (%)	x	x	42	40
Körpergewicht (g)	26,2±0,8	27,4±0,7	28,1±0,3	25,6±1,1
Herzfrequenz /min	435±30	471±35	479±44	421±23
MI-Größe (% LV)	x	x	32±6	29±2

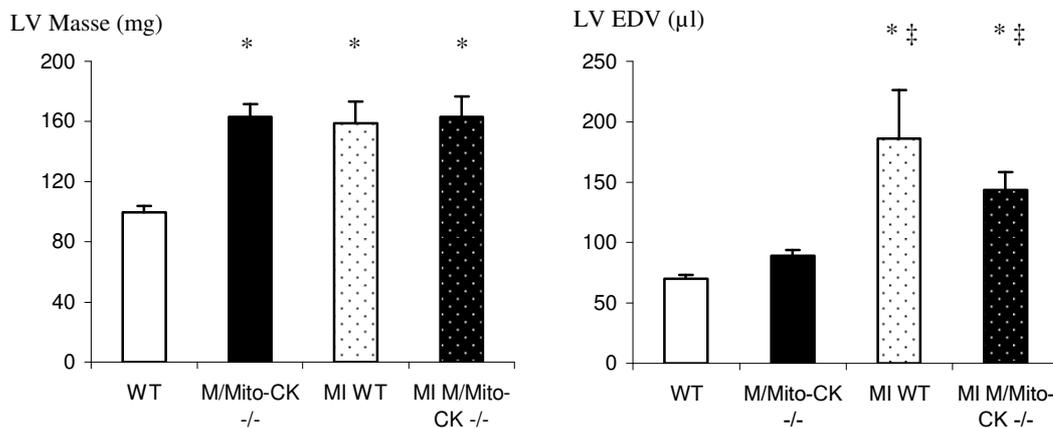
**Tabelle 4:** Mortalität, Infarktgrößen und Basisdaten der Mäuse mit linksventrikulärem Myokardinfarkt (MI) im Vergleich mit den nicht infarzierten Versuchstieren gleichen Genotyps. Infarktgröße, Körpergewicht und Herzfrequenz angegeben als Mittelwert ± Standardfehler, bei Infarkttieren ohne vorzeitig verstorbene Mäuse.

#### 4.2.1 Linksventrikuläre Parameter

Die linksventrikuläre Masse der infarzierten Wildtypen war mit 159,1±14,3 mg gegenüber Kontroll-Wildtyp (99,6±4,2 mg) deutlich erhöht. Bei den M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte bei der Gewichtsbestimmung des Myokards keine weitere Massenzunahme nach Infarkt nachgewiesen werden. Der Mittelwert der linksventrikulären Masse in der MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Gruppe lag auf einem Niveau mit den M/Mito-CK<sup>-/-</sup> ohne Infarkt und MI WT-Mäusen (Tabelle 5; Abbildung 9a).

Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LV EDV) der MI WT betrug mit 186,2±39,9 µl 266% des Volumens der WT ohne Infarkt. LV EDV der MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> wies mit 143,5±14,5 µl ebenfalls eine deutliche Erhöhung gegenüber Kontroll-WT und M/Mito-CK<sup>-/-</sup> ohne Infarkt auf, ohne signifikante

Abweichungen gegenüber den infarzierten Wildtyp-Mäusen (Tabelle 5; Abbildung 9b).



**Abbildungen 9a und b:** Linksventrikuläre Myokardmassen (LV Masse) und enddiastolische Volumina (LV EDV) von Infarkt- (MI) und Kontrolltieren im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte jeder Gruppe sowie deren Standardfehler.

\*  $p < 0,05$  gegenüber WT; ‡  $p < 0,05$  gegenüber M/Mito-CK<sup>-/-</sup>.

Das endsystolische linksventrikuläre Volumen (LV ESV) war bei MI WT mit  $129,9 \pm 36,7 \mu\text{l}$  und MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> mit  $89,4 \pm 13,4 \mu\text{l}$  gegenüber LV ESV der Kontrolltiere um etwa den gleichen Betrag erhöht wie die entsprechenden enddiastolischen Volumina. Erneut zeigten sich zwischen den infarzierten Versuchstieren mit und ohne CK-KO keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 5).

LV-Parameter	Wildtyp n=10	M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=10	MI Wildtyp n=7	MI M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=9
Masse (mg)	99,6±4,2	163,1±8,6 *	159,1±14,3 *	163,1±13,5 *
EDV (μl)	70,0±3,1	88,9±5,1	186,2±39,9 *‡	143,5±14,5 *‡
ESV (μl)	25,5±2,2	34,5±4,5	129,9±36,7 *‡	89,4±13,4 *‡
EF (%)	64±3	62±3	37±6 *‡	40±5 *‡
SV (μl)	44,5±2,8	54,4±2,9	56,3±7,2	54,1±5,3
HZV (ml/min)	19,2±1,6	25,6±2,3 *	26,0±3,2	22,3±1,8
EDWD (mm)	0,85±0,02	1,11±0,04 *	1,01±0,06 *	1,09±0,06 *
ESWD (mm)	1,36±0,05	1,56±0,04 *	1,41±0,07	1,44±0,10
SWDZ (mm)	0,51±0,05	0,45±0,03	0,40±0,05	0,36±0,04
%SWDZ (%)	61±6	41±4 *	41±7 *	32±3 *
MIWD (mm)	x	x	0,56±0,04	0,51±0,03

**Tabelle 5:** Linksventrikuläre (LV) Massen-, Volumen- und Funktionsparameter der Mäuse mit Myokardinfarkt (MI) im Vergleich mit den Kontrolltieren. Alle Ergebnisse als Mittelwerte ± Standardfehler.

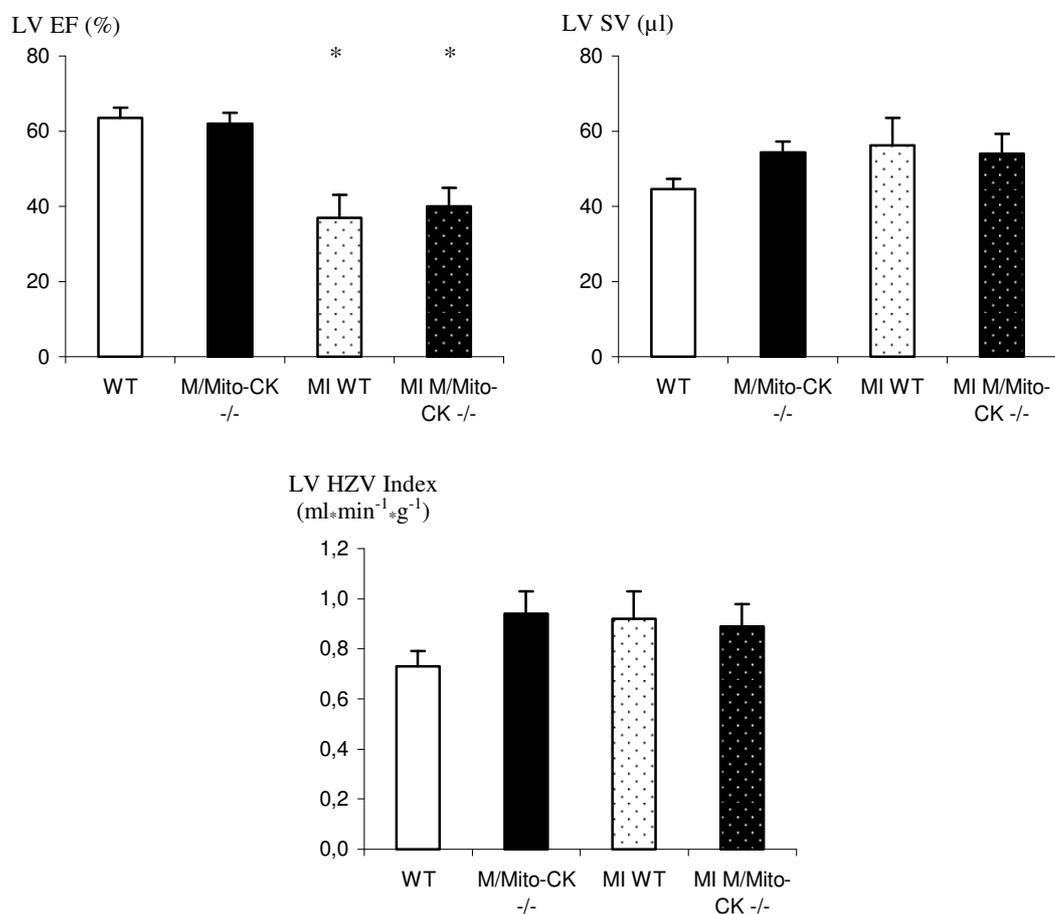
\* p<0,05 gegenüber Wildtyp; ‡ p<0,05 gegenüber M/Mito-CK<sup>-/-</sup>.

Masse = Myokardmasse; EDV = enddiastolisches Volumen; ESV = endsystolisches Volumen; EF = Ejektionsfraktion; SV = Schlagvolumen; HZV = Herzzeitvolumen; EDWD = enddiastolische Wanddicke; ESWD = endsystolische Wanddicke; SWDZ = absolute systolische Wanddickenzunahme; %SWDZ = prozentuale systolische Wanddickenzunahme; MIWD = minimale Wanddicke im Infarktbereich

Gegenüber den entsprechenden Genotypen ohne Infarkt konnte in beiden MI-Gruppen ein deutliches Absinken der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LV EF) von über 60% auf etwa 40% beobachtet werden. Dabei unterschieden sich die EF von MI WT und MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> nicht voneinander (Abbildung 10a). Die linksventrikulären Schlagvolumina der infarzierten Tiere beider Genotypen

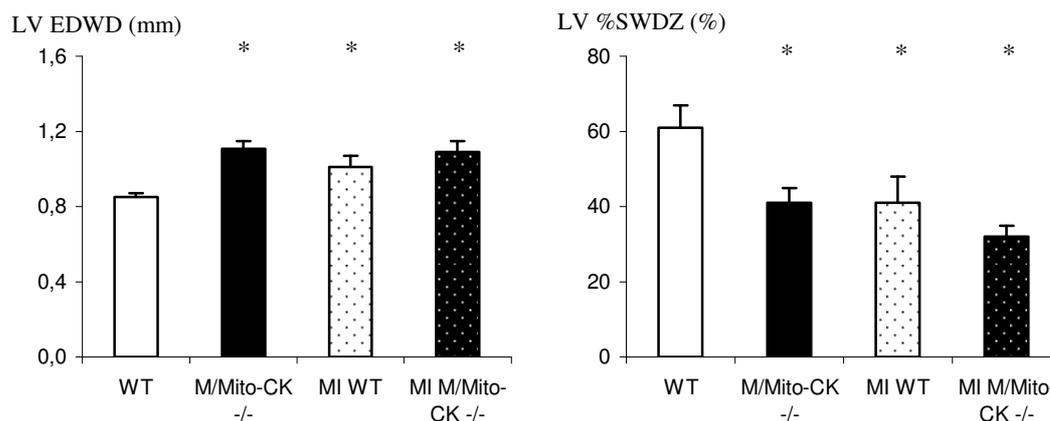
waren identisch und auch gegenüber den Versuchstieren ohne Infarkt nicht signifikant verändert (Tabelle 5; Abbildung 10b).

Wie bei den übrigen gemessenen linksventrikulären Volumina waren im Vergleich der errechneten Herzzeitvolumina zwischen beiden MI-Gruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen, von den Kontrolltieren zeigten die WT hier tendenziell niedrigere, M/Mito-CK<sup>-/-</sup> so gut wie identische Werte im Vergleich mit den Infarkttieren (Tabelle 5; Abbildung 10c).



**Abbildungen 10a bis c:** Linksventrikuläre (LV) Funktionsparameter von Myokardinfarkt- (MI) und Kontrolltieren im Vergleich. Oben Ejektionsfraktion (EF) und Schlagvolumen (SV), unten Herzzeitvolumen pro Gramm Körpergewicht (HZV Index). Dargestellt sind die Mittelwerte jeder Gruppe sowie deren Standardfehler.  
\*  $p < 0,05$  gegenüber WT.

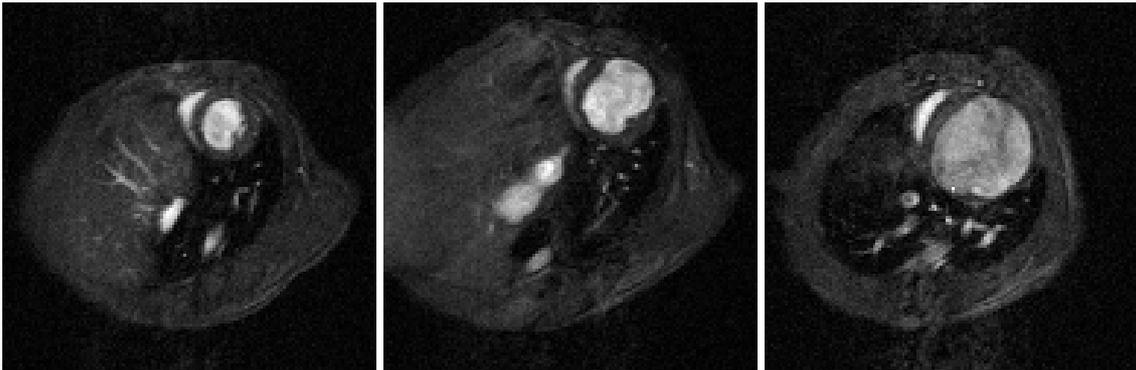
Die gemessene enddiastolische linksventrikuläre Wanddicke (LV EDWD) des nicht infarzierten Myokards der MI WT zeigte sich mit  $1,01 \pm 0,06$  mm gegenüber den Kontroll-WT ( $0,85 \pm 0,02$  mm) signifikant erhöht. In der MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Gruppe war LV EDWD mit  $1,09 \pm 0,06$  mm sowohl im Vergleich mit den MI WT als auch mit den M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $1,11 \pm 0,04$  mm) nicht erhöht (Abbildung 11a). Endsystolisch lag die linksventrikuläre Wanddicke der MI WT mit  $1,41 \pm 0,07$  mm und MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> mit  $1,44 \pm 0,10$  mm im gleichen Bereich wie bei WT ( $1,36 \pm 0,05$  mm) und M/Mito-CK<sup>-/-</sup> ( $1,56 \pm 0,04$  mm). Damit betrug die absolute Wanddickenzunahme in der Systole bei MI WT  $0,40 \pm 0,05$  mm (WT-Kontrolle  $0,51 \pm 0,05$  mm) und bei MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>  $0,36 \pm 0,04$  mm (M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Kontrolle  $0,45 \pm 0,03$  mm), also vergleichbar mit den M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Infarkt aber in beiden Gruppen weniger als in der WT-Kontroll-Gruppe. Bezogen auf die entsprechende diastolische Wanddicke erreichte MI WT mit  $41 \pm 7\%$  nur zwei Drittel der prozentualen systolischen Wanddickenzunahme (%SWDZ) der Wildtyp-Kontrolltiere ( $p < 0,05$ ), MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> mit  $32 \pm 3\%$  nur die Hälfte ( $p < 0,05$ ), allerdings nicht signifikant weniger als M/Mito-CK<sup>-/-</sup> ohne Infarkt (Tabelle 5; Abbildung 11b).



**Abbildungen 11a und b:** Linksventrikuläre enddiastolische Wanddicke (LV EDWD) und prozentuale systolische Wanddickenzunahme (%SWDZ) von Myokardinfarkt- (MI) und Kontrolltieren im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardfehler.

\*  $p < 0,05$  gegenüber WT.

Die Bestimmung der geringsten Wanddicke im Infarktbereich (MIWD) ergab mit einer Narbendicke von  $0,56 \pm 0,04$  mm bei MI WT und  $0,51 \pm 0,03$  mm bei MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> identische Werte für beide Infarktgruppen.



**Abbildungen 12a bis c:** Kurzachsschichten aus der Diastole von drei verschiedenen Wildtyp-Mäusen 3-4 mm cranial der Herzspitze. Links gesundes Herz, Mitte Maus mit mittelgroßem, rechts mit großem chronischem Anterolateralinfarkt, 4 Wochen nach Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie.

#### 4.2.2 Rechtsventrikuläre Parameter

Die rechtsventrikulären Volumenparameter der infarzierten Mäuse beider Genotypen zeigten sämtlich ähnliche Mittelwerte für beide Gruppen. Signifikante Unterschiede waren hier nicht festzustellen (Tabelle 6). Bis auf eine Ausnahme lagen alle Mittelwerte im selben Bereich derjenigen der WT- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Gruppen ohne Infarkt. Lediglich das Herzzeitvolumen der MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse war im Absolutwert gegenüber M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Kontrolle erniedrigt, im Index pro Gramm Körpergewicht waren allerdings auch bei diesem Parameter keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Auch die rechtsventrikulären Wanddickenparameter zeigten eine hohe Übereinstimmung bei MI- und Kontrolltieren. Signifikante Unterschiede zeigten

sich nur in der systolischen Wanddickenzunahme bei MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>, diese war im Absolutwert erniedrigt gegenüber MI WT, prozentual auf die enddiastolische Wanddicke bezogen dagegen ohne signifikante Unterschiede (Tabelle 6).

RV-Parameter	Wildtyp n=10	M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=10	MI Wildtyp n=7	MI M/Mito-CK <sup>-/-</sup> n=9
EDV (µl)	67,1±4,1	87,0±5,4 *	74,8±10,1	70,6±3,8
ESV (µl)	26,4±3,0	36,2±4,4	36,4±6,1	29,0±2,2
EF (%)	60±5	59±3	49±7	58±3
SV (µl)	40,7±4,4	50,7±2,6	38,4±8,4	41,6±4,0
HZV (ml/min)	17,1±1,6	23,6±1,6 *	17,0±3,3	17,6±2,2 ‡
EDWD (mm)	0,42±0,03	0,45±0,04	0,47±0,07	0,47±0,06
ESWD (mm)	0,70±0,03	0,75±0,03	0,82±0,11	0,70±0,06
SWDZ (mm)	0,28±0,03	0,30±0,03	0,35±0,05	0,23±0,02 #
%SWDZ (%)	75±16	78±16	77±9	54±9

**Tabelle 6:** Rechtsventrikuläre (RV) Massen-, Volumen- und Funktionsparameter der Wildtyp- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Myokardinfarkt (MI) im Vergleich mit den nicht infarzierten Tieren. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte ± Standardfehler.

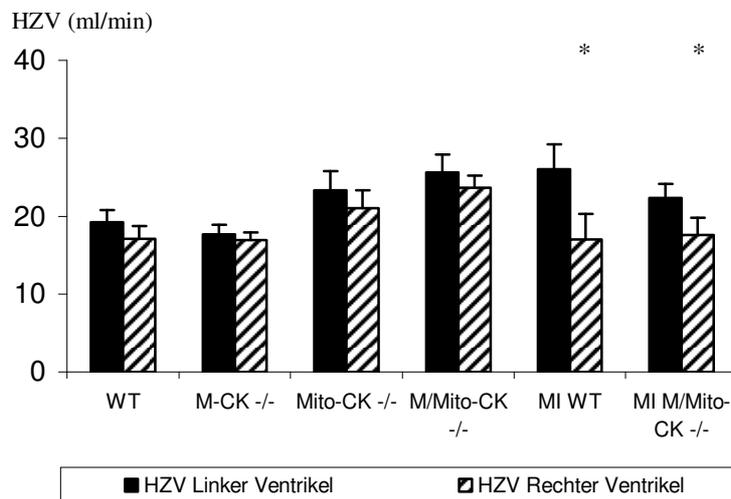
\* p<0,05 gegenüber Wildtyp; ‡ p<0,05 gegenüber M/Mito-CK<sup>-/-</sup>; # p<0,05 gegenüber MI WT.

EDV = enddiastolisches Volumen; ESV = endsystolisches Volumen;  
 EF = Ejektionsfraktion; SV = Schlagvolumen; HZV = Herzzeitvolumen;  
 EDWD = enddiastolische Wanddicke; ESWD = endsystolische Wanddicke;  
 SWDZ = absolute systolische Wanddickenzunahme;  
 %SWDZ = prozentuale systolische Wanddickenzunahme

### 4.3 Korrelationen

Im Vergleich der linksventrikulären und rechtsventrikulären Funktion zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen rechts- und linkventrikulärem Herzzeitvolumen bei Mäusen ohne Myokardinfarkt. Es ergab sich jedoch in allen sechs Gruppen ein Trend zu höheren linksventrikulären Herzzeitvolumina (LV HZV, Abbildung 13). In den beiden Infarktgruppen war diese Differenz signifikant. Im Mittel aller Versuchstiere ohne Infarkt war das RV HZV  $1,7 \pm 0,7$  ml/min oder  $6,4 \pm 2,7$  % niedriger als das LV HZV, ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Bei den infarzierten Tieren war das RV HZV im Mittel  $6,5 \pm 1,6$  ml/min oder  $26,9 \pm 6,0$  % geringer als das LV HZV, mit tendenziell größeren RV-LV-Differenzen bei den MI WT.

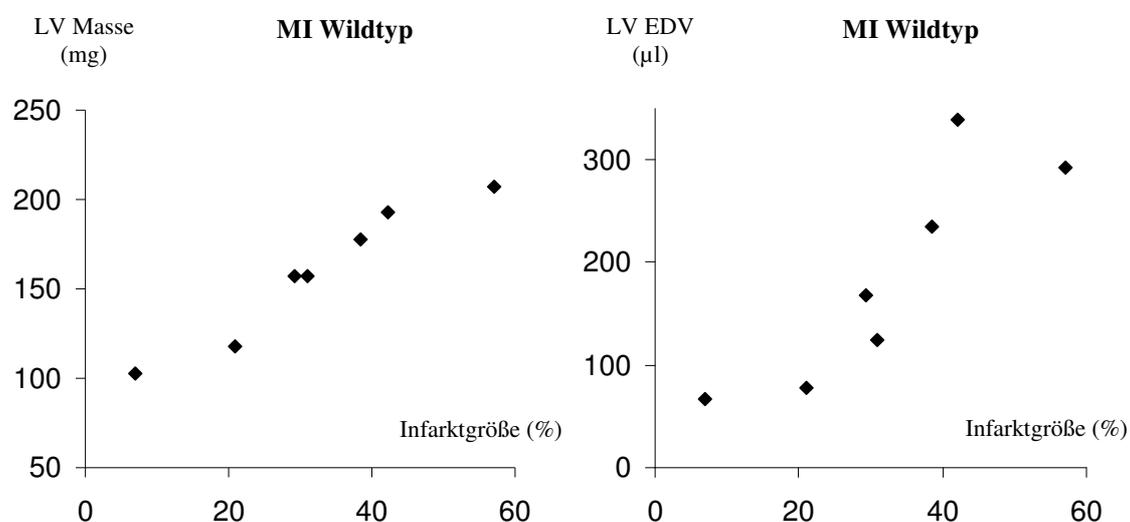
Der Korrelationskoeffizient für links- und rechtsventrikuläre Herzzeitvolumina betrug in den Versuchsgruppen ohne Infarkt nach Spearman 0,82 ( $p < 0,001$ ), in den beiden Gruppen mit Infarkt 0,71 ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 13:** Rechtsventrikuläres und linksventrikuläres Herzzeitvolumen der Versuchstiere im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aller sechs Versuchsgruppen.

\*  $p < 0,05$  (RV HZV gegenüber LV HZV der gleichen Gruppe)

Die linksventrikuläre Myokardmasse zeigte innerhalb der vier Versuchsgruppen ohne Infarkt erwartungsgemäß eine deutliche Abhängigkeit vom Körpergewicht (WT:  $r=0,76$ ;  $p<0,05$ ). In den beiden Infarktgruppen war dies nicht der Fall. In der MI Wildtyp-Gruppe konnte eine deutliche Abhängigkeit verschiedener linksventrikulärer Herzparameter von der Infarktgröße festgestellt werden. Bei relativ einheitlichen Körpergewichten aller Tiere in dieser Gruppe (27 bis 29g) zeigte die LV Masse eine enge Korrelation zur prozentualen Infarktgröße ( $r=0,96$ ;  $p<0,001$ , siehe auch Abbildung 14a), ebenso LV EDV und LV ESV (jeweils  $r=0,93$ ;  $p<0,05$ , Abbildung 14b). Demgegenüber konnte in der MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Gruppe keine solche Abhängigkeit der Herzparameter von der Infarktgröße nachgewiesen werden (Korrelation Infarktgröße / LV Masse:  $r=-0,2$ ;  $p=0,3$ ).



**Abbildungen 14a und b:** Korrelationen von linksventrikulärer Myokardmasse (LV Masse) und linksventrikulärem enddiastolischem Volumen (LV EDV) mit der Infarktgröße (in Prozent des linken Ventrikels) der Versuchstiere der MI Wildtyp-Gruppe.

## 5 Diskussion

Seit der erstmaligen erfolgreichen Durchführung einer gezielten Manipulation des Genoms eines Säugetieres im Jahre 1980 [17] eröffnet die Verfügbarkeit transgener Tiermodelle ganz neue Möglichkeiten, die physiologische oder pathophysiologische Funktion einzelner Proteine zu klären. So konnte auch die Entwicklung der verschiedenen Kreatinkinase-Knockout-Mauslinien in den letzten Jahren bereits neue Erkenntnisse liefern, verschiedene Studien beschäftigten sich unter anderem auch mit den Auswirkungen eines CK-Knockouts auf Muskulatur und speziell das Myokard. Dennoch blieben weiterhin wichtige Kernfragen zu Funktion und Relevanz der Kreatinkinase im Herzen unbeantwortet.

Wie bereits gezeigt werden konnte, führt selbst der völlige Ausfall der CK bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen im isolierten, perfundierten Herz nicht zu einer nennenswerten Beeinträchtigung der Herzfunktion unter Normalbedingungen [53][54][58]. Dennoch erschien es unwahrscheinlich, dass das Fehlen eines stark exprimierten Enzyms wie der Kreatinkinase tatsächlich ohne wesentliche Auswirkungen auf Morphologie und/oder Funktion des Herzens bleiben sollte. In dieser Arbeit sollten daher weitere Erkenntnisse zur Bedeutung der Kreatinkinase im Myokard gewonnen werden, indem erstmalig eine kardiale *in vivo*-Charakterisierung von Mäusen mit CK-Mangel durchgeführt wurde. Dazu wurden drei unterschiedliche Linien von transgenen Knockout-Mäusen mit einer Deletion der Gene einer oder mehrerer Isoformen der Kreatinkinase untersucht. Des Weiteren wurde die Auswirkung eines chronischen Myokardinfarktes auf CK-Knockout-Tiere untersucht. Die Verwendung der Magnetresonanztomographie, dem derzeitigen Goldstandard zur präzisen Erfassung der kardialen Morphologie und Funktion *in vivo* [40][52], sollte eine hohe Präzision der Ergebnisse sichern.

## 5.1 Morphologie und Funktion des Herzens bei CK-KO

Als wesentliches Ergebnis des Vergleichs des kardialen Phänotyps der verschiedenen CK-Knockout- (CK-KO) und Wildtyp-Mäuse konnte eine linksventrikuläre Hypertrophie in allen drei Knockout-Gruppen nachgewiesen werden. Das Fehlen der mitochondrialen Isoform der Kreatinkinase der Myozyten (Mito-CK<sup>-/-</sup>) induzierte dabei eine deutlich ausgeprägtere Hypertrophie (linksventrikuläre Masse +73% gegenüber Wildtyp) als das Fehlen der zytosolischen Isoenzyme (M-CK<sup>-/-</sup>, linksventrikuläre Masse +33% gegenüber Wildtyp). Die kombinierte Deletion der Gene sowohl der M-Untereinheit der zytosolischen CK als auch der mitochondrialen CK (M/Mito-CK<sup>-/-</sup>) führte ebenfalls zu einer massiven Hypertrophie, ohne signifikanten Unterschied zu den Mito-CK<sup>-/-</sup>. In Kombination mit dieser Zunahme der linksventrikulären Muskelmasse konnte bei den Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen eine leichte Erhöhung der enddiastolischen linksventrikulären Volumina festgestellt werden (+33% bzw. +27% gegenüber WT), nicht dagegen bei den M-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese Ergebnisse sind teilweise konträr zu früheren Studien, die bei Untersuchungen am Herzen von CK-Knockout-Mäusen keine derartig ausgeprägte Hypertrophie beschreiben [53][58]. Lediglich in zwei Fällen wurden bei einem Vergleich der Herzgewichte von M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen mit denen von Wildtypen signifikante Unterschiede festgestellt. Im ersten Fall wurde im Alter von 34 Wochen eine linksventrikuläre Masse von durchschnittlich 138 mg bei Wildtypen und 171 mg bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup> gefunden, was einer Zunahme um 24% entspricht [6]. Im zweiten Fall wurde eine Zunahme des Verhältnisses Herzgewicht/Körpergewicht von durchschnittlich 5,0 bei Wildtypen auf 6,0 bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup> (+20%) im Alter von 13 Wochen festgestellt [24]. Die im Vergleich dazu doch deutlicher ausgeprägte Hypertrophie der CK-Knockout-Mäuse in dieser Arbeit ist zum Teil möglicherweise auf das höhere Lebensalter der jetzt untersuchten Mäuse von durchschnittlich 41 Wochen zurückzuführen. Zumindest ist eine Progressivität der Hypertrophie bei Kreatinkinase-Mangel mit zunehmendem Lebensalter zu diskutieren. Auch kann grundsätzlich eine Abweichung der Ergebnisse der Untersuchungen am extrahierten Herzen von

in vivo Untersuchungen wie in dieser Arbeit erwartet werden. Speziell nach Experimenten am isolierten, perfundierten Herzen verursachen Ödeme Herzgewichtsveränderungen [53][58], die eine Hypertrophie eventuell verschleiern beziehungsweise die Herzgewichtrelationen zwischen den verschiedenen Genotypen verschieben. Zusätzlich sind methodisch bedingte quantitative Abweichungen bei unterschiedlicher Datenerhebungsmethode nicht auszuschließen. Hierzu ist zu bemerken, dass die Überlegenheit der in vivo Charakterisierung des Herzens mittels MRT zur exakten Quantifizierung der Myokardmasse gegenüber alternativen Methoden zum derzeitigen Zeitpunkt sowohl beim Menschen [3] als auch im Mausmodell [74] akzeptiert ist.

Interessant im Zusammenhang mit der nachgewiesenen Hypertrophie sind Publikationen zur zellulären Morphologie, die einige zytoarchitektonische Veränderungen in den Myozyten von M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen beschreiben. Hervorstechendes Merkmal einer ultrastrukturellen Reorganisation bei CK-Knockout ist demnach die Auftrennung der Myofibrillen mit der Bildung verdünnter Myofilamente in abweichender Anordnung mit verschmälerten A-Banden. In den neu gebildeten Zwischenräumen wurden zahlreiche zusätzliche Mitochondrien, teils in Haufen vorliegend, gefunden [24]. Möglicherweise liefern diese mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen auf zellulärer Ebene eine Erklärung für die beobachtete Hypertrophie des Herzens bei CK-Knockout.

Die deutliche Zunahme der linksventrikulären Masse zeigte sich bei Knockout der mitochondrialen CK nicht nur konzentrisch hypertrophisch bedingt, erstmalig konnte auch eine signifikante Dilatation des linken Ventrikels bei diesen Genotypen nachgewiesen werden (Mito-CK<sup>-/-</sup> +33%, M/Mito-CK<sup>-/-</sup> +27% gegenüber Wildtyp enddiastolisch). Zwar wurde eine Ventrikeldilatation zuvor nicht beschrieben, doch ist festzustellen, dass in Untersuchungen am isolierten perfundierten Herzen dieser Parameter typischerweise nicht exakt zu bestimmen ist, da dabei die Herzfüllung extern über eine ventrikuläre Druckmessung gesteuert wird. Die physiologische Kammerfüllung in vivo kann somit über die gemessenen Druck-Volumen-Kurven zwar abgeschätzt, jedoch

nicht genau gemessen werden. In der bisher einzigen veröffentlichten Studie der Herzfunktion von M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen *in vivo* wurden verschiedene Parameter echokardiographisch bestimmt [10]. Dabei fand sich unter anderem ein enddiastolisch und endsystolisch erhöhter linksventrikulärer Durchmesser (enddiastolisch WT 3,39 gegenüber M/Mito-CK<sup>-/-</sup> 3,70; endsystolisch WT 1,88 gegenüber M/Mito-CK<sup>-/-</sup> 2,22). Obwohl die Autoren diese Ergebnisse nicht weiter kommentieren und die Volumina nicht explizit bestimmt wurden, ließe sich über eine geschätzte Rückrechnung nach der Teichholz-Formel [63] vom Durchmesser des Ventrikels auf sein Volumen schließen. Nach dieser Rechnung kann in genannter Studie von einem enddiastolisch um circa 38% erhöhten LV-Volumen ausgegangen werden, was den Ergebnissen der vorliegenden Studie sehr nahe kommt. Abweichend von diesen Übereinstimmungen konnte echokardiographisch dagegen keine Veränderung der linksventrikulären Wanddicke bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die Schwierigkeit der exakten Erfassung der anatomischen Strukturen bei so kleinen Lebewesen wie Mäusen zurückzuführen, hier stoßen nahezu alle derzeit eingesetzten Bildgebungsverfahren an gewisse Grenzen, wobei die Verwendung der Kernspintomographie gegenwärtig die genauesten Ergebnisse sichert [74].

Im Kontrast zur Kombination von Dilatation und Hypertrophie der Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse steht die gering ausgeprägte rein konzentrische Hypertrophie bei den M-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen (enddiastolische Wanddicke +18% gegenüber Wildtyp), einhergehend mit einer völligen Übereinstimmung sämtlicher weiteren im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Parameter mit denen der Wildtyp-Mäuse. Bis auf die grenzwertige konzentrische Hypertrophie konnte somit bei den M-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen keinerlei Pathologie gefunden werden, ein Befund, der sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen deckt, die bei diesem Genotyp ebenfalls keine wesentlichen morphologischen oder funktionellen Defizite aufdecken konnten [13][53].

Die Ergebnisse der rechtsventrikulären Volumenbestimmung zeigten parallel zu den linksventrikulären Daten bei Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen zumindest grenzwertig erhöhte Volumina gegenüber Wildtypen und M-CK<sup>-/-</sup>. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings die erhöhte Schwierigkeit einer exakten Erhebung der rechtsventrikulären Parameter mit einbezogen werden. Nicht nur die wesentlich geringere Wanddicke und die Form der rechten Herzkammer mit hohem Grenzflächenanteil erschweren die Berechnung der Volumina. Vor allem seine komplexe Geometrie sowie die anatomischen Gegebenheiten der benachbarten Strukturen führen bei der Datenanalyse zu wesentlich größeren Zuordnungs- beziehungsweise Abgrenzungsproblemen zu den Vorhöfen und großen Gefäßen [48], vor allem da die extrem dünnen Herzklappen der Maus nicht immer sichtbar sind. Die Kombination dieser Faktoren führt zwar zu einer geringeren Genauigkeit der rechtsventrikulären Ergebnisse im Vergleich zu den einfacheren Verhältnissen bei der MR-Tomographie des linken Ventrikels, dennoch ist die Genauigkeit zumindest für qualitative Aussagen sicherlich ausreichend. Die gute Nutzbarkeit der Kernspintomographie zur Erhebung rechtsventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen in vivo wurde kürzlich nachgewiesen [75].

Die Volumen- und Funktionsparameter des Herzens der Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse wichen links- und rechtsventrikulär in vergleichbarem Ausmaß von denen der Wildtypen ab. Dagegen blieb die konzentrische Hypertrophie rein auf den linken Ventrikel beschränkt. Dies könnte als Folge der physikalischen Gegebenheiten am Herzen interpretiert werden. Sofern davon ausgegangen werden kann, dass bei CK-Knockout initial eine intrazelluläre enzymatische Störung mit Auswirkungen auf den Energiehaushalt vorliegt, so kann angenommen werden, dass der im Vergleich zum rechten Ventrikel aufgrund der deutlich höheren Druckbelastung energetisch stark geforderte linke Ventrikel hier deutlich eher Symptome etwa eines Energiemangels zeigen dürfte. Demzufolge können hier auch die größeren Auswirkungen bei Störung des Energiestoffwechsels erwartet werden. Die beschriebenen Veränderungen des rechten Ventrikels bei CK-Knockout im Vergleich zu den Wildtypen sind

aber nicht notwendigerweise isoliert und analog den Verhältnissen am linken Ventrikel zu sehen. Es ist ebenfalls denkbar, dass die rechtsventrikuläre Dilatation einen sekundären Anpassungsprozess bei bestehender Beeinträchtigung vor allem des energetisch hochbeanspruchten linken Ventrikels darstellt. Der enge Zusammenhang links- und rechtsventrikulärer Morphologie und Funktion und pathologischer Prozesse beider Ventrikel wurde in verschiedenen Veröffentlichungen bereits ausführlich beschrieben [7][47][75].

Trotz deutlicher Hypertrophie des linken Ventrikels und Dilatation beider Ventrikel zeigte sich die links- ebenso wie die rechtsventrikuläre Herzfunktion der Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse in keiner Weise eingeschränkt, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien, etwa am isolierten Herzen [53][54][58], deckt. Bei nahezu identischen Ejektionsfraktionen aller vier Genotypen von etwa 65% waren sowohl das Schlagvolumen als auch das Herzzeitvolumen bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup> (und mit Einschränkungen auch Mito-CK<sup>-/-</sup>) gegenüber Wildtyp und M-CK<sup>-/-</sup> sogar erhöht. Die Tatsache, dass Schlagvolumen und Herzminutenvolumen bei Knockout der mitochondrialen Kreatinkinase nicht nur nicht ab-, sondern im Gegenteil sogar zunehmen (M/Mito-CK<sup>-/-</sup> LV HZV +33%, RV HZV +38% gegenüber Wildtyp), erscheint auf den ersten Blick nicht unbedingt schlüssig. Eine potentielle Erklärung für das gestiegene Herzzeitvolumen ist im in der Summe erhöhten Durchblutungsbedarf des hypertrophierten Myokards zu vermuten. Wenn auch sicherlich nicht in diesem Umfang von ~35%, ist infolgedessen möglicherweise eine HZV-Steigerung im messbaren Bereich zu begründen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der gemessenen Herzzeitvolumina sind neben den Unterschieden im Herzzeitvolumen der Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen außerdem die Unterschiede zwischen gemessenem links- und rechtsventrikulärem HZV bei den einzelnen Versuchstieren zu berücksichtigen. Dabei ergaben sich in allen Versuchsgruppen tendenziell niedrigere rechtsventrikuläre Herzzeitvolumina als linksventrikuläre. Während bei den linksventrikulären Messungen eine hohe Genauigkeit unterstellt werden

darf [40], liegen bei der Phänotypisierung des rechten Ventrikels wie bereits erläutert wesentlich schwierigere Verhältnisse vor. Vermutlich hätte angesichts der zarten, komplex geformten rechtsventrikulären Strukturen eine Erhöhung der räumlichen Auflösung im vorliegenden Fall für auch quantitativ ähnlich genaue Ergebnisse wie in einer vorhergehenden Studie [75] gesorgt. Allerdings wäre dies nur unter der Voraussetzung einer deutlichen Messzeitverlängerung mit erhöhter Belastung der Versuchstiere (Narkose) und unter Umständen wiederum damit verbundenen Herzfunktionsveränderungen möglich gewesen, was angesichts der Zielsetzungen dieser Arbeit nicht unbedingt sinnvoll erschien. Es kann festgehalten werden, dass sich trotz der im Vergleich zu den linksventrikulären tendenziell niedrigeren rechtsventrikulären Herzzeitvolumina beide gemessenen Werte in den Versuchsgruppen ohne Infarkt nicht signifikant unterschieden. Im Unterschied dazu war bei den infarzierten Versuchstieren lediglich das links- nicht aber das rechtsventrikuläre HZV erhöht und zwischen beiden Messwerten wurden signifikante Unterschiede nachgewiesen. Diese Tatsache ist vermutlich als Korrelat einer relativen Mitralklappeninsuffizienz bei LV Dilatation anzusehen, worauf im Folgenden noch genauer eingegangen werden wird. Die genauen Mechanismen und Hintergründe der gefundenen Steigerung des HZV im Umfang von etwa 35% bei *M/Mito-CK<sup>-/-</sup>* ohne Infarkt gegenüber Wildtyp sind zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend zu klären, jedoch ist auch hier möglicherweise eine durch Hypertrophie und Dilatation hervorgerufene relative Mitral- und Trikuspidalinsuffizienz der entscheidende Faktor.

Geht man davon aus, dass die myokardiale Hypertrophie Teil eines Adaptationsprozesses bei gestörtem intrazellulärem Energietransport darstellt, so scheinen in der Bilanz bei Kreatinkinase-Defizit durch CK-Knockout mögliche primär vorhandene Funktionsstörungen gut kompensiert zu sein. Dies ist vor allem auch vor dem Hintergrund der nachgewiesenen Dilatation des linken Ventrikels bemerkenswert, infolge derer die nach dem Gesetz von Laplace erhöhte Wandspannung eher zu einer zusätzlichen Verschlechterung der Ökonomie der Herzarbeit führt. Eine gut erhaltene Herzfunktion der Knockout-

Tiere war zwar aufgrund der früheren Studien zu erwarten, die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass ein Kreatinkinase-Mangel keineswegs ohne Auswirkungen auf das Myokard bleibt. Wobei zu hinterfragen ist, inwieweit das derartig veränderte Herz auch bei erhöhter Belastung eine ausreichende Leistungsfähigkeit aufweist. Neuen Studien zufolge konnten Einschränkungen der Herzfunktion von CK-Knockout-Mäusen bei erhöhtem Energiebedarf festgestellt werden [10].

Herauszustellen ist außerdem die Beobachtung, dass sich bei M-CK<sup>-/-</sup> ebenso wie bei Mito-CK<sup>-/-</sup> eine Hypertrophie ausbildete, jedoch in deutlich unterschiedlichem Ausmaß, was die Annahme eines geringfügig abweichenden Pathomechanismus in beiden Fällen nahe legt. Allerdings zeigt der Vergleich mit den M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen, dass eine Kombination beider Knockouts zu keiner Kumulation der Auswirkungen zweier unterschiedlicher Prozesse führt, da gegenüber Mito-CK<sup>-/-</sup> keine verstärkte Hypertrophie (oder Dilatation) nachgewiesen werden konnte.

Der Vergleich der verschiedenen Knockout-Stämme lässt den Schluss zu, dass das mitochondriale CK-Isoenzym gegenüber den anderen Isoformen von besonderer Bedeutung ist. Die Schlüsselstellung der mitochondrialen Kreatinkinase im Energietransfer der Myozyten wurde bereits diskutiert. Mit Hilfe von <sup>31</sup>P MR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass ein Knockout der zytosolischen Isoform der Kreatinkinase in der Bilanz keine wesentlichen Auswirkungen auf den enzymatischen Umsatz energiereicher Phosphate hatte. Dagegen bedingte ein Ausfall der mitochondrialen Isoform eine deutliche Verringerung des Umsatzes solcher Verbindungen [13][54][58]. Messungen der Respirationsrate in den Zellen von M-CK<sup>-/-</sup>- und Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen lassen den Schluss zu, dass das von der mitochondrialen CK generierte ADP ein wichtiger Regulator der oxidativen Phosphorylierung in der Zelle ist [25]. M-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten dagegen keine bedeutenden Veränderungen gegenüber Wildtyp-Mäusen. Die jetzt erhobenen Daten stützen diese Ergebnisse und belegen, dass die verschiedenen Isoformen der Kreatinkinase im Myokard

unterschiedliche Funktionen wahrnehmen und besonders bei Fehlen der mitochondrialen Isoform erhebliche Adaptationen am Herzen gegenüber dem normalen Genotyp resultieren. Letzteres ist besonders angesichts der Tatsache bemerkenswert, dass die mitochondriale Kreatinkinase im gesunden Myokard im Vergleich zu den zytosolischen Isoformen in wesentlich geringeren Konzentrationen in den Muskelzellen vorliegt [69] und in vitro nur etwa 26 % der absoluten enzymatischen Aktivität auf die mitochondriale Isoform entfallen, auf die zytosolischen Isoformen dagegen mindestens 70 % [13][61].

## 5.2 CK-Knockout und Myokardinfarkt

Nachdem ein Knockout der mitochondrialen Kreatinkinase bereits ohne weitere Manipulationen eine deutliche Hypertrophie des Herzens bei gut erhaltener Funktion verursachte, eröffnete sich die Frage, wie sich ein Myokardinfarkt in dieser Situation auswirkt. Die in Folge eines Infarktes auftretende typische, bildgebungstechnisch erfassbare kardiale Reorganisation, auch als Remodeling bezeichnet, ist beim Menschen bereits seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Die Verhältnisse im hier gewählten Mausmodell entsprechen weitestgehend denen des Menschen, unter anderem treten bei chronischem Myokardinfarkt auch bei Mäusen langfristig in Abhängigkeit von der Infarktgröße regelmäßig eine linksventrikuläre Dilatation und eine Hypertrophie des Myokards außerhalb des eigentlichen Infarktgebietes auf [40].

Wie in vorhergehenden Studien führte die Infarzierung der Wildtyp-Mäuse vier Wochen nach der Operation zu einem deutlichen Remodeling. Diese Mäuse entwickelten in Abhängigkeit von der Infarktgröße eine Hypertrophie und Dilatation des linken Ventrikels, gleichzeitig veränderten sich auch dessen Funktions-Parameter. Der rechte Ventrikel zeigte keine sicheren Anzeichen eines Remodelings. Doch obwohl sowohl ein M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Knockout als auch ein chronischer Myokardinfarkt bei Wildtypen separat jeweils ein deutliches linksventrikuläres Remodeling im Sinne einer Hypertrophie hervorriefen,

entwickelte sich nach einer Kombination beider Pathologien, bei den infarzierten M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen, keine zusätzliche Symptomatik gegenüber den MI WT im Sinne eines verstärkten Remodelings. Sämtliche bestimmten Parameter von Wildtyp- und Knockout-Mäusen zeigten nach Myokardinfarkt ein hohes Maß an Übereinstimmung. Entsprechend diesen Ergebnissen fanden sich außerdem keinerlei klinische Zeichen eines Herzversagens, wie beispielsweise ein Pleuraerguss oder Aszites. Auch die Mortalität war nicht erhöht. Somit darf gefolgert werden, dass die hier untersuchten Knockout-Mäuse das Fehlen der Kreatinkinase kompensieren konnten.

Die Herzfunktion war vor wie nach Infarzierung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen gut erhalten, was sich auch in der identischen Infarktmortalität beider Genotypen ausdrückt. Interessanterweise waren bei den M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen infolge der Infarzierung keine weiteren Adaptationsprozesse, wie beispielsweise eine zusätzliche Wanddickenzunahme, festzustellen. Es wurde zumindest in Ruhe eine Wildtyp-äquivalente Herzfunktion erreicht. Auch wenn diese Ergebnisse auf den ersten Blick möglicherweise überraschend erscheinen, ergeben sich hier Parallelen mit Daten aus der Literatur. So konnte gezeigt werden, dass bei Ratten die Induktion einer kardialen Hypertrophie durch Störung des Fettsäurestoffwechsels nicht nur die linksventrikuläre Dilatation nach chronischer Koronarligatur begrenzte, sondern die linksventrikuläre Funktion sogar verbesserte [35]. Vergleichbar dazu wurden in einer Studie spontan hypertensive Ratten mit infolge dessen vorbestehender linksventrikulärer Hypertrophie infarziert. Diese Tiere entwickelten trotz der hypertensiv bedingt erhöhten Nachlast und damit erhöhter Belastung des linken Ventrikels nur eine geringe linksventrikuläre Dilatation bei gut erhaltener Ventrikelfunktion [78]. Betrachtet man zusätzlich die Ergebnisse der jetzt durchgeführten Untersuchungen, so finden sich Indizien für positive Auswirkungen einer vorbestehenden linksventrikulären Hypertrophie auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt. Eine Erklärung hierfür wären die positiven physikalischen Effekte einer vorbestehenden Wandverdickung, welche nach dem Laplace'schen Gesetz bereits im frühen Stadium eines

Myokardinfarktes den Wandstress und damit wohl auch den Energiebedarf des Myokards verringern. Andererseits konnte in der vorliegenden Arbeit auch keine eindeutig protektive Wirkung einer vorbestehenden Hypertrophie bei Myokardinfarkt der M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse nachgewiesen werden. Sowohl die Mortalität im akuten, als auch die Morphologie des Herzens im chronischen Stadium waren bei infarzierten Wildtypen und infarzierten Knockout-Mäusen vergleichbar. Es zeigte sich allerdings ein Trend zu geringeren linksventrikulären Volumina nach Infarzierung der M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Zwar kann in dieser Arbeit zu dieser Frage keine abschließende Beurteilung gegeben werden, doch ist möglicherweise durch vorbestehende Wandhypertrophie ein gewisser Schutz des Herzens der CK-Knockout-Mäuse vor exzessiver Dilatation nicht auszuschließen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die CK-Knockout-Mäuse nach Infarkt in keinem der gemessenen Parameter entscheidende Unterschiede gegenüber den infarzierten Wildtypen zeigten. Dies ist insofern bemerkenswert, als eine linksventrikuläre Hypertrophie infolge anderer zugrunde liegender pathologischer Prozesse als prognostisch ungünstig angesehen wird [77]. In dieser Arbeit konnten dagegen solche negativen Folgen etwa im Sinne einer erhöhten Mortalität nicht nachgewiesen werden, wozu einschränkend zu bemerken ist, dass eindeutige Nachteile für die Knockout-Mäuse in einem späteren Lebensabschnitt nicht auszuschließen sind. Die frühe Mortalität wird neben den akuten Infarktkomplikationen wie Ventrikelruptur, kardialer Dekompensation oder Rhythmusstörungen wie etwa Kammerflimmern [9] auch von operativen Komplikationen, wie Narkose- und Beatmungsfolgen, Blutungen, hypoxischen Schäden, Schock etc., bestimmt. Die langfristige Überlebensrate ist dagegen wie beim Patienten überwiegend geprägt vom komplexen Zusammenwirken humoraler und kardialer Faktoren des *Remodelings* [26][77].

Im Gegensatz zu den vier Gruppen ohne Infarkt zeigte sich bei den beiden Infarktgruppen das linksventrikuläre Herzzeitvolumen im Verhältnis zum rechtsventrikulären HZV deutlich erhöht, bei MI Wildtyp um durchschnittlich

53% und bei MI M/Mito-CK<sup>-/-</sup> um 27%. Im Schnitt aller vier Gruppen ohne Infarkt war das linksventrikuläre HZV dagegen nur 9% höher als das rechtsventrikuläre HZV. Primär sind ähnliche Herzzeitvolumina des rechten und linken Ventrikels zu erwarten, und die in den Infarktgruppen gefundenen Ergebnisse lassen sich nicht allein durch Messungenauigkeiten erklären. Das Schlagvolumen wurde als Differenz aus EDV und ESV errechnet, womit dieser Messmethode der effektiven Herzleistung in vivo eine gewisse Vereinfachung der tatsächlichen Vorgänge zugrunde liegt. Im vorliegenden Fall sind die Differenzen zwischen ermitteltem und dem korrekten HZV im Sinne des effektiv im Körperkreislauf beförderten Blutzeitvolumens vermutlich auf Blutregurgitationen infolge von Klappenvitien zurückzuführen. Eine beim Menschen häufig zu beobachtende Komplikation des großen chronischen Myokardinfarktes ist die Mitralinsuffizienz, die nicht allein durch Papillarmuskelabriss verursacht wird, sondern vor allem in Form einer funktionellen Insuffizienz als Folge einer Gefügedilatation des linken Ventrikels auftritt [23]. Da bei Mäusen ein entsprechendes Phänomen auftritt, ist das wie oben berechnete HZV (Differenz zwischen enddiastolischem und endsystolischem Volumen) die Summe aus dem in den Vorhof regurgitierten und dem in die Aorta ausgeworfenen Blut. Die Differenz des HZV beider Ventrikel kann als ungefähres Maß der relativen Mitralinsuffizienz angesehen werden, wenn man davon ausgeht, dass die Trikuspidalklappe suffizient ist.

Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen vier Wochen nach Infarkt ein deutliches Remodeling am Herzen der Wildtyp-Mäuse, das in seiner Ausprägung von der Infarktgröße abhängig ist. Bei den M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte nach Infarkt lediglich eine Zunahme der Dilatation und Abnahme der Ejektionsfraktion des linken Ventrikels nachgewiesen werden. Die übrigen kardialen Parameter einschließlich Myokardmasse und Herzzeitvolumen waren gegenüber den nicht infarzierten Knockout-Mäusen im Mittel nicht verändert und zeigten auch keine Korrelation zur Infarktgröße. Zumindest bis zum Zeitpunkt von vier Wochen nach Infarkt bewirkten also weder der Kreatinkinase-mangel noch die infolge dessen bestehende Hypertrophie des Herzens einen deutlich ersichtlichen

Nachteil für diese Versuchstiere, was sich auch in der Mortalität niederschlug. Selbst ein verhältnismäßig großer Infarkt konnte bei CK-Knockout ebenso gut wie bei Wildtypen kompensiert werden.

### 5.3 Energiemetabolismus und kardiales Remodeling

Infolge der bereits dargelegten Ergebnisse dieser Arbeit ist nun sowohl die Frage nach der genauen Ätiologie der myokardialen Hypertrophie bei Knockout der Kreatinkinase zu diskutieren, als auch ihr histologisches Korrelat zu hinterfragen. Als direkter Effekt eines CK-Knockout und damit Ursache der Hypertrophie sind verschiedene Mechanismen denkbar. Neben der Möglichkeit einer Zunahme der reinen Muskelmasse durch Hypertrophie der einzelnen Myozyten, ähnlich der physiologischen Adaptation bei erhöhter Belastung, wäre ebenfalls ein pathologischer Umbau des Myokards im Sinne einer Verfettung oder Fibrosierung denkbar. Auch eine Kombination verschiedener Prozesse kommt in Frage.

In den bisherigen histologischen Untersuchungen von CK-Knockout-Mäusen wurden keine Hinweise für einen bindegewebigen Umbau des Myokards mit vermehrtem Auftreten von Fibrozyten oder Fettzellen oder einer Vermehrung der extrazellulären Matrix gefunden. Es fanden sich jedoch Anhalte für Veränderungen der Zellarchitektur in den Myozyten von M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen, etwa verschmälerte Myofibrillen und eine Einwanderung von Mitochondrien in die Zwischenräume zwischen den kontraktilelementen [24]. Obwohl die Autoren in dieser Studie zusätzlich auch ein erhöhtes relatives Herzgewicht feststellten, wurden jedoch keine Angaben zur Größe der einzelnen Myozyten bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen gemacht. Die Ergebnisse einer histologischen Untersuchung der Myozytengröße weisen auf eine signifikante Vergrößerung der Myozytenquerschnitte bei CK-Knockout-Mäusen hin [41].

Eine häufige Ursache der linksventrikulären Hypertrophie ist eine erhöhte Nachlast als Folge arterieller Hypertonie. Dass dieser Mechanismus als auslösender Faktor der Hypertrophie bei Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen (unter Umständen hervorgerufen von bisher unbekanntem Effekten eines CK-Knockouts an anderen Organen) jedoch nicht zum Tragen kommt, wurde kürzlich gezeigt. Der Blutdruck der wachen Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse ist gegenüber dem von Wildtyp-Mäusen nicht erhöht und ist somit als Ursache der ventrikulären Hypertrophie auszuschließen [41].

In dieser Arbeit konnten keinerlei funktionelle Defizite des Herzens bei Fehlen der Kreatinkinase aufgedeckt werden, dennoch zeigt der Nachweis einer deutlichen Hypertrophie und Dilatation am Herzen der CK-Knockout-Mäuse, dass bei CK-Mangel primär eine Störung der normalen Funktionsfähigkeit des Herzens oder zumindest eine Beeinträchtigung intrazellulärer Signalprozesse und Regelkreise vorliegt. In früheren Studien wurden bei Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen intrazelluläre Veränderungen der Energiehomöostase beschrieben. Neben einem Abfall des Verhältnisses Kreatinphosphat zu ATP wurden ein Anstieg der Konzentration des freien ADP sowie ein Abfall der aus ATP-Hydrolyse verfügbaren freien Energie beobachtet [53][54][58]. Es könnte gefolgert werden, dass die beobachtete Hypertrophie durch diese Verschiebungen im Energiegleichgewicht verursacht wird. Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft wird davon ausgegangen, dass dem Kreatinphosphat - einem Produkt der Kreatinkinase-katalysierten Reaktion - in der Zelle als „Energie-Shuttle“ eine wichtige Bedeutung zukommt. Demzufolge dient das Kreatinphosphat vor allem als Energieüberträger zwischen den Mitochondrien als Ort der zellulären Atmung und dem Ort des Energieverbrauchs, in den Myozyten also vor allem den kontraktilen Filamenten [70][76]. Möglicherweise sind die beschriebenen Anhäufungen der Mitochondrien in der Nähe der Fibrillen [24] als Adaptation zu betrachten, um die Strecke zwischen Energieproduzenten und -verbrauchern bei Ausfall dieses Transportsystems möglichst kurz zu halten. Eine solche zelluläre

Reorganisation könnte dann als ein entscheidender Schritt in der Ausbildung einer Hypertrophie aufgefasst werden.

Tatsächlich lassen sich verschiedene Belege dafür finden, dass die ungestörte Funktion des zellulären Energiemetabolismus entscheidenden Einfluss auf die Morphologie des Herzens hat und auf dieser Ebene auftretende Störungen eine kardiale Hypertrophie verursachen können [71]. Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurden auch in anderen Studien auffällige kardiale Umbaubeziehungsweise Reorganisationsprozesse im Sinne einer vor allem linksventrikulären Hypertrophie beschrieben, nachdem wichtige Substrate oder Enzyme der zellulären Energieversorgung entfernt wurden. So konnte bei Ratten durch Fütterung des Kreatinanalogs Beta-Guanidinopropionat mit der Folge einer Störung der Bildung von Kreatinphosphat, einem Substrat der von der Kreatinkinase katalysierten Reaktion, eine signifikante rechts- und linksventrikuläre Hypertrophie induziert werden [37]. Ebenso wurde in einem kürzlich entwickelten Mausmodell mit Knockout des für die Kreatinsynthese unverzichtbaren Enzymes Guanidinoazetat-N-methyltransferase neben zahlreichen anderen Effekten eine Erhöhung der Relation Herzgewicht zu Körpergewicht um etwa 15% festgestellt [55]. Daneben zeigten auch Mäuse mit Knockout des Glukosetransporters GLUT4 eine kardiale Hypertrophie, obwohl in diesem Fall die Kreatinphosphat/ATP-Relation nicht erniedrigt, sondern im Gegenteil erhöht war [73]. Auch beim Menschen wurde anhand des Beispiels von Patienten mit genetisch bedingter hypertrophischer Kardiomyopathie bei ineffizienter ATP-Verwertung die zentrale Rolle von Veränderungen des Energiemetabolismus bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie diskutiert [2].

Wenn auch die Bedeutung der Kreatinkinase für die Ausbildung einer normalen Herzmorphologie und die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie infolge eines CK-Knockouts in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen klar dargelegt wurden, so muss die Frage nach dem genauen Verlauf der Adaptationsprozesse bei CK-Knockout und den zugrunde

liegenden zellulären Signalprozessen offen bleiben. Nachdem eine enge Verbindung des intrazellulären Kalzium- und Energiehaushalts im Muskel beschrieben wurde [65], ließe sich über eine intrazelluläre Signalwirkung des Kalziums in diesem Zusammenhang spekulieren, schließlich beschreiben einige Publikationen bedeutende Änderungen des intrazellulären Kalziumhaushalts als Folge eines CK-Knockouts [6][10][62].

In einer Studie zur Bedeutung intrazellulärer Enzyme und Membrankanäle in der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase der Zelle wurde für die zytosolischen Isoenzyme der CK eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalgebung postuliert. Unter anderem wurde die Bedeutung der Kreatinkinase für die ungestörte Funktion von Membran-Kanälen herausgestellt, bei M-CK-Knockout zeigten die einzelnen Zellen phänotypisch Veränderungen im Sinne einer Störung des elektrischen Membranpotentials bei gestörter Kaliumkanal-Funktion [1]. In dieser Entdeckung könnte möglicherweise auch die entscheidende Ursache der Störungen des Kalziumhaushalts der Zelle liegen, denn der enge Zusammenhang von Kalziumhaushalt und zellulären Membranpotentialen ist bekannt. Vor diesem Hintergrund ist bei der engen Verzahnung des Energiestoffwechsels mit vielen Funktionen der Muskelzelle nicht auszuschließen, dass ein Knockout der Kreatinkinase weit reichende Veränderungen innerhalb der Zelle nach sich zieht, die unter anderem auch die Genexpression betreffen könnten. Beispiele für direkt rezeptorvermittelte Mechanismen in der Genese von kardialer Hypertrophie sind der Guanylyl Cyclase-A Rezeptor, der Wachstum von Myozyten und Fibroblasten hemmt, und der Angiotensin II 1A Rezeptor, über dessen Stimulation eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie und Fibrose hervorgerufen werden kann [33]. Im Endeffekt bestehen vielfältige Verknüpfungen zwischen Energiehaushalt, kardialer Funktion, Remodeling und der Transkription von Genen für die Einkodierung von Proteinen mit Schlüsselstellungen betreffend Metabolismus und Transport verschiedenster Substrate, über deren exaktes Zusammenwirken zum jetzigen Zeitpunkt überwiegend gemutmaßt werden muss [4].

Auch wenn die Frage nach den Zusammenhängen zwischen Schädigungen des Myokards, Hypertrophie des Herzens und Änderungen im Kreatinkinase-System nicht abschließend geklärt ist, fanden sich klare Belege für einen engen Zusammenhang von kardialer Hypertrophie und Änderungen im Kreatinkinase-System. Es kann geschlossen werden, dass ein extremer Abfall der Kreatinkinase wohl nur unter den Bedingungen eines umfassenden Adaptationsprozesses des Herzens, einschließlich einer ausgeprägten linksventrikulären Hypertrophie, toleriert werden kann.

## 5.4 Limitationen

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit ist festzustellen, dass hier ein Mausmodell untersucht wurde, das nicht in allen Punkten der Situation eines Myokardinfarktes beim Patienten entspricht. So unterscheidet sich etwa das hier verwendete Modell eines operativ induzierten Myokardinfarktes in wesentlichen Punkten von den Verhältnissen beim Patienten mit Infarkt, bei dem verschiedene pathologische Prozesse wie eine Hypertonie, Hyperlipidämie und Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielen. Dieser Umstand erschwert die direkte Vergleichbarkeit der Untersuchungen bei experimentell verursachten Infarkten und der klinischen Realität. Der Vorteil eines solchen Modells ist auf der anderen Seite, dass so Ursache und Wirkung der einzelnen Prozesse isoliert untersucht und viele andere Faktoren ausgeschlossen werden können, womit präzise Rückschlüsse auf die genaue Ätiologie eines pathologischen Prozesses häufig erst möglich werden.

Als methodische Schwäche der hier durchgeführten Arbeit lässt sich anführen, dass zur Erhebung der kardialen Parameter bei CK-Knockout Mäuse untersucht wurden, die laut Erstbeschreibung aus den Blastozysten von Mäusen des Stammes C57BL/6 und embryonalen Stammzellen von Mäusen des Stammes 129/Sv gezüchtet wurden und somit einen nicht exakt bestimmten Genotyp aufweisen [12][62]. Mangels Verfügbarkeit eines bis auf die Gene zur

Transkription der Kreatinkinase identischen Genotyps wurden zum Vergleich in dieser Studie Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet. Daher ist nicht völlig auszuschließen, dass geringfügige genetische Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führten.

Obwohl der Genotyp unzweifelhaft von hoher Bedeutung ist, lassen sich die Ergebnisse der Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse - unter anderem etwa 70% Zunahme der linksventrikulären Masse gegenüber Wildtyp - aufgrund der Deutlichkeit ihrer Ausprägung wohl kaum auf diese Weise erklären. Im Vergleich mit den Ergebnissen der M-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse, deren Genotyp einen identischen genetischen Background wie die Genotypen der Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse aufweist, zeigt sich dann definitiv, dass der Faktor der unterschiedlichen Zuchtstämme beim Vergleich mit den Wildtypen zu vernachlässigen ist. Bis auf die linksventrikuläre Masse und Wanddicke, die bei M-CK<sup>-/-</sup> leicht erhöht waren, zeigten alle übrigen Parameter einerseits ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den Parametern der Wildtypen und andererseits signifikante Unterschiede zu denen der Mito-CK<sup>-/-</sup>- und M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse, womit die Hypertrophie und Dilatation des Herzens definitiv durch den entsprechenden Gen-Knockout verursacht sein müssen. Im Übrigen wurden, zumindest soweit im Rahmen der Literaturangaben feststellbar, auch in sämtlichen anderen Studien, in denen diese Knockout-Stämme untersucht wurden, als Kontrolltiere Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen möglichst genau die Morphologie und Funktion des Herzens in vivo wiedergeben. Dabei müssen speziell bei der Interpretation der Funktions-Parameter mögliche Auswirkungen der Narkose während der Messungen in Betracht gezogen werden. Ein ideales Anästhetikum sollte eine ausreichende Narkosetiefe gewährleisten, gut verträglich sein und die Physiologie des Versuchstieres nicht verändern. Wie in anderen Cine-MR-Studien wurde daher Isofluran als Narkosegas verwendet, welches vor allem den Vorteil einer dem Wachzustand sehr nahe kommenden, sehr stabilen Herzfunktion während der Narkose bei guter Steuerbarkeit und

Verträglichkeit hat [50]. Zusätzlich wirken sich speziell in der MR-Tomographie der Maus die leicht atemdepressiven Einflüsse des Isoflurans positiv auf die Qualität der Bilder aus, da somit die Bewegungsunschärfe durch seltenere Atemzüge vermindert wird [51]. Allerdings darf nicht übersehen werden, dass auch für die Isoflurannarkose gewisse Einschränkungen bezüglich der Übertragbarkeit auf den Wachzustand gelten. So ist etwa eine bedeutende Steigerung der Myokardperfusion beschrieben [11], wobei davon ausgegangen werden darf, dass auch dieser Faktor auf die Ergebnisse dieser Arbeit keine entscheidenden Auswirkungen haben dürfte, da in der Vergleichsgruppe die identische Narkose verwendet wurde. Die beschriebenen Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Verhältnisse im Ruhezustand. Es wäre wünschenswert, die Herzfunktion der CK-Knockout-Mäuse auch unter Stressbedingungen, zum Beispiel pharmakologisch induziert, im MRT zu untersuchen. In echokardiographischen Untersuchungen wurde bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen in vivo eine normale Herzfunktion in Ruhe, aber eine abgeschwächte Reaktion des Herzens auf Isoprenalin-Gabe festgestellt [10].

Bei der Interpretation der Ergebnisse der infarzierten Tiere gilt es außerdem zu bedenken, dass die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Infarktgrößenbestimmung zwar für diesen Zweck ausreichend genaue Ergebnisse liefert und demnach beide Infarktgruppen zum Zeitpunkt der Untersuchung identische Infarktgrößen aufwiesen. Unter Berücksichtigung der doch beträchtlichen Abweichungen der Gefäßverläufe sowie der unvermeidlichen Unterschiede in der Lage der Koronarligaturen ist jedoch nicht auszuschließen, dass die ursprüngliche Größe des ischämischen Gebietes in beiden Gruppen gewisse Unterschiede aufwies. Es ist denkbar, dass in einer Gruppe bei zuvor kleinerem Infarktgebiet die gleiche Infarktgröße der anderen Gruppe erst durch nachträgliche überproportionale Infarktexpansion erreicht wurde. Für endgültige Aussagen nicht nur über einen Zustand nach Myokardinfarkt, sondern auch über den Verlauf der Heilung der Infarktnarbe bei CK-Knockout-Mäusen wären sequentielle MR-Messungen und eine initiale Quantifizierung des minderperfundierten Areal von Nöten gewesen.

Andererseits hätte eine zusätzliche MR-Untersuchung bei frischem Infarkt möglicherweise auch negative Effekte, wie eine erhöhte Mortalität, verursacht.

## 5.5 Abschließende Betrachtung

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse belegen, dass das Fehlen des mitochondrialen Isoenzym der Kreatinkinase deutliche kardiale Adaptationen verursacht. Im durchschnittlichen Alter von 41 Wochen fanden sich bei Mito-CK<sup>-/-</sup> ebenso wie bei M/Mito-CK<sup>-/-</sup>-Mäusen eine massive linksventrikuläre Hypertrophie sowie eine leichte links- und rechtsventrikuläre Dilatation. Trotz dieses eindrucksvollen morphologischen Phänotyps zeigte sich die Funktion beider Ventrikel voll erhalten. Nach operativer Induzierung eines Myokardinfarktes wurden bei CK-Knockout weder Zeichen einer Progressivität der vorbestehenden kardialen Hypertrophie beobachtet, noch wurden Anhalte für eine Dekompensation des Herzens oder eine gegenüber infarzierten Wildtyp-Mäusen verschlechterte Herzfunktion gefunden. Die linksventrikuläre Dilatation war hier sogar tendenziell weniger ausgeprägt. M-CK<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten lediglich eine grenzwertige linksventrikuläre Hypertrophie und zeigten ansonsten weder morphologische noch funktionelle Auffälligkeiten im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen. Der zytosolischen Isoform der Kreatinkinase kommt somit eine vermutlich geringere Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des normalen Metabolismus zu als der mitochondrialen Isoform.

Es darf gefolgert werden, dass durch Kreatinkinasemangel bedingte funktionelle Defizite des Herzens durch kardiale Hypertrophie kompensiert werden können. Diese Adaptation bietet unter Umständen auch einen gewissen Schutz vor den negativen Folgen eines chronischen Myokardinfarktes, indem trotz bestehender Störungen der Energiehomöostase die positive Wirkung des verminderten Wandstress und damit auch niedrigeren Energiebedarfes die negativen Effekte nicht nur unter Normalbedingungen, sondern auch bei zusätzlichem Vorliegen weiterer pathologischer Prozesse kompensieren können.

## 6 Zusammenfassung

Transgene Tiermodelle ermöglichen seit einigen Jahren eine gezielte Untersuchung des Einflusses einzelner Gene, und damit auch ihrer entsprechenden Produkte und deren Substrate, auf die Integrität des Organismus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der verschiedenen Isoenzyme der Kreatinkinase im Herzen untersucht, indem die kardiale Morphologie und Funktion dreier verschiedener Stämme von Kreatinkinase-Knockout-Mäusen mit der von Wildtyp-Mäusen verglichen wurde. Der Kreatinkinase wird eine wichtige Rolle im intrazellulären System zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase zugeschrieben, beim Menschen gehen verschiedene kardiale Erkrankungen mit Veränderungen des Kreatinkinase-Systems einher. Neben der Bestimmung verschiedener kardialer Parameter von Mäusen mit Knockout der kardialen Isoenzyme der Kreatinkinase wurde geprüft, inwieweit sich ein durch permanente Koronarligatur induzierter chronischer Myokardinfarkt auf die Morphologie und Funktion des Herzens bei Kreatinkinase-Knockout auswirkt. Als Methode kam hierzu die *Cine-Fast Low Angle Shot (FLASH)*-Magnetresonanzbildgebung zur Anwendung, die eine nicht invasive, präzise Erfassung verschiedener kardialer Parameter *in vivo* ermöglicht.

Myokardmasse, links- und rechtsventrikuläre Volumina, Ejektionsfraktion, Herzzeitvolumina, Wanddicken sowie die Infarktgröße bei den infarzierten Kreatinkinase-Knockout-Mäusen konnten erstmalig *in vivo* bestimmt und mit Wildtyp-Mäusen verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Alter von durchschnittlich 41 Wochen ein Knockout des mitochondrialen Isoenzym der Kreatinkinase eine deutliche linksventrikuläre Hypertrophie sowie leichtgradige biventrikuläre Dilatation verursacht. Bei Knockout der M-Untereinheit der zytosolischen Isoenzyme und dadurch bedingtem Fehlen von CK-MM und CK-MB resultiert lediglich eine geringgradige konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie. Der rechte Ventrikel zeigte bei allen Knockout-

Mäusen lediglich geringe Veränderungen im Vergleich mit den Wildtypen. Die Herzfunktion war bei allen Tieren unter Normalbedingungen voll erhalten, Zeichen einer Herzinsuffizienz fanden sich nicht. Vier Wochen nach Infarzierung zeigten sich bei Knockout- und Wildtyp-Mäusen keine signifikanten Unterschiede in Herzmorphologie und Funktion. Die Mortalität nach Infarkt war in beiden Gruppen identisch.

Die aus einem Fehlen der mitochondrialen Kreatinkinase resultierenden Defizite des Herzens können somit durch Ausbildung einer Hypertrophie kompensiert werden. Im Vergleich mit der mitochondrialen Form kommt den zytosolischen Isoenzymen der Kreatinkinase eine geringere Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des Metabolismus und damit auch der Funktion des Herzens zu. Ein kombinierter Knockout sowohl der M-Untereinheit der zytosolischen CK als auch der mitochondrialen CK führt bezüglich der Morphologie und Funktion des Herzens zu keiner stärkeren Pathologie als bei selektiv mitochondrialem Knockout.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Abraham, M.R., Selivanov, V.A., Hodgson, D.M., Pucar, D., Zingman, L.V., Wieringa, B., Dzeja, P.P., Alekseev, A.E., Terzic, A., *Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing. Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out.* J Biol Chem, 2002. 277(27):24427-24434.
- [2] Ashrafian, H., Redwood, C., Blair, E., Watkins, H., *Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion.* Trends Genet, 2003. 19(5):263-268.
- [3] Bellenger, N.G., Davies, L.C., Francis, J.M., Coats, A.J., Pennell, D.J., *Reduction in sample size for studies of remodeling in heart failure by the use of cardiovascular magnetic resonance.* J Cardiovasc Magn Reson, 2000. 2(4):271-278.
- [4] Van Bilsen, J., *"Energetics" of Heart Failure.* Ann N Y Acad Sci, 2004. 1015:238-249.
- [5] Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M., *Nuclear Induction.* Phys Rev, 1946. 69:117.
- [6] Boehm, E., Ventura-Clapier, R., Mateo, P., Lechene, P., Veksler, V., *Glycolysis supports calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in skinned ventricular fibres of mice deficient in mitochondrial and cytosolic creatine kinase.* J Mol Cell Cardiol, 2000. 32(6):891-902.
- [7] Boschat, J. Etienne, Y., Bellet, M., Barra, J., Blanc, J.J., and Penther, P., *Right ventricular function in healed myocardial infarction in man. A cineangiographic assessment.* Eur J Radiol, 1985. 5:17-23.

- [8] Burstein, D., *MR imaging of coronary artery flow in isolated and in vivo hearts*. J Magn Reson Imag, 1991. 1(3):337-346.
- [9] Cercek, B., Shah, P.K., *Complicated acute myocardial infarction. Heart failure, shock, mechanical complication*. Cardiol Clin, 1991. 9(4):569-593. Review.
- [10] Crozatier, B., Badoual, T., Boehm, E., Ennezat, P.V., Guenoun, T., Su, J., Veksler, V., Hittinger, L., Ventura-Clapier, R., *Role of creatine kinase in cardiac excitation-contraction coupling: studies in creatine kinase-deficient mice*. Faseb J, 2002. 16(7):653-660.
- [11] Crystal, G.J., Czinn, E.A., Silver, J.M., Salem, M.R., *Coronary vasodilation by isoflurane. Abrupt versus gradual administration*. Anaesthesiology, 1995. 82(2):542-549.
- [12] Van Deursen, J., Heerschap, A., Oerlemans, F., Ruitenbeek, W., Jap, P., Laak, H. ter, Wieringa, B., *Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity*. Cell, 1993. 74(4):621-31.
- [13] Van Dorsten, F.A., Nederhoff, M.G., Nicolay, K., van Echteld, C.J., *<sup>31</sup>P NMR Studies of creatine kinase flux in M-creatine kinase-deficient mouse heart*. Am J Physiol, 1998. 275(4 Pt 2):H1191-1199.
- [14] Ehman, R.L., McNamara, M.T., Pallack, M., Hricak, H., Higgins, C.B., *Magnetic resonance imaging with respiratory gating: techniques and advantages*. Am J Roentgenol, 1984. 143(6):1175-1182.
- [15] Frahm, J., Haase, A., Matthaei, D., *Rapid NMR imaging of dynamic processes using the FLASH technique*. Magn Reson Med, 1986. 3(2):321-327.
- [16] Glover, G.H. and Pelc, N.J., *A rapid-gated cine MRI technique*. Magn Reson Annu, 1988. Review:299-333.

- [17] Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H., *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(12):7380-7384.
- [18] Haacke, E.M., Lenz, G.W., Nelson, A.D., *Pseudo-gating: elimination of periodic motion artifacts in magnetic resonance imaging without gating*. Magn Reson Med, 1987. (2):162-174.
- [19] Haase, A., Matthaei, D., Hanicke, W., Frahm, J., *Dynamic digital subtraction imaging using fast low-angle shot MR movie sequence*. Radiology, 1986. 160(2):537-541
- [20] Horn, M., Remkes, H., Stromer, H., Dienesch, C., Neubauer, S., *Chronic phosphocreatine depletion by the creatine analogue beta- guanidinopropionate is associated with increased mortality and loss of ATP in rats after myocardial infarction*. Circulation, 2001. 104(15):1844-1849.
- [21] Ingwall, J.S., Kramer, M.F., Fifer, M.A., Lorell, B.H., Shemin, R., Grossman, W., Allen, P.D., *The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium*. N Engl J Med, 1985. 313(17):1050-1054.
- [22] Ingwall, J.S., Atkinson, D.E., Clarke, K., Fetters, J.K., *Energetic correlates of cardiac failure: changes in the creatine kinase system in the failing myocardium*. Eur Heart J, 1990. 11 Suppl B:108-115.
- [23] Iung, B., *Management of ischaemic mitral regurgitation*. Heart, 2003. 89(4):459-464.
- [24] Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A., Ventura-Clapier, R., *Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization*. Circ Res, 2001. 89(2):153-159.
- [25] Kay, L., Nicolay, K., Wieringa, B., Saks, V., Wallimann, T., *Direct Evidence for the Control of Mitochondrial Respiration by Mitochondrial Creatine Kinase in Oxidative Muscle Cells in Situ*. J Biol Chem, 2000. 275(10):6937-6944.

- [26] Khairy, P., Thibault, B., Talajic, M., Dubuc, M., Roy, D., Guerra, P.G., Nattel, S., *Prognostic significance of ventricular arrhythmias post-myocardial infarction*. Can J Cardiol, 2003. 19(12):1393-1404. Review.
- [27] Kimmlingen, R., *Konstruktion und Berechnung von Magnetfeld-Gradientenspulen für die NMR-Mikroskopie*. Diplomarbeit, Physikalisches Institut der Universität Würzburg, 1997.
- [28] Kress, J., *Quantitative Segmentation mehrdimensionaler NMR-Bilder*. Diplomarbeit, Physikalisches Institut der Universität Würzburg, 1996.
- [29] Kumar, A., Welti, D., Ernst, R.R., *NMR Fourier zeugmatography*. J Magn Reson, 1975. 18(1):69-83.
- [30] Lanz, T., *Mono- und doppelresonante Birdcage-Meßspulen für NMR-Experimente*. Diplomarbeit, Physikalisches Institut der Universität Würzburg, 1996.
- [31] Lanz, T., *Bau und Charakterisierung von NMR-Meßspulen*. Naturwissenschaftliche Dissertation, Physikalisches Institut der Universität Würzburg, 2001.
- [32] Lauterbur, P.C., *Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance*. Nature, 1973. 242:190-191.
- [33] Li, Y., Kishimoto, I., Saito, Y., Harada, M., Kuwahara, K., Izumi, T., Takahashi, N., Kawakami, R., Tanimoto, K., Nakagawa, Y., Nakanishi, M., Adachi, Y., Garbers, D.L., Fukamizu, A., Nakao, K., *Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A receptor-mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart*. Circulation, 2002. 106(13):1722-1728.
- [34] Liao, R., Nascimben, L., Friedrich, J., Gwathmey, J.K., Ingwall, J.S., *Decreased energy reserve in an animal model of dilated cardiomyopathy. Relationship to contractile performance*. Circ Res, 1996. 78(5):893-902.

- [35] Litwin, S.E., Raya, T.E., Anderson, P.G., Litwin, C.M., Bressler, R., Goldman, S., *Induction of myocardial hypertrophy after coronary ligation in rats decreases ventricular dilatation and improves systolic function.* *Circulation*, 1991. 84(4):1819-1827.
- [36] Mansfield, P., Grannel, P.K, *NMR "diffraction" in solids?* *J Phys C*, 1973. 6:L422.
- [37] Mekhfi, H., Hoerter, J., Lauer, C., Wisnewsy, C., Schwartz, K., Ventura-Clapier, R., *Myocardial adaptation to creatine deficiency in rats fed with beta-guanidinopropionic acid, a creatine analogue.* *Am J Physiol*, 1990. 258(4 Pt. 2):H1151-1158.
- [38] Mural, R.J., Adams, M.D., Myers, E.W., Smith, H.O., Miklos, G.L., Wides, R., Halpern, A., Li, P.W., Sutton, G.G., Nadeau, J., Salzberg, S.L., Holt, R.A., Kodira, C.D., Lu, F., Chen, L., Deng, Z., Evangelista, C.C., Gan, W., Heiman, T.J., Li, J., Li, Z., Merkulov, G.V., Milshina, N.V., Naik, A.K., Qi, R., Shue, B.C., Wang, A., Wang, J., Wang, X., Yan, X., Ye, J., Yooseph, S., Zhao, Q., Zheng, L., Zhu, S.C., Biddick, K., Bolanos, R., Delcher, A.L., Dew, I.M., Fasulo, D., Flanigan, M.J., Huson, D.H., Kravitz, S.A., Miller, J.R., Mobarry, C.M., Reinert K., Remington, K.A., Zhang, Q., Zheng, X.H., Nusskern, D.R., Lai, Z., Lei, Y., Zhong, W., Yao, A., Guan, P., Ji, R.R., Gu, Z., Wang, Z.Y., Zhong, F., Xiao, C., Chiang, C.C., Yandell, M., Wortman, J.R., Amanatides, P.G., Hladun, S.L., Pratts, E.C., Johnson, J.E., Dodson, K.L., Woodford, K.J., Evans, C.A., Gropman, B., Rusch, D.B., Venter, E., Wang, M., Smith, T.J., Houck, J.T., Tompkins, D.E., Haynes, C., Jacob, D., Chin, S.H., Allen, D.R., Dahlke, C.E., Sanders, R., Li, K., Liu, X., Levitsky, A.A., Majoros, W.H., Chen, Q., Xia, A.C., Lopez, J.R., Donnelly, M.T., Newman, M.H., Glodek, A., Kraft, C.L., Nodell, M., Ali, F., An, H.J., Baldwin-Pitts, D., Beeson, K.Y., Cai, S., Carnes, M., Carver, A., Caulk, P.M., Center, A., Chen, Y.H., Cheng, M.L., Coyne, M.D., Crowder, M., Danaher, S., Davenport, L.B., Desilets, R., Dietz, S.M., Doup, L., Dullaghan, P., Ferriera, S., Fosler, C.R., Gire, H.C., Gluecksmann, A., Gocayne, J.D., Gray, J., Hart, B., Haynes, J., Hoover, J., Howland, T., Ibegwam, C., Jalali, M., Johns, D., Kline, L.,

- Ma, D.S., MacCawley, S., Magoon, A., Mann, F., May, D., McIntosh, T.C., Mehta, S., Moy, L., Moy, M.C., Murphy, B.J., Murphy, S.D., Nelson, K.A., Nuri, Z., Parker, K.A., Prudhomme, A.C., Puri, V.N., Qureshi, H., Raley, J.C., Reardon, M.S., Regier, M.A., Rogers, Y.H., Romblad, D.L., Schutz, J., Scott, J.L., Scott, R., Sitter, C.D., Smallwood, M., Sprague, A.C., Stewart, E., Strong, R.V., Suh, E., Sylvester, K., Thomas, R., Tint, N.N., Tsonis, C., Wang, G., Wang, G., Williams, M.S., Williams, S.M., Windsor, S.M., Wolfe, K., Wu, M.M., Zaveri, J., Chaturvedi, K., Gabrielian, A.E., Ke, Z., Sun, J., Subramanian, G., Venter, J.C., Pfannkoch, C.M., Barnstead, M., Stephenson, L.D., *A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome*. Science, 2002. 296:1661-1671.
- [39] Nahrendorf, M., Wiesmann, F., Hiller, K.H., Han, H., Hu, K., Waller, C., Ruff, J., Haase, A., Ertl, G., Bauer, W.R., *In vivo assessment of cardiac remodeling after myocardial infarction in rats by cine-magnetic resonance imaging*. J Cardiovasc Magn Reson, 2000. 2(3):171-180.
- [40] Nahrendorf, M., Hiller, K.H., Hu, K., Ertl, G., Haase, A., Bauer, W.R., *Cardiac magnetic resonance imaging in small animal models of human heart failure*. Med Image Anal, 2003. 7(3):369-375.
- [41] Nahrendorf, M., Spindler, M., Hu, K., Bauer, L., Ritter, O., Nordbeck, P., Quaschnig, T., Hiller, K.H., Wallis, J., Ertl, G., Bauer, W.R., Neubauer, S., *Creatine kinase knockout mice show left ventricular hypertrophy and dilatation, but unaltered remodeling post-myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2005. 65(2):419-427.
- [42] Nascimben, L., Friedrich, J., Liao, R., Pauletto, P., Pessina, A.C., Ingwall, J.S., *Enalapril treatment increases cardiac performance and energy reserve via the creatine kinase reaction in myocardium of Syrian myopathic hamsters with advanced heart failure*. Circulation, 1995. 91(6):1824-1833.

- [43] Neubauer, S., Horn, M., Naumann, A., Tian, R., Hu, K., Laser, M., Friedrich, J., Gaudron, P., Schnackerz, K., Ingwall, J.S., et al., *Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction*. J Clin Invest, 1995. 95(3):1092-1100.
- [44] Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Fishbein, M.C., Fletcher, P.J., Spadaro, J., Kloner, R.A., Braunwald, E., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. Circ Res, 1979. 44(4):503-512.
- [45] Pflugfelder, P.W., Sechtem, U.P., White, R.D., Higgins, C.B., *Quantification of regional myocardial function by rapid cine MR imaging*. Am J Roentgenol, 1988. 150(3):523-529.
- [46] Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V., *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solids*. Phys Rev, 1946. 69:37-38.
- [47] Rigolin, V.H., Robiolio, P.A., Wilson, J.S., Harrison, J.K., and Bashore, T.M., *The forgotten chamber: the importance of the right ventricle*. Cathet Cardiovasc Diagn, 1995. 35:18-28.
- [48] Rominger, M., Bachmann, G., Geuer, M., Puzik, M., Boedeker, R., Ricken, W., and Rau, W., *Accuracy of right and left ventricular heart volume and left ventricular mass determination with cine MRI in breath holding technique*. Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bilgeb Verfahr, 1999. 170:54-60.
- [49] Rommel, E., Kuhstrebe, J., Wiesmann, F., Szimtenings, M., Streiff, J.U.G., Haase, A., *A double trigger unit for ECG and breath triggered mouse heart imaging*. MAGMA, 2000. 11:568.
- [50] Roth, D.M., Swaney, J.S., Dalton, N.D., Gilpin, E.A., Ross, J. Jr., *Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 282(6):H2134-2140.

- [51] Ruff, J., *Funktionelle NMR-Bildgebung am Herzen der Maus*. Naturwissenschaftliche Dissertation, Physikalisches Institut der Universität Würzburg, 2000.
- [52] Ruff, J., Wiesmann, F., Hiller, K.H., Voll, S., Kienlin, M. von, Bauer, W.R., Rommel, E., Neubauer, S., Haase, A., *Magnetic resonance microimaging for noninvasive quantification of myocardial function and mass in the mouse*. Magn Reson Med, 1998. 40(1):43-48.
- [53] Saupe, K.W., Spindler, M., Tian, R., Ingwall, J.S., *Impaired cardiac energetics in mice lacking muscle-specific isoenzymes of creatine kinase*. Circ Res, 1998. 82(8):898-907.
- [54] Saupe, K.W., Spindler, M., Hopkins, J.C., Shen, W., Ingwall, J.S., *Kinetic, thermodynamic, and developmental consequences of deleting creatine kinase isoenzymes from the heart. Reaction kinetics of the creatine kinase isoenzymes in the intact heart*. J Biol Chem, 2000. 275(26):19742-19746.
- [55] Schmidt, A., Marescau, B., Boehm, E.A., Renema, W.K., Peco, R., Das, A., Steinfeld, R., Chan, S., Wallis, J., Davidoff, M., Ullrich, K., Waldschutz, R., Heerschap, A., De Deyn, P.P., Neubauer, S., Isbrandt, D., *Severely altered guanidine compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency*. Hum Mol Genet, 2004. 13(9):905-921.
- [56] Sechtem, U., Pflugfelder, P.W., White, R.D., Gould, R.G., Holt, W., Lipton, M.J., Higgins, C.B., *Cine MR imaging: potential for the evaluation of cardiovascular function*. Am J Roentgenol, 1987. 148(2):239-246.
- [57] Smith, H.L., *The relation of the weight of the heart to the weight of the body and of the weight of heart to age*. Am Heart J, 1929. 4:79-93.

- [58] Spindler, M., Niebler, R., Remkes, H., Horn, M., Lanz, T., Neubauer, S., *Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(2):H680-687.
- [59] Starling, R.C., Hammer, D.F., Altschuld, R.A., *Human myocardial ATP content and in vivo contractile function*. Mol Cell Biochem, 1998. 180(1-2):171-177.
- [60] Stark, D., Bradley, W., *Magnetic resonance imaging*. The C.V. Mosby Company, 1988.
- [61] 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., *Use of gene targeting for compromising energy homeostasis in neuromuscular tissues: the role of sarcomeric mitochondrial creatine kinase*. J Neurosci Methods, 1997. 71(1):29-41.
- [62] 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., *Altered Ca<sup>2+</sup> responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies*. Cell, 1997. 89(1):93-103.
- [63] Teichholz, L.E., Cohen, M.V., Sonnenblick, E.H., Gorlin, R., *Study of left ventricular geometry and function by B-scan ultrasonography in patients with and without asynergy*. N Engl J Med, 1974. 291(23):1220-1226.
- [64] Tian, R. and Ingwall J.S., *Energetic basis for reduced contractile reserve in isolated rat hearts*. Am J Physiol, 1996. 270(4 Pt 2):H1207-1216.
- [65] Tian, R., Halow, J.M., Meyer, M., Dillmann, W.H., Figueredo, V.M., Ingwall, J.S., Camacho, S.A., *Thermodynamic limitation for Ca<sup>2+</sup> handling contributes to decreased contractile reserve in rat hearts*. Am J Physiol, 1998. 275(6 Pt 2):H2064-2071.

- [66] Tian, R., Musi, N., D'Agostino, J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., *Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy*. *Circulation*, 2001. 104(14):1664-1669.
- [67] Tian, R., *Transcriptional regulation of energy substrate metabolism in normal and hypertrophied heart*. *Curr Hypertens Rep*, 2003. 5(6):454-458.
- [68] Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A.V., d'Albis, A., Deursen J. van, Wieringa, B., Veksler, V.I., *Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function*. *J Biol Chem*, 1995. 270(34):19914-19920.
- [69] Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Anflous, K., Mateo, P., Deursen, J. van, Wieringa, B., Ventura-Clapier, R., *Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function*. *J Biol Chem*, 1995. 270(34):19921-19929.
- [70] Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H.M., *Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis*. *Biochem J*, 1992. 281(Pt 1):21-40.
- [71] Watkins, H., *Genetic clues to disease pathways in hypertrophic and dilated cardiomyopathies*. *Circulation*, 2003. 107(10):1344-1346.
- [72] Wedeen, V.J., Wendt, R.E. 3rd, Jerosch-Herold, M., *Motional phase artifacts in Fourier transform MRI*. *Magn Reson Med*, 1989. 11(1):114-120.
- [73] Weiss, R.G., Chatham, J.C., Georgakopolous, D., Charron, M.J., Wallimann, T., Kay, L., Walzel, B., Wang, Y., Kass, D.A., Gerstenblith, G., Chacko, V.P., *An increase in the myocardial PCr/ATP ratio in GLUT4 null mice*. *Faseb J*, 2002. 16(6):613-615.

- [74] Wiesmann, F., Ruff, J., Hiller, K.H., Rommel, E., Haase, A., Neubauer, S., *Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. 278(2):H652-657.
- [75] Wiesmann, F., Frydrychowicz, A., Rautenberg, J., Illinger, R., Rommel, E., Haase, A., Neubauer, S., *Analysis of right ventricular function in healthy mice and a murine model of heart failure by in vivo MRI*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(3):HH1065-1071.
- [76] Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R., *Creatine and creatinine metabolism*. Physiol Rev, 2000. 80(3):1107-1213. Review.
- [77] Yousef, Z.R., Redwood, S.R., Marber, M.S., *Postinfarction left ventricular remodeling: a pathophysiological and therapeutic review*. Cardiovasc Drugs Ther, 2000. 14(3):243-252.
- [78] Zdrojewski, T., Gaudron, P., Whittaker, P., Poelzl, S., Schiemann, J., Hu, K., Ertl, G., *Ventricular remodeling after myocardial infarction and effects of ACE inhibition on hemodynamics and scar formation in SHR*. Cardiovasc Pathol, 2002. 11(2):88-93.

## 8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildungen 1a bis d.....	21
Abbildungen 2a bis d.....	23
Tabelle 1.....	27
Tabelle 2.....	28
Abbildung 3.....	29
Abbildungen 4a und b.....	30
Abbildungen 5a und b.....	31
Abbildungen 6a und b.....	32
Abbildungen 7a bis c.....	33
Tabelle 3.....	34
Abbildungen 8a und b.....	35
Tabelle 4.....	37
Abbildungen 9a und b.....	38
Tabelle 5.....	39
Abbildungen 10a bis c.....	40
Abbildungen 11a und b.....	41
Abbildungen 12a bis c.....	42
Tabelle 6.....	43
Abbildung 13.....	44
Abbildungen 14a und b.....	45

## Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die durch direktes oder indirektes Wirken zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang R. Bauer danke ich ganz herzlich für die Übernahme der Doktorvaterschaft sowie die angenehme Arbeitsgruppenleitung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Matthias Nahrendorf für die Überlassung des Themas und die umfassende und zuverlässige Betreuung und Unterstützung in allen Belangen dieser Arbeit, angefangen von der Theorie, über die praktische Arbeit am MR-Tomographen, bis zur Niederschrift und abschließenden Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. med. Kai Hu danke ich für die Einführung in die Arbeitsgruppe sowie die unverzichtbare Hilfe bei der Infarzierung.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Karl-Heinz Hiller und Frau Sabine Voll bedanke ich mich für die Hilfestellung im Umgang mit der teilweise etwas eigenwilligen Technik am Biospec-System und den Versuchstieren stellvertretend für alle beteiligten Mitarbeiter der Universität Würzburg und der EP5.

Abschließend gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern und meiner ganzen Familie, deren fortwährende Unterstützung in vielerlei Hinsicht diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 355 „Pathophysiologie der Herzinsuffizienz“ unterstützt.

# Lebenslauf

Name: Peter Johann Nordbeck

Geburtsdatum: 26.06.1978

Geburtsort: Göttingen

Eltern: Edith und Dr. med. Hans Nordbeck

Familienstand: ledig, keine Kinder

## **Schulbildung:**

1984 - 1988: Grundschule Herberhausen (Göttingen)

1988 - 1990: Orientierungsstufe Lutherschule (Göttingen)

1990 - 1997: Europaschule Theodor-Heuss-Gymnasium (Göttingen)

Herbsthalbjahr 1994: Auslandsaufenthalt am Framlingham College  
(Framlingham, Großbritannien)

Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) am 13.06.1997

## **Wehrdienst:**

Juli 1997 - April 1998: Grundwehrdienst (Pzgrenbtl. 12 / Osterode am Harz)

## **Hochschulbildung:**

Okt. 1998 - Okt. 2005: Studium der Humanmedizin an der Bayerischen  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung: 20.09.2000

Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung: 28.08.2001

Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung: 02.09.2004

Praktisches Jahr: Okt. 2004 - Sep. 2005, Wahlfach: Herz-Thorax-Chirurgie

Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung: 20.10.2005

Erlangung der Approbation als Arzt: 21.10.2005